

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

**VIA ANTI-INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA E
PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NA
TRIPANOTOLERÂNCIA DE COELHOS INFECTADOS
PELO *Trypanosoma evansi***

TESE DOUTORADO

Márcio Machado Costa

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**VIA ANTI-INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA E PROTEÍNAS
DE FASE AGUDA NA TRIPANOTOLERÂNCIA DE COELHOS
INFECTADOS PELO *Trypanosoma evansi***

Márcio Machado Costa

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós- Graduação em
Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária
Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Orientadora: Prof.^a Silvia Gonzalez Monteiro

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Costa, Márcio Machado

Via anti-inflamatória colinérgica e proteínas de fase aguda na tripanotolerância de coelhos infectados pelo *Trypanosoma evansi* / Márcio Machado Costa.-2013.

84 p. ; 30cm

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2013

1. Proteínas de fase aguda 2. Colinesterases 3. Imunoglobulina M 4. Tripanotolerância I. Monteiro, Silvia Gonzalez II. Título.

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

A Comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**VIA ANTI-INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA E PROTEÍNAS DE FASE
AGUDA NA TRIPANOTOLERÂNCIA DE COELHOS INFECTADOS
PELO *Trypanosoma. evansi***

elaborada por
Márcio Machado Costa

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

Comissão Examinadora:

Silvia Gonzalez Monteiro, Dra. (UFSM)
(Presidente/orientadora)

Aleksandro Schafer da Silva, Dr. (UDESC)

Bruno Leite dos Anjos, Dr. (UNIPAMPA)

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)

Cinthia Melazzo Mazzanti, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 26 de abril de 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor, carinho e pelo apoio incondicional na minha formação profissional.

Ao meu irmão e grande amigo Gustavo, pelo companheirismo, amizade e pela grande ajuda concedida em toda minha carreira acadêmica.

A minha esposa Juliana, por abrir mão de muitos finais de semana em prol das pesquisas em que trabalhei, ajudando-me de forma direta e indireta em tudo que faço. Por aceitar a aventura de mudar de cidade e começar tudo do zero, contando somente comigo e eu com ela. Sou eternamente grato por você fazer parte da minha história profissional e pessoal. Muito obrigado por tudo meu amor.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Silvia Gonzalez Monteiro, pela oportunidade concedida quando aceitou me orientar, pelo apoio incondicional em função de alguns percalços ocorridos durante o doutorado e principalmente, por ser um exemplo de profissional, de um caráter intangível e de uma sensibilidade ímpar. Tenho muito orgulho de ser o seu primeiro aluno de doutorado e saiba que serei eternamente grato por tudo.

A minha co-orientadora, professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, por tudo que me ensinou na área da Patologia Clínica Veterinária, na qual atuo hoje como docente, pela confiança no meu trabalho e por ser uma das grandes responsáveis pelo meu crescimento profissional.

A equipe do LACVET – UFSM, em especial a Professora Cinthia e aos alunos Débora, Cristina, Guilherme e Camila que auxiliaram diretamente nas minhas pesquisas, e aos demais alunos, residentes e funcionários.

As minhas grandes amigas Raqueli França e Verônica Castro, doutorandas do LACVET – UFSM, que sempre estavam dispostas a me ajudar em todos os projetos realizados, independente se esses exigissem longos e árduos períodos de trabalho. Vou ser eternamente grato por toda a ajuda concedida.

Ao grande amigo Roberto Marinho Maciel, pelos conselhos sempre pertinentes, por ser um exemplo de força de vontade, caráter e honestidade profissional, dispondo do seu tempo e ajuda para qualquer necessidade. O meu muito obrigado, amigo.

Ao professor Aleksandro Schafer da Silva, pelo primeiro convite para trabalhar com *Trypanosoma evansi* e pelos vários convites para a realização de diversos projetos de pesquisa. Sem esse convite eu não estaria aqui redigindo esse trabalho de tese, portanto meu amigo, o meu eterno agradecimento.

A toda a equipe do LAPAVET, em especial as doutorandas Camila Belmonte e Luciana Dalla Rosa, pela grande ajuda na realização dos meus projetos. Foi através do trabalho em conjunto desses dois laboratórios que todos os projetos puderam ser desenvolvidos.

A professora Marta Lizandra e ao Professor João Batista e a sua equipe, em especial Emily Waczuk, pela parceria em outros projetos que ainda estão em andamento.

Ao laboratório de Bioquímica Toxicológica, em especial ao Gustavo Thomé e a professora Maria Rosa pela parceria nessa e em outras pesquisas.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido, que foi indispensável para a realização do projeto de tese e de tantos outros projetos.

“Só o desejo inquieto, que não passa
Faz o encanto da coisa desejada...
E terminamos desdenhando a caça
Pela doida aventura da caçada”.

Mário Quintana

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

VIA ANTI-INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NA TRIPANOTOLERÂNCIA DE COELHOS INFECTADOS PELO *Trypanosoma evansi*

AUTOR: Márcio Machado Costa
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Silvia Gonzalez Monteiro
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de abril de 2013.

A tripanossomose é uma enfermidade de distribuição mundial que, no Brasil, é denominada “mal das cadeiras”, em função dos sinais clínicos apresentados pelos equinos, principal espécie afetada. A doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma evansi*, sendo caracterizada por sinais clínicos como perda de peso, mucosas pálidas, edema de pálpebra e vulva. Coelhos têm sido relatados como uma espécie resistente ao *T. evansi*, contudo, ainda não se sabe de que modo aspectos imunitários, como a imunidade inata e o sistema colinérgico, comportam-se nessa espécie, nem mesmo como essas vias da inflamação influenciam a tripanotolerância de coelhos. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a resposta inflamatória e a via anti-inflamatória colinérgica e sua relação na tripanotolerância em coelhos infectados experimentalmente pelo *T. evansi*. Para tanto, foram utilizados 12 coelhos adultos, fêmeas, da raça Nova Zelândia, com peso corporal entre 3,6 a 4,5 Kg, divididos em dois grupos, um grupo controle e um grupo infectado, ambos com seis animais. Os coelhos pertencentes ao grupo infectado receberam, pela via intraperitoneal, 0,5 mL de sangue de rato contendo 10^8 tripanossomas por animal, enquanto que o grupo controle recebeu, pela mesma via, solução fisiológica. O período experimental foi de 118 dias, sendo o sangue coletado nos dias 0, 2, 7, 12, 27, 42, 57, 87, 102, e 118, para determinar as colinesterases, e nos dias 0, 5, 20, 35, 65, 95 e 118, para avaliar hemograma, proteínas totais, proteinograma sérico, imunoglobulinas e proteínas de fase aguda. Foi observado aumento na atividade da butirilcolinesterase (BChE) no 7º dia PI e da atividade da acetilcolinesterase (AChE) no 27º dia PI. Além disso, o grupo infectado apresentou aumento nas proteínas totais, bem como nas frações alfa, beta e gama globulinas ao longo do período experimental. A redução na albumina e no hematócrito foram observados em períodos pontuais da infecção experimental, bem como o aumento na imunoglobulina G. A infecção pelo *T. evansi* estimulou a produção de proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa, haptoglobina, α_2 macroglobulina, sendo observado um aumento na imunoglobulina M (IgM) em todo o período experimental (118 dias pós-infecção). A partir desses resultados, conclui-se que a via colinérgica pode ter influência na resposta inflamatória, através da ação da BChE e AChE na regulação das concentrações de acetilcolina, acarretando em aumento nas concentrações de citocinas e, conseqüentemente, na produção de proteínas de fase aguda. A elevação na IgM, relacionada ao aumento da proteína C-reativa e haptoglobina, sugere o envolvimento dessas proteínas na defesa do hospedeiro contra o flagelado, e, possivelmente, na tripanotolerância de coelhos infectados com *T. evansi*.

Palavras-chave: Proteínas de fase aguda. Colinesterases. Imunoglobulina M. Tripanotolerância.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Postgraduate Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

CHOLINERGIC ANTI-INFLAMMATORY PATHWAY AND ACUTE PHASE PROTEINS IN TRYPANOTOLERANCE OF RABBITS INFECTED BY *Trypanosoma evansi*

AUTHOR: Márcio Machado Costa
ADVISER: Prof^a. Dr^a. Silvia Gonzalez Monteiro
Place and Date of Defense: Santa Maria, April 26th, 2013.

Trypanosomiasis is a disease of worldwide distribution which in Brazil is called "mal das cadeiras", owing the clinical signs shown by horses, which are the major species affected. The disease is caused by the protozoan *Trypanosoma evansi*, characterized by clinical signs such as weight loss, pale mucous membranes, swelling of the eyelid and vulva. Rabbits have been reported as a resistant species to *T. evansi*, however, is not yet known how immune aspects, such as innate immune and cholinergic system, behave in this species, not even as this inflammations pathways influence in rabbits's trypanotolerance. Thus, the aim of this study was to investigate the inflammatory response and cholinergic anti-inflammatory pathway and its relation to trypanotolerance in rabbits infected with *T. evansi*. For this, twelve female adult New Zealand rabbits, weighing 3.6–4.5 kg were used in this study. The animals were divided into two groups, a control group and an infected group, both with six animals. The rabbits belonging to the infected group received, intraperitoneally, 0.5 ml of rat blood containing 10^8 parasites per animal, while the control group received physiological solution by the same route. The experimental period reached 118 days. Blood was collected on days 0, 2, 7, 12, 27, 42, 57, 87, 102, and 118, for to determine the cholinesterases, and days 0, 5, 20, 35, 65, 95 and 118, for to evaluate blood count, total protein, serum proteinogram, immunoglobulins and acute phase proteins. There was an increase in the activity of butyrylcholinesterase (BChE), at 7th day PI, and in the activity of acetylcholinesterase (AChE), in 27th day PI. Furthermore, the infected group showed an increase in total protein and the fractions alpha, beta and gamma globulins along of experimental period. The reduction in albumin and hematocrit were observed in precise periods of experimental infection, as well as the increase in immunoglobulin G. Infection with *T. evansi* stimulated the production of acute phase proteins, such as C-reactive protein, haptoglobin, α_2 macroglobulin, being observed increase in immunoglobulin M (IgM) throughout the experimental period (118 days post-infection). From these results, it is concluded that the cholinergic pathway had influence the inflammatory response, through the action of AChE and BChE in the regulation of concentrations of acetylcholine, resulting in increased concentrations of cytokines and, consequently, in the production phase protein acute. The increase in IgM, associated with increased C-reactive protein and haptoglobin, suggests the involvement of these proteins in host defense against flagellated, with possible participation in trypanotolerance of rabbits infected with *T. evansi*.

Keywords: Acute phase proteins. Cholinesterases. Immunoglobulin M. Trypanotolerance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Formas Tripomastigotas de <i>T. evansi</i> em esfregaço sanguíneo (A); constituição do <i>T. evansi</i> (B). Adaptado de Silva et al. (2002). | 14 |
| Figura 2 – Comparação entre a pálpebra de um coelho saudável (A) e um infectado experimentalmente com <i>T. evansi</i> (B). Foi observada, no grupo infectado, a presença de edema bilateral de pálpebra. | 18 |
| Figura 3 – Comparação entre a vulva de um coelho saudável (A) e um infectado experimentalmente com <i>T. evansi</i> (B). Foi observada, no grupo infectado, a presença edema de vulva. | 18 |
| Figura 4 – Resumo do mecanismo de reação de fase aguda, demonstrando o papel do sistema colinérgico da modulação da resposta de fagócitos na produção de citocinas. Setas verdes indicam efeito estimulatório; setas vermelhas indicam efeito inibitório. Adaptado de Paltrinieri (2008). | 23 |
| Figura 5 – Lesões cutâneas localizadas na pálpebra superior (A) e na vulva de coelhos infectados experimentalmente pelo <i>T. evansi</i> . Foi observada, nos animais do grupo infectado, a presença de lesões cutâneas em locais que apresentaram previamente edema..... | 73 |
| Figura 6 – Alopecia focal na porção dorsal da orelha (A) e no lábio superior de coelhos infectados experimentalmente pelo <i>T. evansi</i> . Foi observada, nos animais do grupo infectado, a presença de alopecia focal em locais que apresentaram previamente edema..... | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Proteínas de fase aguda (PFA) principais e secundárias em diferentes espécies animais..... | 21 |
| Tabela 2 – Peso corporal de coelhos infectados experimentalmente pelo <i>T. evansi</i> . Média e desvio padrão do peso corporal nos dias 0, 30 60, 90 e 118 PI..... | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

BChE – Butirilcolinesterase

ChAT – Colina-O-Acetil-Transferase

Hp – Haptoglobina

Ht – Hematócrito

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

PFA – Proteínas de fase aguda

PI – Pós-infecção

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

TLTF – Fator desencadeante liberado por tripanosoma

VAcHT – Transportador vesicular de acetilcolina

VSG – Glicoproteínas de superfície variantes

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | ARTIGOS CIENTÍFICOS | 26 |
| 2.1 | Artigo 1 | 26 |
| 2.2 | Artigo 2 | 49 |
| 3 | DISCUSSÃO | 73 |
| 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 77 |
| 5 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 78 |

1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma evansi* é um flagelado da seção Salivaria, subgênero Trypanozoon, que apresenta ampla distribuição pelo mundo. Morfologicamente, o *T. evansi* é tipicamente monomórfico, apresentando-se quase que exclusivamente na forma afilada chamada tripomastigota (STEVENS; BRISSE, 2004). O flagelado mede entre 14 a 33 μm de comprimento e 1,5 a 2,2 μm de largura, sendo indistinguível das formas intermediárias do *T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiense* ou *T. brucei gambiense* (BRUN et al., 1998) (Figura 1A). O *T. evansi* possui flagelo livre e um pequeno subcinetoplasto terminal. No entanto, algumas formas são acinetoplásticas, em que o DNA circular do cinetoplasto está ausente (Figura 1B), estas, são encontradas em cepas selvagens, como resultado de mutação, ou após o tratamento com tripanocidas, como o aceturato de diminazeno (BRUN et al., 1998). Em um estudo realizado por Ventura et al. (2000), 14 cepas brasileiras foram avaliadas quanto aos aspectos morfológicos e moleculares e concluiu-se que não apresentam cinetoplasto, o que pode ser uma característica natural desses isolados.

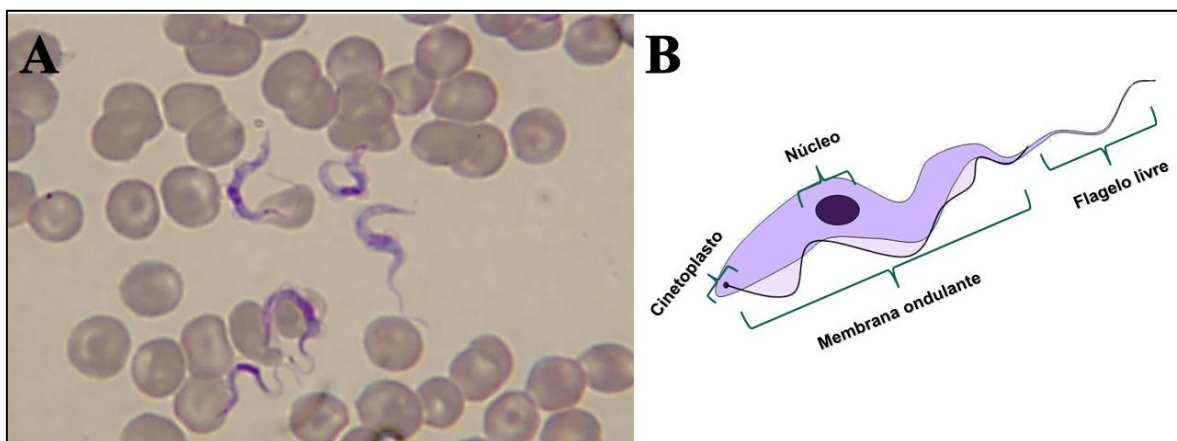


Figura 1 - Formas Tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo (A); constituição do *T. evansi* (B). Adaptado de Silva et al. (2002).

O *T. evansi* foi o primeiro tripanossoma patogênico descoberto. Em 1880, Griffith Evans descobriu organismos móveis semelhantes a espirilos no sangue de cavalos e camelos doentes. Evans descreveu a visualização dos parasitas em esfregaços frescos e os reconheceu como sendo protozoários (SILVA et al., 2002). A partir de então, doenças semelhantes, causadas por tripanossomas indistinguíveis do *T. evansi*, foram relatadas em várias partes do

mundo e em vários hospedeiros mamíferos. A doença têm sido denominada, como “el debab” na África, “su-auru” na Rússia e “murrina” no Panamá (AQUINO, 2007). No Brasil, a tripanossomose é denominada como “mal das cadeiras”, devido à sintomatologia nervosa apresentada pelos animais infectados, (paralisia dos membros pélvicos), resultando em incoordenação motora (HERRERA et al., 2004).

A tripanossomose afeta, principalmente, animais de produção na Ásia, África, América Central e América do Sul. Graves epidemias da surra foram registradas no final do século XIX e nos início do século XX na Indonésia e Filipinas. Todas as espécies de animais domésticos podem ser infectadas pelo *T. evansi*, no entanto, os principais hospedeiros variam geograficamente (LUCKINS; DWINGER, 2004). Na Indochina, os equinos são os mais afetados, seguidos pelos camelos e búfalos. Já na África (Somália, Quênia, Etiópia, Sudão, Chad e Nigéria) os camelos são os mais atingidos pela doença. Nas Américas Central e do Sul, os equinos são os principais afetados, seguidos pelos bovinos e animais silvestres (SILVA et al., 2002). Na Europa, Gutierrez et al. (2010) relataram um surto de camelos infectados pelo *T. evansi* na França e na Espanha. Por fim, um surto de tripanossomose nas Ilhas Canárias afetou principalmente camelos e, em menor número, burros e cavalos (TAMARIT et al., 2010).

No Brasil, a região do Pantanal Mato-Grossense é endêmica para essa enfermidade. No pantanal, a enfermidade afeta principalmente cavalos, o que assume uma grande importância, pois esses animais são amplamente utilizados no manejo de bovinos, que são a principal atividade econômica da região (AQUINO et al., 1999). Segundo Seidl et al. (1998), o custo de um surto de “mal das cadeiras” para a região do pantanal é de US\$ 2.4 milhões e uma mortalidade de 6.462 cavalos por ano. Assim, a expectativa de perdas anuais é de US\$ 2.143 ou cerca de seis cavalos por fazenda, em média.

O *T. evansi* é transmitido mecanicamente por dípteros hematófagos, sem que haja desenvolvimento cíclico no vetor (SILVA et al., 2002; AQUINO, 2007). O protozoário é transmitido principalmente por membros da família Tabanidae e por moscas do gênero *Stomoxys* (AQUINO, 2007) e o papel desses dípteros como vetores pode variar em diferentes condições geográficas (BRUN et al., 1998). Mutucas e moscas picadoras, por exemplo, são vetores mais eficientes para transmissão desse parasita na China e Indonésia, enquanto que na África, a mosca tsé-tsé (*Glossina* spp) é o principal vetor mecânico do *T. evansi* (BRUN et al., 1998). Na América Central, o *Desmodus rotundus* é considerado um vetor importante na transmissão da enfermidade (SILVA et al., 2002), uma vez que as formas tripomastigotas multiplicam-se na corrente sanguínea do morcego, podendo este permanecer infectado por um

mês (AQUINO, 2007). Outra forma possível de transmissão do protozoário é a via oral, que teve sua eficiência comprovada através da administração de tripomastigotas para cães e ratos (BAZOLLI et al., 2002; DA SILVA et al., 2007a). A rota oral de infecção pode ser importante na dispersão do *T. evansi* entre cães, quatis e capivaras, pois podem se infectar como consequência de suas frequentes disputas (HERRERA et al., 2004). Também, Luckins e Dwinger (2004) relatam que a ingestão de carne infectada pelo flagelado pode resultar na contaminação de seu predador.

Na transmissão mecânica por vetores, as formas tripomastigotas são transferidas de um mamífero a outro através do repasto sanguíneo (SILVA et al., 2002). Após a picada do inseto hematófago, os flagelados são inoculados na via intradérmica do seu hospedeiro, o que pode induzir uma lesão edematosa cutânea denominada cancro (LUCKINS; DWINGER, 2004). Geralmente, o número de tripomastigotas carreados na probóscida do vetor é pequeno, possibilitando uma fase inicial de multiplicação na pele, o que aumenta a população e a diversidade antigênica dos parasitas que entram na corrente sanguínea (LUCKINS; DWINGER, 2004). A inoculação de tripanossomas no hospedeiro desencadeia uma série de eventos envolvendo primeiramente a imunidade inata, e, secundariamente, a imunidade específica. Esse último exige uma apresentação eficiente de antígenos do parasita e ativação de linfócitos T e B, o que implica no reconhecimento específico de receptores do antígeno e no desenvolvimento de células efetoras (VINCENDEAU; BOUTEILLE, 2006).

A coevolução dos tripanossomas com os seus hospedeiros tornaram esses protozoários aptos em penetrar, desviar e alterar numerosas etapas que levam à geração de uma resposta imune eficaz. Os antígenos do *T. evansi* podem ser divididos em antígenos comuns, que são derivados do organismo total desintegrado e antígenos superficiais ou glicoproteínas de superfície variantes (VSG), que são encontrados na superfície do parasita (SILVA et al., 2002). As proteínas de superfície são altamente imunogênicas e induzem a uma potente resposta de anticorpos. Porém, a eficiência da resposta imune na eliminação do flagelado torna-se comprometida pela capacidade do protozoário em alterar seus antígenos de superfície (AQUINO, 2007). Assim, as VSG impedem a lise do flagelado pela via alternativa do complemento, e, acima de tudo, permitem ao protozoário evitar a resposta imunitária específica, através do fenômeno da variação antigênica (tripanossomas expressam VSG antigenicamente distintas) (VINCENDEAU; BOUTEILLE, 2006). As VSG também têm vários efeitos sobre os elementos do sistema imunológico, como a indução de autoanticorpos e citocinas, principalmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Outros componentes e fatores solúveis do tripanossoma, tais como o fator desencadeante liberado por tripanossoma

(TLTF), são responsáveis por estimular a produção de interferon gama (IFN- γ) pelas células T, que são envolvidas na modulação da resposta imune frente ao parasita. Também, a produção de arginase do hospedeiro, induzida pelo *T. evansi*, promove uma diminuição na resposta imune e o aumento na produção de L-ornitina, um fator de crescimento essencial para o protozoário (VINCENDEAU et al., 2003; VINCENDEAU; BOUTEILLE, 2006).

Dentre os animais afetados, camelos, cavalos, búfalos e cães apresentam a forma mais grave da enfermidade. Já bovinos são moderadamente afetados e suínos podem ser assintomáticos (TAYLOR; AUTHIÉ, 2004). A fase aguda da enfermidade afeta principalmente animais jovens e fêmeas gestantes (TAYLOR; AUTHIÉ, 2004) e cursa com morte em poucas semanas ou meses (BRUN et al., 1998). Já a fase crônica é mais frequente em áreas endêmicas da doença (TAYLOR; AUTHIÉ, 2004) e os animais afetados podem permanecer infectados por vários anos (BRUN et al., 1998).

Nos equinos, a tripanossomose apresenta um curso crônico, com sinais de emagrecimento progressivo, febre, anemia, edema de membros e de porções baixas do corpo, incoordenação e instabilidade dos membros pélvicos, além de atrofia das massas musculares (SILVA et al., 1995; CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005). Em um estudo experimental realizado por Marques et al. (2000) foram observados outros sinais clínicos como icterícia, linfadenopatia, edema submandibular e sufusões hemorrágicas na conjuntiva.

Em cães, a enfermidade foi descrita experimentalmente (AQUINO et al., 1999) e naturalmente (COLPO et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007), cursando com sinais de febre, mucosas pálidas e emagrecimento progressivo. Aquino et al. (1999) e Colpo et al. (2005) também evidenciaram linfadenopatia generalizada e localizada, respectivamente. Outros sinais, como conjuntivite e edema de face, são citados por Herrera et al. (2004).

Em bovinos, a infecção pelo *T. evansi* pode ser assintomática, sendo necessário realizar testes como o de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do agente. Isso mostra a importância dessa espécie na manutenção do agente em regiões endêmicas como a do Pantanal (HERRERA et al., 2004). Casos de bovinos apresentando a forma clínica da doença foram relatados por Da Silva et al. (2007b) no município de Videiras, RS, demonstrando a emergência da enfermidade fora das regiões consideradas endêmicas.

Em felinos, a tripanossomose se apresenta de forma semelhante a outras espécies, o que acarreta nos animais infectados apresentam sinais clínicos como anorexia, vômito, diarreia, mucosas pálidas (TARELLO, 2005), linfadenopatia, conjuntivite, opacidade de córnea unilateral, edema e alopecia de face, incoordenação dos membros posteriores e morte (DA SILVA et al., 2010b).

Em coelhos, a infecção pelo *T. evansi* mostra-se semelhante à que ocorre em outras espécies, caracterizada por perda de peso, mucosas pálidas, edema de pálpebra (Figura 2A e B) e vulva (Figura 3A e B (UCHE et al., 1992; DA SILVA et al., 2008b)).

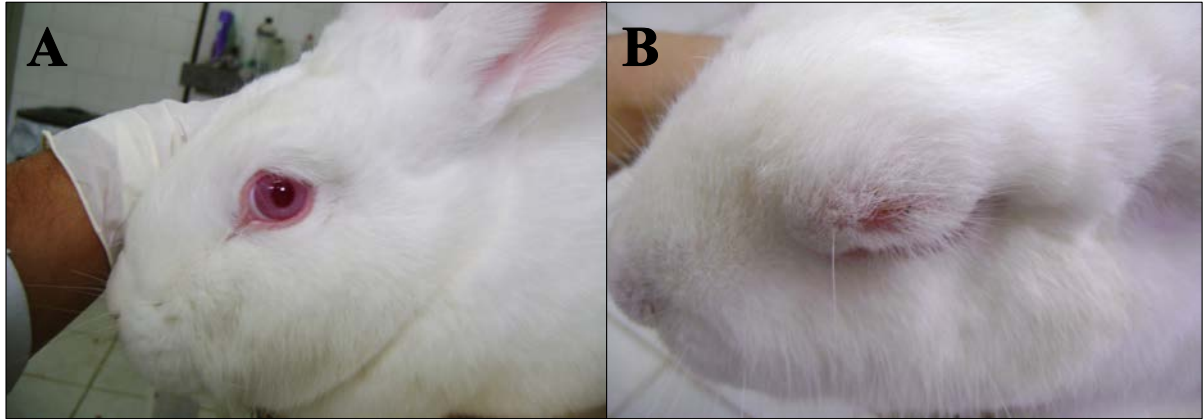


Figura 2 – Comparação entre a pálpebra de um coelho saudável (A) e um infectado experimentalmente com *T. evansi* (B). Foi observada, no grupo infectado, a presença de edema bilateral de pálpebra.

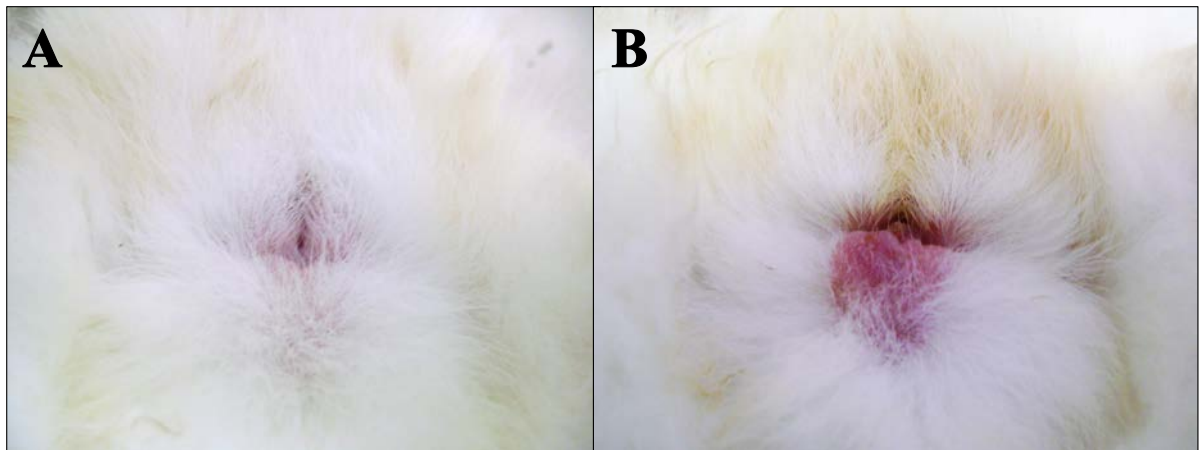


Figura 3 – Comparação entre a vulva de um coelho saudável (A) e um infectado experimentalmente com *T. evansi* (B). Foi observada, no grupo infectado, a presença edema de vulva.

A anemia é o achado laboratorial mais frequentemente encontrado nos animais acometidos pela tripanossomose. Contudo, há uma grande variação na classificação dessa anemia. Grande parte dos animais, como equinos e cães, naturalmente ou experimentalmente infectados pelo *T. evansi*, apresentaram anemia arregenerativa (AQUINO et al., 2002; COLPO et al., 2005; CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007; HOSSEININEJAD et al., 2007). Em búfalos (HILALI et al., 2006) e coelhos (DA

SILVA et al., 2008b) experimentalmente infectados com isolados do *T. evansi* apresentaram anemia macrocítica hipocrômica, típica das doenças hemolíticas. As divergências entre os autores em relação à classificação da anemia, com base em dados de infecções naturais, devem-se aos possíveis fatores concorrentes, como deficiências nutricionais e/ou outras doenças parasitárias (AQUINO, 2007). Em um trabalho experimental realizado com gatos, os animais infectados apresentaram anemia normocítica normocrômica, com resposta regenerativa leve. Isso ocorreu devido ao grau de anemia apresentado pelos animais, que se mostrou branda em todo o período experimental (DA SILVA et al., 2009).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem, ainda não completamente elucidada, das anemias na enfermidade causada pelo *T. evansi* (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). Os animais desenvolvem inicialmente uma anemia normocítica normocrômica, devido à hemodiluição causada pela expansão do volume plasmático. Após a fase inicial, pode-se manifestar uma anemia regenerativa em resposta a eritrofagocitose, perdurando por três a quatro meses. Já em estágios posteriores, pode ocorrer supressão da eritropoiese (JAIN, 1993). 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 retículo endotelial (SHEHU et al., 2006).

A partir dos danos causados pela infecção do *T. evansi*, pode-se iniciar uma cascata inflamatória bem organizada de modificações humorais e celulares dentro do tecido vascularizado. Essas mudanças resultam no acúmulo de fluidos, eletrólitos, e proteínas plasmáticas, bem como de leucócitos no tecido extravascular. A inflamação é geralmente vista como um mecanismo protetor, cujo objetivo biológico é diluir, isolar e eliminar a causa da lesão e reparar o dano tecidual resultante dela (ACKERMANN, 2009). A magnitude da resposta inflamatória depende muito mais da intensidade e do tempo de ação do estímulo agressor do que do tipo de agressão. Assim, a intensidade da resposta inflamatória,

independentemente da causa, será diretamente proporcional à quantidade de tecido lesado (SIQUEIRA JR., 2000).

Quando um processo inflamatório se instala em qualquer lugar do corpo, o organismo responde fabricando novas proteínas, montando uma série de respostas que ajudam a proteger o corpo como um todo. Essas respostas sistêmicas incluem o desenvolvimento de febre, neutrofilia, letargia e emaciação muscular, e são mediadas principalmente por três citocinas derivadas dos macrófagos: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (TIZARD, 2002). Na infecção experimental pelo *T. evansi*, o estudo realizado por Paim et al. (2011) já demonstrou o papel das citocinas na regulação da resposta imune frente à infecção.

As citocinas, como, por exemplo, IL-1, IL-6 e TNF- α , e outras quimiocinas são secretadas nos sítios inflamatórios, induzindo mudanças nas células endoteliais vasculares, na cinética dos leucócitos e no crescimento de células da linhagem mielocítica monocítica da medula óssea (TIZARD, 2002). IL-1 e TNF- α estimulam a expressão da E-selectina, ICAM-1 e VCAM nas células endoteliais, que são proteínas responsáveis pela adesão e diapedese neutrófila (ABBAS et al., 2012). Além disso, a IL-1 é responsável pela liberação de neutrófilos da medula óssea para a circulação, o que promove uma neutrofilia (TIZARD, 2002). Em algumas espécies acometidas pela tripanossomose, tais como equinos e felinos, mudanças como a neutrofilia podem ser observadas no leucograma (MARQUES et al., 2000; DA SILVA et al., 2009; DA SILVA et al., 2010a). Porém, mesmo com a alta produção de citocinas, as mudanças como leucocitose por neutrofilia não são prevalentes, podendo alguns animais acometidos apresentarem quadros de leucopenia por neutropenia (AQUINO et al., 2002) ou até mesmo não trazer mudanças quanto ao leucograma (DE LA RUE et al., 2000).

Além disso, tais citocinas são simultaneamente responsáveis pelo aumento na síntese e secreção de proteínas de fase aguda (PFA) (ECKERSALL, 2008). 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 de novas proteínas. Assim, a IL-1 modula a síntese de proteínas no hepatócito, inibindo a produção de proteínas de fase aguda negativa (albumina e transferrina) e estimulando a produção de proteínas de fase aguda positiva (proteína C-reativa, soro amilóide 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, 2008). Muitas das PFA atuam nas defesas do hospedeiro e são

importantes componentes do sistema imune. As principais PFA variam conforme a espécie animal, como demonstrada na tabela 1.

Tabela 1 – Proteínas de fase aguda (PFA) principais e secundárias em diferentes espécies animais.

| Espécie animal | PFA principais | PFA secundárias |
|----------------|--|---|
| Coelhos | Proteína C-reativa | |
| Cães | Proteína C-reativa, soro amiloide A | Haptoglobina, α -1 glicoproteína ácida, componentes do sistema complemento |
| Gatos | Soro amiloide A | α -1 glicoproteína ácida, haptoglobina |
| Bovinos | Haptoglobina, soro amiloide A | α -1 glicoproteína ácida |
| Equinos | Soro amiloide A | Haptoglobina |
| Suínos | Proteína C-reativa, proteína de fase aguda principal | Haptoglobina, componentes do sistema complemento |
| Ratos | α_2 -macroglobulina | Haptoglobina, α -1 glicoproteína ácida |

Adaptado de Eckersall (2008) e Kaneko et al. (1997).

Como principais funções, as PFA atuam, de uma forma geral, nas defesas do organismo contra processos patológicos e na restauração na homeostase. Embora as PFA apresentem ações individuais diversificadas, algumas proteínas podem ser agrupadas como PFA de atividades antiproteases, como a α -1 antitripsina e α_2 -macroglobulina, que inibem a ação de proteases liberadas pelos fagócitos e outras células do sistema imune, minimizando os danos aos tecidos normais. Um segundo grupo de PFA, tais como haptoglobina, soro amiloide A e proteína C-reativa, apresentam um papel de limpeza ou remoção, através da ligação com metabólitos gerados da degradação celular, que poderiam servir como substrato para o crescimento de microrganismos. Por fim, um terceiro grupo de PFA apresenta ação bactericida e habilidade de influenciar no curso da resposta imune, como por exemplo proteína C-reativa, α -1 glicoproteína ácida e soro amiloide A (ECKERSALL, 2008).

Essa terceira característica, em algumas espécies, pode promover uma proteção natural contra alguns tipos de protozoários. Nos seres humanos, a presença de uma lipoproteína, denominada de apolipoproteína-L1 (Apo-L1), desempenha um papel crucial na proteção natural contra o *T. evansi*. A ação lítica dessa lipoproteína está relacionada com a

haptoglobina ligada à proteína (Hpr), que promove ligação do complexo lítico em receptores de haptoglobina-hemoglobina dos tripanossomas, facilitando a internalização da Apo-L1 (PAYS; VANHOLLEBEKE, 2009). Nos coelhos, Uche e Jones (1993) observaram a importância do sistema complemento na modulação da resposta mediada por anticorpos contra o *T. evansi*. Nesse estudo, foi promovida uma depleção do sistema complemento em um dos grupos de coelhos infectados experimentalmente pelo *T. evansi*. O grupo desafiado, em que o sistema complemento permaneceu ativo, apresentou uma resposta maior de anticorpos do que os animais que apresentavam depleção desse sistema. Assim, pôde-se comprovar a importância da imunidade inata na estimulação e ativação dos linfócitos B.

A regulação do processo inflamatório pode ser realizada por estímulo vagal eferente, através de uma via denominada de colinérgica anti-inflamatória. Essa via é regulada principalmente pela liberação de um neurotransmissor denominado Acetilcolina (ACh) (PAVLOV; TRACEY, 2005). A ACh é um mediador químico encontrado nas sinapses do sistema nervoso central (SNC), do sistema nervoso periférico (SNP) e também das junções neuromusculares (BRUNEAU; AKAABOUNE, 2006). A colina-O-Acetil-Transferase (ChAT) é a enzima responsável pela síntese da ACh a partir de acetil-coenzima A e colina. A glicerofosforilcolina, a fosforilcolina e a fosfatidilcolina geram a colina, que é utilizada como substrato e transportada para o SNC através da circulação sanguínea. Assim, as fontes de colina para a síntese de ACh provêm da circulação, além da sua recaptação após a liberação e degradação desse neurotransmissor (VENTURA et al., 2010).

Uma vez sintetizada, parte da ACh é transportada e armazenada em vesículas sinápticas. Esse processo é realizado por um transportador vesicular de ACh (VChT), capaz de elevar em até 100 vezes sua concentração no interior dessas vesículas. Após ser liberada inteiramente por exocitose, a ACh interage especificamente com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré e pós-sinápticas (TAYLOR; BROWN, 1999; FUJII et al., 2008). A ação da ACh cessa quando é hidrolisada em acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (AChE), presente na fenda sináptica.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma colinesterase específica, que hidrolisa principalmente ésteres de acetilcolina (ACh) e apresenta altos níveis no tecido nervoso e nas hemácias (SOREQ; SEIDMAN, 2001; DAS, 2007). Já a butirilcolinesterase (BChE) é uma colinesterase não específica, denominada de pseudocolinesterase, que catalisa a hidrólise de outros ésteres como os de succinilcolina e butirilcolina, bem como os de ACh (ÇOKUĞRAŞ, 2003; DARVESH et al., 2003). A AChE e, em menor grau, a BChE tem a função de

hidrolisar a ACh, ligada aos receptores pós-sinápticos, para regular a concentração do transmissor na sinapse nervosa (SOREQ; SEIDMAN, 2001).

Como anteriormente citado, além da regulação neuromuscular, a ACh, tem papel importante em atenuar o processo inflamatório, através da modulação na liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-18 (IL-18), de macrófagos ativados previamente por endotoxinas, sem afetar a produção de interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória (Figura 4) (PAVLOV; TRACEY, 2005). Essa inibição acontece devido à ligação da ACh em receptores nicotínicos $\alpha 7$, presentes na superfície dos macrófagos (ULLOA, 2005).

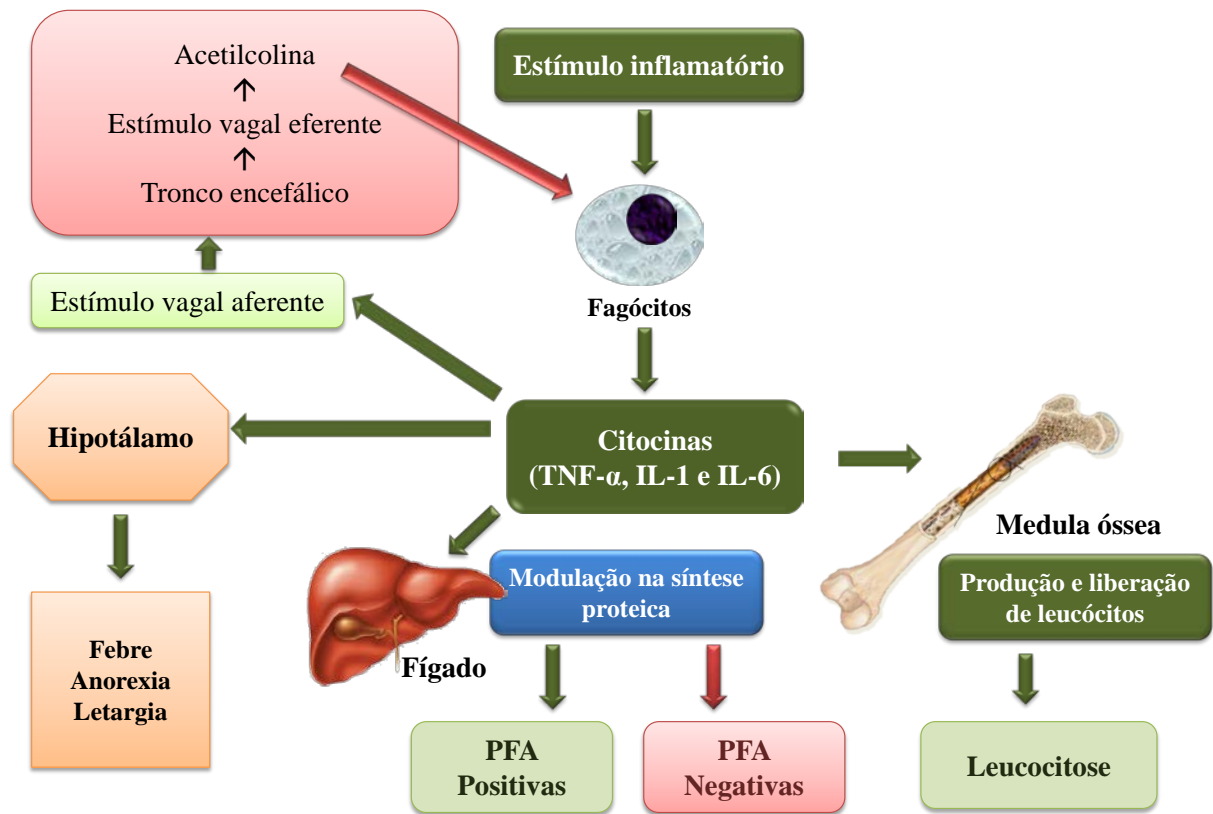


Figura 4 – Resumo do mecanismo de reação de fase aguda, demonstrando o papel do sistema colinérgico na modulação da resposta de fagócitos na produção de citocinas. Setas verdes indicam efeito estimulatório; setas vermelhas indicam efeito inibitório. Adaptado de Paltrinieri (2008).

Assim, devido ao importante papel da ACh na supressão do processo inflamatório, investigar as colinesterases que regulam a sua concentração podem dar pistas, mesmo que de forma indireta, dos níveis de acetilcolina e, conseqüentemente, ambas as colinesterases podem servir como marcadores de processos inflamatórios sistêmicos (DAS, 2007).

Em algumas espécies animais, a habilidade do sistema imunológico em controlar a infecção pelo *T. evansi* de forma natural, sem o auxílio de fármacos tripanocidas é conhecida como tripanotolerância. O termo tripanotolerância é muito atribuído aos bovinos das raças *Bos taurus*, particularmente raças como N'Dama e West African Shortorn, localizadas nas regiões centrais e do oeste da África (MURRAY et al., 2004). Essas raças de animais têm a habilidade de limitar, de forma efetiva, a parasitemia, controlando a anemia e mantendo o peso corporal. Tais características trazem benefícios aos produtores locais, uma vez que a criação dessas raças em locais endêmicos para o *Trypanosoma congolense* (*T. congolense*) tornou-se uma opção sustentável à produção pecuária de 19 países das regiões central e oeste da África (MURRAY et al., 2004; MEADE et al., 2009). Os processos imunológicos e fisiológicos responsáveis pela capacidade de tripanotolerância nessas raças ainda permanecem pouco compreendidos, contudo, sabe-se que fatores imunogenéticos podem estar relacionados com as características de resistência aos flagelados nessas raças (MEADE et al., 2009). Estudos com bovinos *Bos taurus* da raça N'Dama (resistentes) e *Bos indicus* da raça Boran (susceptíveis) têm sido realizados para se descobrir os mecanismos responsáveis pelo fenômeno da tripanotolerância.

Através de pesquisas com animais gêmeos quimeras hematopoiéticas, compostos de um animal resistente e um animal susceptível em cogestação, e estudos promovendo a supressão de células T, foi possível observar que a tripanotolerância é composta de duas características independentes (NAESSENS, 2006). A primeira é uma melhor capacidade para controlar a parasitemia, visto que o mecanismo não é mediado por células hematopoiéticas, linfócitos T ou anticorpos. A segunda, por sua vez, é uma melhor capacidade de limitar o desenvolvimento de anemia, que é mediado por células hematopoiéticas, mas não por linfócitos T ou anticorpos (NAESSENS, 2006). O estudo do ganho de peso desses animais foi relacionado a esse último mecanismo, podendo sugerir que o controle da anemia é mais importante para a sobrevivência e produtividade do que o controle do parasita (NAESSENS, 2006).

A tripanotolerância não é observada com frequência em espécies afetadas pelo *T. evansi*. Contudo, pode-se sugerir que os coelhos são uma espécie animal que apresenta características tripanotolerantes à infecção por *T. evansi*, devido à resposta encontrada pelos estudos de Da Silva et al. (2008a; 2008b) que observaram redução total na parasitemia, seguido de cura clínica e retorno dos valores hematológicos aos níveis normais com 120 dias pós-infecção. Os resultados encontrados por Da Silva et al. (2008a; 2008b) são semelhantes aos descritos por Uche et al. (1992), que selecionaram e compararam coelhos tolerantes com

susceptíveis e observaram uma maior produção de IgG nos animais resistentes ao *T. evansi*, quando comparados aos animais susceptíveis. Porém, ainda não foram descritos o modo pelo qual outros aspectos imunitários comportam-se nessa espécie, tais como a imunidade inata e o sistema colinérgico, e a forma pela qual essas vias da inflamação influenciam a tripanotolerância de coelhos. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo investigar a resposta inflamatória e a via anti-inflamatória colinérgica e sua relação na tripanotolerância em coelhos infectados experimentalmente pelo *T. evansi*.

2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados desta tese estão sob a forma de dois artigos científicos. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se nos artigos.

2.1 Artigo 1

Cholinesterase as inflammatory markers in a experimental infection by *Trypanosoma evansi* in rabbits

Márcio M. Costa, Aleksandro S. da Silva, Francine C. Paim, Raqueli, França, Guilherme L. Dornelles, Gustavo R. Thomé, Jonas D.S. Serres, Roberta Schmatz, Rosélia M. Spanevello, Jamile F. Gonçalves, Maria Rosa C. Schetinger, Cinthia M.A. Mazzanti, Sonia T.A. Lopes,
Silvia G. Monteiro

Artigo publicado no periódico *Anais da Academia Brasileira de Ciências*

Cholinesterase as inflammatory markers in a experimental infection by *Trypanosoma evansi* in rabbits

Márcio M. Costa^{1,2}, Aleksandro S. da Silva², Francine C. Paim¹, Raqueli França¹,
Guilherme L. Dornelles¹, Gustavo R. Thomé³, Jonas D.S. Serres³, Roberta Schmatz³, Rosélia
M. Spanevello³, Jamile F. Gonçalves³, Maria Rosa C. Schetinger³, Cinthia M.A. Mazzanti¹,
Sonia T.A. Lopes¹, Silvia G. Monteiro²

¹Laboratório de Análises Clínicas Veterinária- LACVet, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima nº 1000 - Cidade Universitária - Bairro Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

²Laboratório de Microbiologia e Parasitologia - LAPAVET, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima nº 1000 - Cidade Universitária - Bairro Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

³Departamento de Química, Av. Roraima nº 1000 - Cidade Universitária - Bairro Camobi, 97105-900, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, inflamação, *T. evansi*.

T. evansi in rabbits: cholinesterase activity

Correspondence to: Márcio Machado Costa

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: marmcvet@yahoo.com.br

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the role of cholinesterases as an inflammatory marker in acute and chronic infection by *Trypanosoma evansi* in rabbits experimentally infected. Twelve adult female New Zealand rabbits were used and divided into two groups with 6 animals each: control group (rabbits 1-6) and infected group (rabbits 7-12). Infected group received intraperitoneally 0.5 mL of blood from a rat containing 10^8 parasites per animal. Blood samples used for cholinesterases evaluation were collected on days 0, 2, 7, 12, 27, 42, 57, 87, 102 and 118 days post-inoculation (PI). Increased activity ($P < 0.05$) of butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) were observed in the blood on days 7 and 27, respectively and no differences were observed in cholinesterase activity in other periods. No significant difference in AChE activity ($P > 0.05$) was observed in the encephalic structures. The increased activities of AChE and BChE probably have a pro-inflammatory purpose, attempting to reduce the concentration of acetylcholine, a neurotransmitter which has an anti-inflammatory property. Therefore, cholinesterase may be inflammatory markers in infection with *T. evansi* in rabbits.

Keywords: Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, inflammation, *T. evansi*.

INTRODUCTION

Cholinesterases are enzymes present in cholinergic and non-cholinergic tissues, as well as in plasma and other body fluids. This group of enzymes is divided into two distinct categories, according to their substrate-specific, behavior in the presence of excess substrate and susceptibility to inhibitors (Çokuğraş, 2003). The acetylcholinesterase (AChE) is a specific cholinesterase, which hydrolyzes esters of mainly acetylcholine (ACh) and has high levels in nervous tissue and in erythrocytes (Soreq and Seidman, 2001; Das, 2007). Butyrylcholinesterase (BChE) is a non-specific cholinesterase, called pseudocholinesterase, which catalyzes the hydrolysis of other esters such as succinylcholine and butyrylcholine, as well as ACh (Çokugras, 2003; Darvesh et al., 2003). The AChE mainly, but also the BChE, have the function of hydrolyzing ACh linked to post-synaptic receptors to regulate the concentration of transmitter in the nerve synapse (Soreq and Seidman, 2001).

The autonomic nervous system plays an important role in controlling the immune response, in terms of regular, partially, the release of pro-inflammatory cytokines, through the secretion of adrenaline and noradrenaline, and connection of these receptors α and β androgenic in the immune cells (Pavlov and Tracey, 2005). In contrast, the vagal efferent pathway plays an important role in modulating inflammation and was called cholinergic anti-inflammatory pathway (Borovikova et al., 2000; Pavlov and Tracey, 2005).

The ACh, the principal neurotransmitter in vagal, has an important role in attenuating the release of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-18 (IL-18), activated macrophage previously by endotoxin, without affecting the production of interleukin-10 (IL-10), an anti-inflammatory cytokine (Pavlov and Tracey, 2005). This inhibition is due to binding of ACh at $\alpha 7$ subunit-containing nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChE) present on macrophages, being the

dose-dependent inhibition (Ulloa, 2005). Thus, given the important role of ACh in the suppression of inflammation, investigate of cholinesterases that regulate the concentration of ACh can be useful, even indirectly; the levels of ACh are measured.

The trypanosomiasis are diseases that affect different species of animals such as camels, horses, cattle, goats, pigs, dogs, elephants, capybaras, coatis, tapirs, deer and wild rodents (Silva et al. 2002). Among these diseases, there is the "Surra" as it is called in India, which is caused by *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), a digenetic protozoan section salivate, which is mechanically transmitted by flies of the genus *Tabanus* and *Stomoxis* (Brun et al., 1998; Taylor and Authié, 2004). In Brazil, trypanosomiasis affects mainly horses, being called as "Mal das cadeiras" due to locomotor and neurological symptoms presented by infected animals (paralysis of hind limbs), resulting in incoordination (Herrera et al., 2004).

Among the affected animals, camels, horses, buffaloes and dogs have the most severe form of the disease, unlike of cattle and pigs which are moderately affected or asymptomatic (Taylor and Authié, 2004). The acute phase of the disease mainly affects young animals and pregnant females (Taylor and Authié, 2004) and progresses to death within weeks or months (Brun et al., 1998). On the other hand, the chronic stage is more frequent in endemic areas of disease (Taylor and Authié, 2004) and affected animals can remain infected for many years (Brun et al., 1998). In equine trypanosomiasis presents a chronic phase with clinical signs of progressive weight loss, fever, anemia, edema of limbs and lower portions of the body, incoordination and instability of the hind limbs and atrophy of muscle mass (Silva et al., 1995; Conrado et al., 2005; Rodrigues et al., 2005). In other animals such as rabbits, trypanosomiasis also has a chronic course, studying with anorexia, apathy, pale mucous membranes and edema of eyelids and ears. These animals show irregular peaks of parasitemia for long periods (Da Silva et al., 2009). Thus, these animals are good models for chronic

infections due to low peak of parasitemia and long time of infection, as occurs in cases of natural infection.

Since these animals have low peak parasitemia, and both AChE and BChE to serve as possible markers of low-grade systemic inflammation in diseases (Das, 2007), it is interesting to investigate in detail the inflammatory characteristics of cholinesterases in infection with *T. evansi*. Therefore, the objective of this study is to evaluate the role of cholinesterase as inflammatory markers in acute and chronic phase of *T. evansi* infection, using rabbits as an experimental model.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

Twelve adult female rabbits New Zealand, weighing between 3.6 to 4.5 kg were used in this study. The animals were kept in individual cages with controlled temperature and humidity (23°C and 70% U.R.), fed with commercial ration and water *ad libitum*. All animals received a single dose (5mg/kg, orally) of a commercial product containing pyrantel pamoate, praziquantel, and fenbendazole 30 days before beginning the experiment. Hematological (erythrogram, leukogram and platelet count) and biochemical (hepatic and renal function) examinations were performed twice with 15-day intervals. After 30 days (day 0 of the experiment), the evaluated patterns showed normal values (Campbell, 2007).

The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria, number 23081.020268/2008-76, in accordance to Brazilian laws and ethical principles published by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

TRYPANOSOME INFECTION

T. evansi was originally isolated from a naturally infected dog (Colpo et al., 2005). First, a rat was intraperitoneally infected with blood cryopreserved in liquid nitrogen containing 10^6 parasites. This procedure was performed to obtain large amount parasites for posterior inoculation.

Rabbits were divided into two groups with 6 animals each, a control group (rabbits 1-6) and an infected group (rabbits 7-12). Infected group were intraperitoneally inoculated with 0.5 mL of rat blood containing 10^8 trypanosomes (Day 1). Control group received physiological solution by the same route. The number of inoculated flagellates was estimated by Neubauer chamber (Wolkmer et al., 2007).

ESTIMATION OF PARASITEMIA

Parasitemia was estimated daily during 118 days of infection through microscopic examination of smears. Each slide was mounted with blood collected from the ear vein, stained by the panoptic method, and visualized at a magnification of $\times 1,000$.

BLOOD SAMPLING AND ENCEPHALIC TISSUE

The experimental period reached 118 days. Blood sampling for hematology and evaluation of cholinesterases were carried out on days 0, 2, 7, 12, 27, 42, 57, 87, 102 and 118 days post-inoculation (PI), by cardiac puncture using 5 mL disposable syringes and 25x7 needles, stored in tubes with anticoagulant. For this procedure all animals were anesthetized with ketamine (1 mg/Kg) and xylazine (0.8 mg/Kg), as recommended by the ethics committee. Blood with anticoagulant were diluted in a lytic buffer, proportion of 1:50 (v/v), to evaluate the activity of AChE. One mL of blood without anticoagulant was centrifuged for 10 minutes at 3,400 rpm, and serum separated and stored frozen at -20°C for analysis of BChE activity.

For hematological evaluation 1 mL of blood with anticoagulant (EDTA 10%) was collected by cardiac puncture on days 0, 5, 20, 35, 50, 65, 80, 95 and 118. At 118 days PI, euthanasia of all animals were performed with the same anesthetic protocol for sedation, however with doses tripled (ketamine: 30mg/Kg and xylazine: 4mg/Kg), as recommended by Taborda et al. (2004). Encephalons were removed, followed by separation of structures such as cerebellum, cerebral cortex, striatum and hippocampus, with each structure individually weighed and stored in a buffer Tris-HCl (10 mmol, pH 7.2, 160 mmol sucrose). Later, encephalic structures were homogenized with a sonicator, followed by centrifugation and separation of the supernatant and frozen (-20°C), to posterior evaluation of cholinesterases.

DETERMINATION OF AChE ACTIVITY IN BLOOD AND ENCEPHALON

The AChE enzyme assay in total blood was determined by the method of Ellman et al. (1961), modified by Worek et al. (1999). The specific activity of AChE in blood was calculated from the quotient between AChE activity and hemoglobin content, with results expressed in mU/L mol Hb. The enzyme assay of AChE in encephalon was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961) as described by Rocha et al. (1993). All readings were performed in triplicate and the enzyme activity was expressed in mumoles AcSCh/h/mg of protein.

DETERMINATION OF BChE ACTIVITY IN SERUM

The methodology used to assess the AChE activity was also used for determination of BChE activity in serum, except for the acetylcholine substrate which was replaced by butyrylthiocholine. Results were expressed in μ moles BcSCh/h/mg of protein.

DETERMINATION OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS

Hematologic parameters were evaluated merely to monitor the disease in rabbits infected with *T. evansi*. Hematocrit, total leukocytes and differential leukocyte were performed. The white blood cells counts were carried out in an automatic counter Mindray BC 2800 Vet®. Determination of hematocrit was obtained from microhematocrit centrifuge in rotation 19720G, and the differential count was performed on blood smears, stained with Panoptic method®, using light microscopy.

STATISTICAL ANALYSIS

By presenting normal distribution (Kolmogorov Smirnov), the data were subjected to *t* test for independent samples. Data were considered significantly different with a probability (P) less than 5%.

RESULTS

PARASITEMIA AND CLINICAL COURSE OF INFECTION

Examination of the peripheral blood smears showed a prepatency period between 24 and 72 hours in the infected rabbits. Irregular waves of parasitemia, ranging from zero to one trypomastigote per microscopic field, were observed until 35 days PI. Parasites were no longer observed in blood smears from the 37th day onwards (Figure 1).

Clinical signs as hyporexia, fever and weight loss (8.7%) were observed during the first 30 days PI in all infected rabbits (acute phase and peak of parasitemia). Edema of the eyelids, ears and vulva was observed in all infected animals at determined periods of the experiment. This clinical signs disappeared in a few moments, reappearing after a period that

varied among individuals. At days 60, 90 and 118 PI the infected rabbits increased its weights. Non-infected rabbits showed no clinical changes and increased its weights throughout the study.

HEMATOCRIT

Rabbits infected with *T. evansi* did not present anemia. However, a significant reduction of hematocrit was observed 5 ($P < 0.01$) and 65 ($P < 0.05$) days PI, when compared to the control group. During the other days of evaluation this change was not observed (Figure 2A).

TOTAL LEUKOCYTES AND LYMPHOCYTES

Significant difference in total white cell count were not observed between the groups ($P > 0.05$). However, lymphocytes number were reduced in infected animals on days 20, 65, 80 and 95 PI ($P < 0.05$) when compared to the non-infected (Figure 2B).

ACTIVITY OF AChE IN BLOOD AND ENCEPHALIC STRUCTURES

An increase in AChE activity on day 27 PI (Figure 3A) was observed. During the other days significant differences in enzyme activity were not detected. No significant difference in AChE activity ($P > 0.05$) was observed in the brain structures, as shown in Figure 3C.

ACTIVITY OF BChE IN SERUM

A significant increase ($P < 0.05$) on BChE activity was observed on day 7 PI (Figure 3B). During other days the enzyme activity did not show statistical difference when compared to the control group.

DISCUSSION

In animals infected, occurred a prepatent period shorter than that observed by Da Silva et al. (2008a), which used male rabbits, aged between two to six months. Also, irregular peaks of parasitemia were observed during the experiment, with *T. evansi* in the bloodstream until the 35th day PI. In rabbits analyzed by Da Silva et al. (2008a), the parasitemia remained for 89 days, with total absence of trypomastigotes from that time on. These differences, into the same species, are mainly due to the mean age of animals, since animals tested by Da Silva et al. (2008a) were infected during its development phases, unlike the animals tested in this study, which were adult. A similar response to this study was found in coati experimentally infected with *T. evansi* that showed parasitemia until the first month PI, with subsequent decrease and absence of parasites in some periods (Herrera et al., 2001).

In this study, during the initial stage of the disease, clinical signs were observed such as appetite loss, fever and weight loss. These findings are similar to those found in cats (Da Silva et al., 2010), rabbits (Da Silva et al., 2009), dogs (Aquino et al, 1999; Colpo et al., 2005) and coatis (Herrera et al., 2001) experimentally or naturally infected with *T. evansi*. However, the presence of facial edema and vulva edema were the findings that persisted until euthanasia of animals, swinging during the experimental period. It was also observed in rabbits infected by Da Silva et al. (2009), however, after 90 days, the animals showed clinical improvement with disappearance of clinical signs, feature not observed in this study. Thus, animals in this

study had a persistent and chronic infection, with absence of trypomastigotes in the bloodstream.

To the hematocrit, only at 5th and 65th days PI it was possible to observe a significant reduction. In the remaining days, the hematocrit of infected animals had small variations, but significant differences were not observed when compared to the control group, differing of results found by Da Silva et al. (2008b), which demonstrated a hematocrit reduction in rabbits experimentally infected with *T. evansi*, which returned to normal levels after 60 days PI. However, in a *T. evansi* outbreak in horses reported by Zanette et al. (2008), the animals did not show anemia, even with clinical signs of swinging gait and incoordination of the hind limbs, which agrees with the study in question, since the rabbits showed such clinical signs and absence of anemia.

Infection with *T. evansi* promoted increase in BChE activity only on the seventh day PI. These results are different from those found by Da Silva et al. (2010) and Wolkmer et al. (2010), as, in both studies, there was a reduction in BChE activity in cats and rats infected with *T. evansi*, respectively. Although in different stages of disease, both studies found similar results, with reduction of BChE assigned by Wolkmer et al. (2010) to liver damage, because the liver is the principal organ of synthesis of plasma BChE (Chatonnet and Lockridge, 1989) or the assigned to inflammatory process. The period in which BChE activity increased is classified as acute infection by *T. evansi*, and it is characterized by peak parasitemia, fever, appetite loss. Within this period, the macrophage plays a crucial role in the production of an efficient immune response against African trypanosomes. This cell is responsible for the initial production of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) and nitric oxide (NO) (Stijlemans et al., 2007). Thus, BChE could be involved in activation of macrophages, as it has nicotinic receptors for acetylcholine. Acetylcholine when linked to these receptor, produces a dose-dependent inhibition in cytokine production (Ulloa, 2005).

Therefore, it is suggested that the increase in BChE is related to hydrolysis of acetylcholine by reducing its levels and preventing its suppressive action.

On the other hand, the increased activity of AChE in blood was only on the 27th day PI, within the chronic phase of infection, which differs from other studies involving *T. evansi*. Wolkmer et al. (2010) found blood AChE activity reduced in rats infected with *T. evansi* on the 3th and 5th days PI. However, Da Silva et al. (2010) found a reduction in blood AChE activity of cats experimentally infected with *T. evansi* on days 28th and 56th PI, associated with a reduction in brain activity of AChE. The results in these two studies were directly associated with neurological signs presented in both species (rats and cats), which were not observed in this study, since the rabbits did not show neurological abnormalities such as incoordination of hind limbs, and limb muscle atrophy. The absence of neurological findings is confirmed, whereas there was no significant statistical difference between the encephalic structures analyzed in this study, when compared with the control group. In a recent study Da Silva et al. (2011a) observed increase of AChE activity in brains of rats infected with *T. evansi*, concomitantly with neurological signs, demonstrating that rabbits has a different response to infection with *T. evansi*.

Activity increased of AChE at this period may be related to a reduced number of lymphocytes in the 20th day PI, since acetylcholine acts directly on the regulation of immune activity. On lymphocytes surface, there are nicotinic and muscarinic receptors for acetylcholine, which regulates its cellular activity. Recent studies have demonstrated the presence of nicotinic receptors in lymphocytes from mice, rats, rabbits and humans. Nicotinic receptors, through the binding with acetylcholine, play the function of suppression of the immune response in T lymphocytes (Kawashima and Fujii, 2003). Thus, the increase of AChE could reduce the ACh for nicotinic receptors, enhancing the immune activity of T lymphocytes, promoting a improved response for cytokine production and regulation of

parasitemia. Its may compensate the reduction in the total number of lymphocytes. This hypothesis can be explained since from the 37th day the presence of parasite in the bloodstream was no longer observed. Besides, a recent study from our research group, reached a positive correlation between increased numbers of lymphocytes and activation of AChE in lymphocytes of rats infected with *T. evansi* (Da Silva et al., 2011b). In this study, the increase of cholinesterase activity was expected throughout the chronic phase of infection, but this enzymatic activation did not occur, despite the clinical signs presented. Possibly, due the control of parasitemia, mainly by IgG and IgM, as described by Uche et al. (1992), there are no needs of a permanent cellular immune response, which could reduce the levels of AChE close to the normality.

Thus, it is concluded that cholinesterases may have pro-inflammatory actions during the infection by *T. evansi* in rabbits, regulating the concentrations of ACh, which is a potent anti-inflammatory mediator. These findings demonstrate the role of rabbits as tolerant to *T. evansi*, reinforcing the idea that this animal plays an important function as reservoirs of the parasite.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Counsel of Technological and Scientific Development - CNPq) and “Universal – CNPq” for the financial support.

RESUMO

O objetivo do presente estudo é avaliar o papel das colinesterases como marcadores inflamatórios nas fases aguda e crônica da infecção por *T. evansi* em coelhos infectados experimentalmente. Foram utilizados 12 coelhos adultos, fêmeas, da raça Nova Zelândia,

divididos em dois grupos, um grupo controle, com seis animais (coelhos 1-6), e um grupo infectado, com seis animais (coelhos 7-12). Os animais pertencentes ao grupo infectados receberam, pela via intraperitoneal, 0,5 mL de sangue de rato contendo 10^8 tripanossomas por animal. Amostras do sangue utilizado para avaliação das colinesterases foram coletadas nos dias 0, 2, 7, 12, 27, 42, 57, 87, 102 e 118 pós-inoculação (PI). Aumento ($P < 0,05$) na atividade da butirilcolinesterase (BChE) e da acetilcolinesterase foi observado no sangue nos dias 7 e 27 (PI), respectivamente e não foram observadas diferenças na atividade da colinesterase em outros períodos. Nenhuma diferença significativa na atividade da AChE ($P > 0,05$) foi observada nas estruturas encefálicas. O aumento de atividade da AChE e BChE provavelmente tenha finalidade pró-inflamatória, a fim de reduzir as concentrações de acetilcolina, neurotransmissor que apresenta propriedade anti-inflamatória. Portanto, as colinesterases podem ser marcadores inflamatórios na infecção por *T. evansi* em coelhos.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, inflamação, *T. evansi*.

REFERENCES

- Aquino LP, Machado RZ, Alessi AC, Marques LC, De Castro MB and Malheiros EB. 1999. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz 94: 255-260.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW and Tracey KJ. 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature 405: 458-62.
- Brun R, Hecker H and Lun ZR. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). Vet Parasitol 79: 95-107.

- Campbell TW. 2007. Hematologia de mamíferos: Animais de laboratório e espécies variadas. In: Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, Denicola D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A and Weiser G. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. Roca: São Paulo, p. 201-214.
- Chatonnet A and Lockridge O. 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 260: 625-634.
- Colpo CB, Monteiro SG, Stainki DR, Colpo ET and Henriques GB. 2005. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. *Ciênc Rural* 35: 717-719.
- Conrado AC, Lopes STA, Oliveira LSS, Monteiro SG, Vargas DLB and Bueno A. 2005. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do Rio Grande do Sul. *Ciênc Rural* 35: 928-931.
- Çokuğraş AN. 2003. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem* 28: 54-61.
- Da Silva AS, Costa MM, Doyle RL, Lopes STA and Monteiro SG, 2008a. Infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em coelhos. *Ciênc Anim Bras* 9: 519-523.
- Da Silva AS, Costa MM, Lopes STA and Monteiro SG. 2008b. Alterações hematológicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi*. *Ciênc Rural* 38: 538-542.
- Da Silva AS, Pereira PL and Monteiro SG. 2009. Achados patológicos, sinais clínicos e ganho de peso de coelhos infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi*. *Semina Ciênc Agrar* 30: 93-98.
- Da Silva AS, Spanevello R, Stefanello N, Wolkmer P, Costa MM, Zanette RA, Lopes ST, Santurio JM, Schetinger MR and Monteiro SG. 2010. Influence of *Trypanosoma evansi* in blood, plasma, and brain cholinesterase of experimentally infected cats. *Res Vet Sci* 88: 281-284.

- Da Silva AS et al. 2011a. Acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and spinal cord of rats infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol* 175: 237-244.
- Da Silva AS et al. 2011b. *Trypanosoma evansi*: immune response and acetylcholinesterase activity in lymphocytes from infected rats. *Exp Parasitol* 127: 475-480.
- Darvesh S, Hopkins DA and Geula C. 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 4: 131-138.
- Das UN. 2007. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 13: 214-221.
- Ellman GL, Coutney KO, Andres V and Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- Herrera HM, Aquino LP, Menezes RF, Marques LC, Moraes MA, Werther K and Machado RZ. 2001. *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. *Vet Parasitol*. 102: 209-216.
- Herrera HM, Dávila AM, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'andrea PS and Jansen AM. 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in pantanal, Brasil. *Vet Parasitol* 125: 263-275.
- Kawashima K and Fujii T. 2003. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci* 74: 675-696.
- Pavlov VA and Tracey KJ. 2005. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun* 19: 493-499.
- Rocha JBT, Emanuelli T and Pereira ME. 1993. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 53: 431-437.
- Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AN, Soares MP, Milano J and Barros CSL. 2005. Surto de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do

- Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e parasitológicos. *Pesq Vet Bras* 25: 239-249.
- Silva RA, Arosemena NA, Herrera HM, Sahib CA and Ferreira MS. 1995. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal mato-grossense, Brazil. *Vet Parasitol* 60: 167-71.
- Silva RAMS, Seidl A, Ramirez L and Dávila AMR. 2002. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – biologia, diagnóstico e controle. Corumba: Embrapa Pantanal, 141 p.
- Soreq H and Seidman S. 2001. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2: 294-302.
- Stijlemans B, Guilliams M, Raes G, Beschin A, Magez S and De Baetselier P. 2007. African trypanosomosis: from immune escape and immunopathology to immune intervention. *Vet Parasitol* 148: 3-13.
- Taborda C, Mehnert DU, Silva CA. 2004. Manual de Normas Técnicas: biotério de experimentação animal do Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas – USP, 24 p.
- Taylor K and Authié EML. 2004. Pathogenesis of animal trypanosomiasis. In: Maudlin I, Holmes PH and Miles M.A. *The Trypanosomiases*. London: CABI publishing, p. 331-354.
- Uche UE, Jones TW and Boid R. 1992. Antibody patterns in rabbits showing different levels of susceptibility to an experimental *Trypanosoma evansi* infection. *Acta Trop* 52: 139-147.
- Ulloa L. 2005. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat Rev Drug Discov* 4: 673-684.
- Wolkmer P, Silva AS, Carnelutti JF, Costa MM, Traesel C, Lopes STA and Monteiro SG. 2007. Resposta eritropoética de ratos em diferentes de graus de parasitemia por

Trypanosoma evansi. Ciênc Rural 37: 1682–1687.

Wolkmer P, Lopes ST, Franciscato C, Da Silva AS, Traesel CK, Siqueira LC, Pereira ME, Monteiro SG and Mazzanti CM. 2010. *Trypanosoma evansi*: cholinesterase activity in acutely infected Wistar rats. Exp Parasitol 125: 251-255.

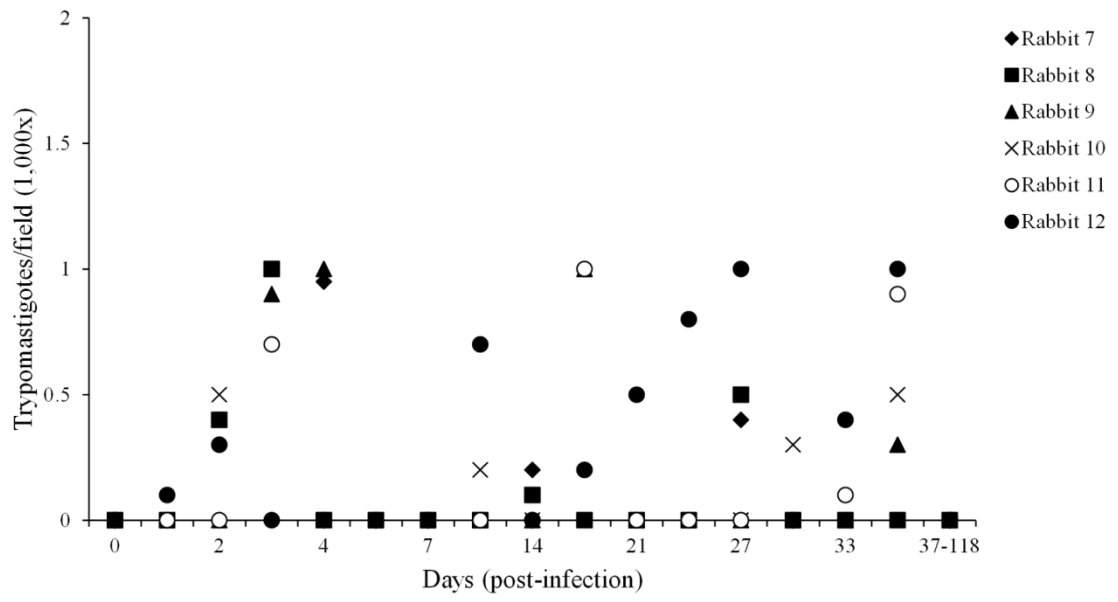
Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C and Eyer P. 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. Clin Chim Acta. 288: 73-90.

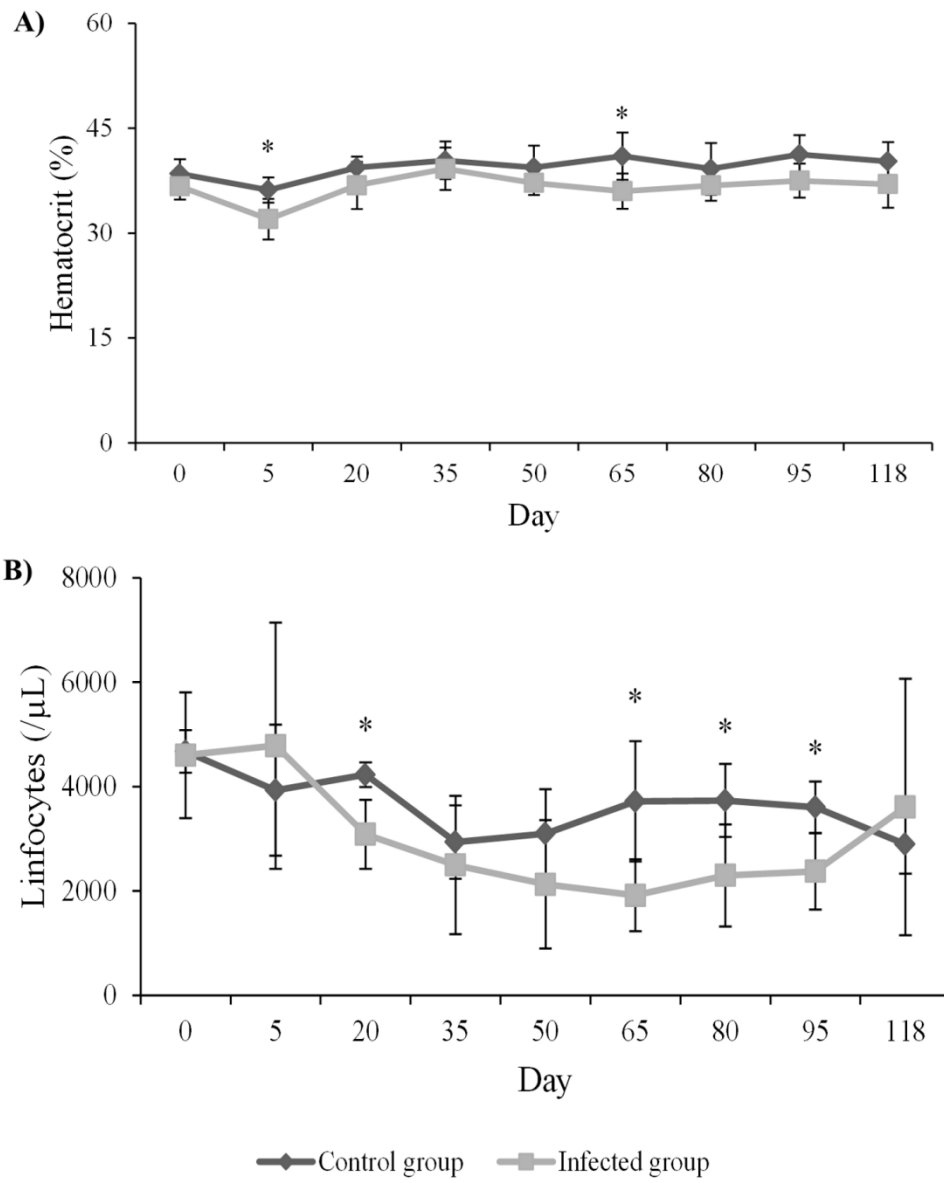
Zanette RA, Da Silva AS, Costa MM, Monteiro, SG, Santurio JM and Lopes STA. 2008. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em equinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. Ciênc Rural 38: 1468-1471.

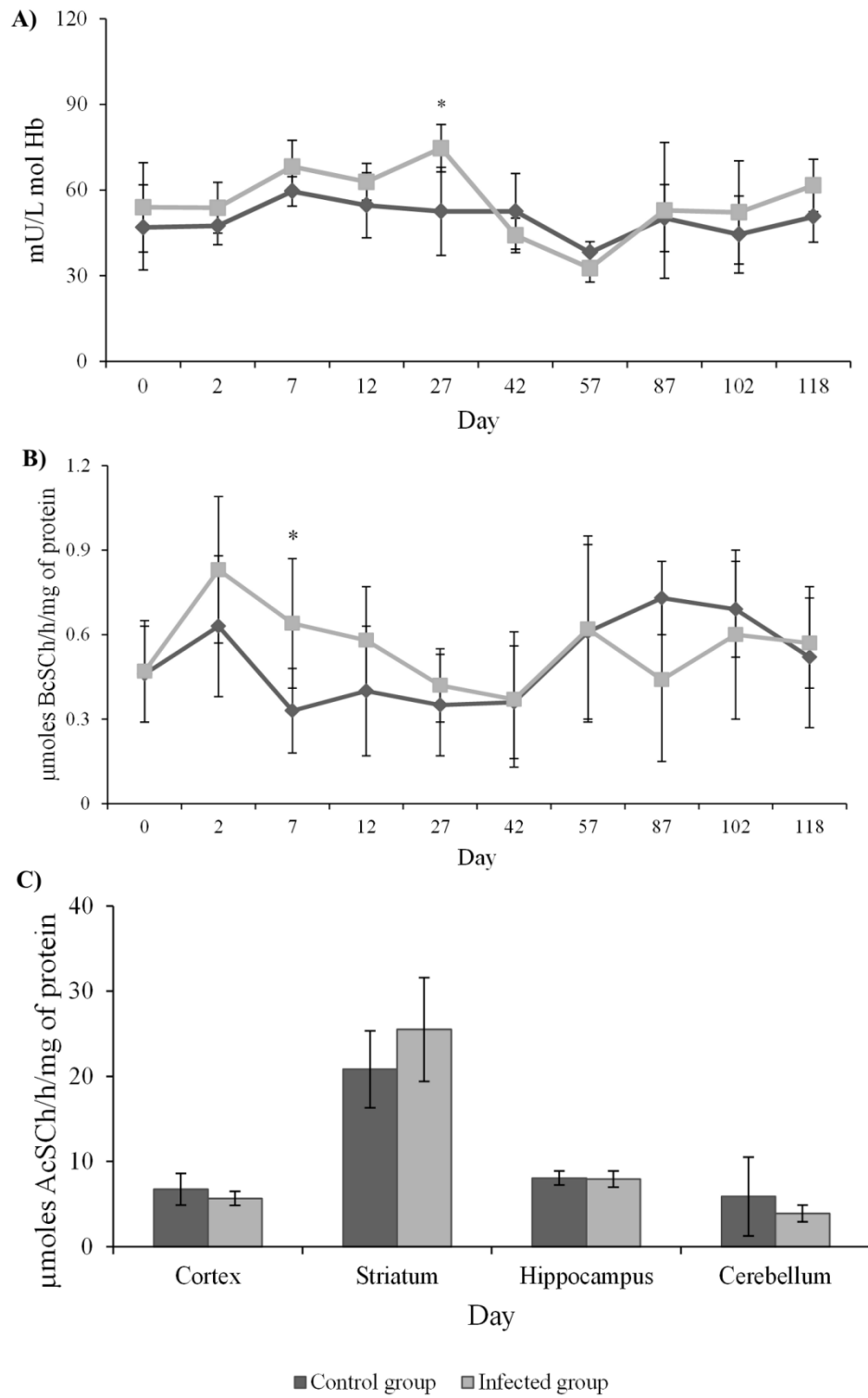
Figure 1. Parasitemia of *T. evansi* in infected rabbits along the 118 days post-infection

Figure 2. Influences of the infection by *T. evansi* on hematological parameters of rabbits experimentally infected: **A)** hematocrit and **B)** lymphocytes. * indicates statistical difference between infected and control group (*Independent samples T test $P < 0.05$).

Figure 3. **A)** Acetylcholinesterase activity in blood; **B)** butyrylcholinesterase activity in serum; and **C)** acetylcholinesterase in encephalic structures of rabbits experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. * indicates statistical difference between infected and control group (*Independent samples T test $P < 0.05$).







2.2 Artigo 2

Role of acute phase proteins in the immune response of rabbits infected with *Trypanosoma evansi*

Márcio Machado Costa, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Raqueli Teresinha França, Aleksandro Schafer da Silva, Francine Chimelo Paim, Heloisa Einloft Palma, Roberto Marinho Maciel, Guilherme Lopes Dornelles, Maria Isabel de Azevedo, Alexandre Alberto Tonin, Janio Morais Santurio, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Silvia Gonzalez Monteiro

Artigo aceito no periódico *Research in Veterinary Science*

Role of acute phase proteins in the immune response of rabbits infected with
Trypanosoma evansi

Márcio Machado Costa^{a,b,*}, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes^b, Raqueli Teresinha França^b,
Aleksandro Schafer da Silva^c, Francine Chimelo Paim^b, Heloisa Einloft Palma^b, Roberto
Marinho Maciel^b, Guilherme Lopes Dornelles^b, Maria Isabel de Azevedo^a, Alexandre Alberto
Tonin^b, Janio Morais Santurio^a, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^d, Silvia Gonzalez
Monteiro^a

^aDepartment of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa
Maria - RS, Brazil

^bDepartment of Small Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS,
Brazil

^cDepartment of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil

^dDepartment of Health Sciences, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria – RS, Brazil

*Corresponding author: Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM. Faixa de
Camobi - Km 9, Campus Universitário, Santa Maria – RS, Brasil. Laboratório de
Parasitologia Veterinária, Sala 4232, 97105-900. Fone: +55 55 3220-8958

E-mail address: marmevet@mail.ufsm.br (M.M. Costa)

**Role of acute phase proteins in the immune response of rabbits infected with
*Trypanosoma evansi***

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the response of acute phase proteins (APP) in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), and to relate the findings with serum immunoglobulins levels, in order to verify the relation between APP and the immune response of rabbits. A total of 12 animals were used in this experiment and divided into 2 groups, control and infected, of six rabbits each. The experimental period was 118 days, and blood was collected on days 0, 5, 20, 35, 65, 95 and 118 post-infection (PI). The infection with *T. evansi* stimulated APP and immunoglobulins production, once the infected animals showed an increase in C-reactive protein, haptoglobin, alpha 2-macroglobulin and IgM levels. The elevation in IgM levels observed in this study, when related to the increase in C-reactive protein and haptoglobin levels, suggests the involvement of these proteins in host defense against flagellated protozoa, with possible participation in the control of the parasitemia in rabbits infected with *T. evansi*.

Keywords: C-reactive protein, Haptoglobin, IgM, IgG, α_2 -Macroglobulin, *T. evansi*, Protein electrophoresis.

1. Introduction

Trypanosomosis is a worldwide disease and in Brazil is known as “mal das cadeiras” due to the clinical signs observed in infected animals. Horses are the most affected species in Pantanal Matogrossense region (Brazil) and the most common presentation that characterizes the disease is incoordination of the hind limbs (Herrera et al., 2004; Silva et al., 1995; Silva et al., 2002). The disease is caused by a protozoan, *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), and in rabbits, the clinical signs are similar to those observed in other species, such as weight loss and anemia (Da Silva et al., 2008b; Uche et al., 1992), hyperproteinemia due to hypergammaglobulinemia, and increased alanine aminotransferase and alkaline phosphatase activities (Da Silva et al., 2007). Therefore, rabbits are a good experimental model to study this disease.

Previous studies demonstrated that rabbits may be resistant to the parasite infection (Da Silva et al., 2008a; Uche et al., 1992), which is attributed mainly to immunoglobulins IgG, IgM and IgA (Uche et al., 1993). However, Uche and Jones (1993), related the importance of innate immunity modulating the response mediated by antibodies. In this study, the complement system was depleted in one group of infected rabbits with *T. evansi*. The challenged group, with the complement system active, revealed a more effective response by antibodies than the animals who presented depletion of the system (Uche and Jones, 1993).

Beyond the complement system, there are other proteins, named acute phase proteins (APP) that also assist in the body's defense. APP are released predominant by the liver, as a result of the action of cytokines (IL-1, TNF- α and IL-6) on hepatocytes (Paltrinieri, 2007; Tizard, 2002). These proteins are important components of the immune system, and are involved in the restoration of homeostasis and reduction of microbial growth, before the animals develop acquired immunity (Murata et al., 2004).

It is still not well defined how these proteins are related to the innate and specific response against *T. evansi*, as well as which proteins are involved in this response. Thereby, the aim of this study was to determine the response of APP in rabbits experimentally infected with *T. evansi*, evaluating total proteins and its fractions, measuring four acute phase proteins, in addition to immunoglobulins IgM and IgG, correlating the results of the APP levels with immunoglobulins, to verify the importance of APP on the immune response of rabbits.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twelve female adult New Zealand rabbits, weighing 3.6–4.5 Kg were used in this study. The animals were maintained in individual cages, at a constant temperature and humidity (23 °C and 70%, respectively), with free access to food and water. All these rabbits were treated with a combination of anthelmintics pyrantel pamoate, praziquantel and febantel, and were submitted to an adaptation period of 30 days. During this period, hematological (CBC) and biochemical (hepatic and renal function) exams were performed with an interval of 15 days, in order to verify the health status of the animals. In both time points, the rabbits presented hematological and biochemical values within the normal range (Campbell, 2007).

The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of University Federal de Santa Maria, number 23081.020268/2008-76, in accordance to Brazilian laws and ethical principles published by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

2.2. Experimental groups and T. evansi infection

Healthy rabbits were divided into two groups, control and infected, with six animals each. They were inoculated intraperitoneally with 0.5mL of rat blood containing 1×10^8 trypanosomes per animal, and the control group received saline solution alone by the same route. The *T. evansi* strain used in this study was isolated from a naturally infected dog (Colpo

et al., 2005), and the quantification of the injected dose was undertaken using a Neubauer chamber (Wolkmer et al., 2007).

2.3. Estimation of parasitemia

After inoculation, the parasitemia was monitored daily by microscopic examination of blood smears. The peripheral blood was obtained from the ear vein, stained with Panotic® kit and examined under microscope at 1000x magnification.

2.4. Blood sampling

The experimental period was 118 days. The blood samples were collected at days 0, 5, 20, 35, 65, 95 and 118 post-infection (PI), by cardiac puncture using a 5 mL syringe and a 25 x 7 needle, and stored without anticoagulant. For this procedure the rabbits were anesthetized with ketamine (30 mg/Kg) and xylazine (4 mg/Kg) via intramuscular injection. After collection, the blood was rested for 30 min to allow clot retraction, and then centrifuged at 3.400 rpm for 10 min to obtain the serum, which was separated and stored in microtubes at -20 °C until assayed. After 118 days PI, animals were euthanized using the same protocol described earlier, but the doses were tripled, as recommended by Taborda et al. (2004).

2.5. Determination of total proteins and protein fractionation by electrophoresis

Total proteins were determined using commercial reagents (Labtest®) and analyzed in an automatic biochemical analyzer (Bioplus®200). The protein fractionation was determined using cellulose acetate strip electrophoresis in a horizontal cube (Labex®), with Tris–glycine buffer (pH 8.6), adapted by technical of Naoum (1999). Samples were applied to the strips and run using a constant voltage of 180 volts for 25 min. Strips were stained with Ponceau for 15 min. The excess stain was removed by washing the strips in 5% acetic acid until background was completely clear. Then strips were fixed in methanol for 30 s and washed for

1 min with a destain solution. Strips were dried at 60 °C for 15 min and read by the Denscan system. The fractions analyzed were the albumin, alpha-1, alpha-2, beta-1, beta-2 and gamma globulin.

2.6. Determination of immunoglobulins IgM and IgG

Immunoglobulins IgM and IgG were determined using ELISA commercial kits (Quantitation Set®) according to the manufacturer's instructions. Sera were processed at a dilution of 1:3600 and were compared with the results obtained in the calibrator curve ($R^2 > 0.93$). Each sample was performed in triplicate.

2.7. Determination of acute phase proteins (APP)

The choice of APP described in this study was based on research conducted by Kostro et al. (2003), who describes C-reactive proteins, haptoglobin, alpha-2-macroglobulin and transferrin as the major acute phase proteins in rabbits. Also APP were determined using ELISA commercial kits (Kamiya Biomedical Company®), according to the manufacturer's instructions.

2.8. Statistical analysis

As data presented normal distribution, proven by the Kolmogorov Smirnov test, they were submitted to t Student test for comparison between groups. Pearson correlation test was performed to assess the correlation between APP and immunoglobulins. Data were considered significantly different at $P < 0.05$. All statistical analysis were performed with SPSS® program version 17.0.

3. Results

3.1. Parasitemia

Examination of the peripheral blood smears showed a prepatency period between 24 and 72 h in the infected rabbits. Irregular waves of parasitemia, ranging from zero to one trypomastigote per microscopic field, were observed during 35 days PI. Parasites were no longer observed in blood smears from the 37th day onwards [published data in the study of Costa et al. (2012), that is related to this study].

3.2. Total protein and protein electrophoresis

In infected group, total protein levels increased from day 20 PI (Fig. 1A) until day 118 PI, the last day of experiment. Protein electrophoresis revealed hypoalbuminemia in the infected group only at day 5 PI (Fig. 1B). Alpha-1 globulin fraction increased from day 65 PI (Fig. 1C) and high values of alpha-2 globulin fraction ($P < 0.05$) were observed at days 35, 65, 95, and 118 PI (Fig. 1D), accompanied of an increase in beta-1 globulin fraction ($P < 0.01$), that presented higher levels until day 95 PI, when compared to control group (Fig. 1E). Both fractions, beta-2 globulin and gamma globulin, were elevated from the fifth day of infection (Fig. 1F). Beta-2 globulin levels remained higher in the infected group than in control group until day 65 PI, and gamma globulin fraction until day 118 PI (Fig. 1G).

3.3. Immunoglobulins

A significant increase in IgG levels was observed only at day 20 PI in infected group, when compared to control group (Fig. 2A). Infected rabbit presented elevated IgM levels ($P < 0.01$) from day 20 PI until the last day of the experiment period (Fig. 2B).

3.4. Acute phase proteins

A significant increase in C-reactive protein levels in the infected group was observed from the fifth day PI, remaining elevated until day 118 PI (Fig. 3A). Furthermore, an increase in haptoglobin concentration was observed from day 20 until day 65 PI (Fig. 3B). Also,

rabbits infected with *T. evansi* revealed a significant increase ($P < 0.05$) in alpha-2-macroglobulin levels at days 20 and 118 PI (Fig. 3C). No significant alteration ($P > 0.05$) was observed in transferrin concentration from infected group, when compared to control group (Fig. 3D).

3.5. Correlation between APP and immunoglobulins

A positive correlation ($P < 0.01$) was observed between IgM and C-reactive protein ($r = 0.542$), and between IgM and haptoglobin ($r = 0.531$). No other correlations were observed between the other data evaluated in this study ($P > 0.05$) (Fig. 4A and B).

4. Discussion

A prepatent period was observed between 24 and 72 h post infection in infected rabbits, different from that observed by Da Silva et al. (2008a), where the animals presented a prepatent period of six days PI. After this period, irregular peaks of parasitemia were observed until day 35 PI. However, from day 37 PI, parasites were no longer observed in the blood smear. These data differ from those observed by Da Silva et al. (2008a), probably because the infection protocol used by Da Silva et al. (2008a) (infectious dose of 1×10^6 trypomastigotes per animal) was different from that used in this study, which may justify the differences found in parasitemia. A similar response to this study was observed in coatis (*Nasua nasua*) experimentally infected with *T. evansi*, since they exhibited parasitemia during the first month post infection, with posterior decrease and absence of parasitemia in some periods (Herrera et al., 2001).

There was an increase in total protein from infected animals from day 20 PI, these results are in accordance with those reported by other authors who have studied this disease in rabbits and also in other species (Aquino et al., 2002; Ben Romdhane et al., 1999; Boid et al., 1980; Costa et al., 2010; Da Silva et al., 2007). As observed in this and other studies, the

increase of total proteins is related to the increase of globulins. (Aquino et al., 2002; Costa et al., 2010; Herrera et al., 2002).

Serum albumin concentration was only reduced on the fifth day PI, and then returned to basal levels, contrary to what was expected in this experiment, once that prolonged decrease of albumin levels had previously been described in acute phase reactions caused by *T. evansi* (Costa et al., 2010; Herrera et al., 2002; Hosseininejad et al., 2007). The mechanism responsible to cause the reduction in albumin levels is mediated by the direct effect of cytokines (TNF- α , IL-1 and IL-6) on hepatocytes, which modulate protein synthesis, resulting in a decreased production of albumin and transferrin and increased APP synthesis, such as haptoglobin, C-reactive protein and other (Eckersall, 2008). The return of albumin concentration to normal levels in healthy rabbits was described by Da Silva et al. (2007), who noted normalization of the levels from day 40 PI, but the causes for this still remain unknown.

An increase in the alpha-1 globulin fraction was observed from day 65 post infection, and remained high until day 118. This result differs from other studies in which there was no increase in this alpha-1 globulin level or there was a reduction of proteins that are part of this fraction (Ben Romdhane et al., 1999; Boid et al., 1980; Costa et al., 2010; Teixeira et al., 2008). The increase observed in the alpha-1 globulin fraction might be caused by the increase of alpha-1-acid glycoprotein, once it presents immunomodulatory and anti-inflammatory properties, responsible for regulating the neutrophil response, inhibiting platelet aggregation and lymphocyte proliferation (Paltrinieri, 2008). The increase of this fraction observed in chronic phase of the disease is probably related to an anti-inflammatory action that plays a role in the immunological response of the host.

Also, there was an increase in the alpha-2 globulin fraction from infected group from 20 days PI onwards. This result is consistent with a study performed by Costa et al. (2010), where the increase of this fraction was observed from day 5 PI and remained high until the

end of the experiment (118 days PI). The increase in this fraction is related to APP, such as haptoglobin, alpha-2-macroglobulin and serum amyloid A. The first two proteins were determined in this study and both were elevated during the experiment.

Increased levels of haptoglobin were observed in infected rabbits from day 20 until day 65 PI. Haptoglobin plays an important role in the removal of free hemoglobin, as this substance becomes pro-oxidant in tissues (Murata et al., 2004). Thus, haptoglobin may enhance antioxidant defenses in tissues (Eckersall, 2008; Lim et al., 1998). Its increase was observed in infections caused by other trypanosomes, as in the study by Ngure et al. (2009), who observed an increase in haptoglobin and serum amyloid P of mice infected with *T. brucei brucei*. Alpha-2 macroglobulin levels were increased only at days 20 and 118 PI, and remained close to normal levels in the remainder of the study. It is known that this protein plays an important role in lymphocyte modulation, causing proliferation of B cells and increasing the migration of macrophages and neutrophils (James, 1990). Thus, the specific increase in this fraction may be related to evasion of *T. evansi* from the central nervous system and return to the peripheral circulation (Kaminsky and Brun, 1998), which could stimulate the production of these proteins during these periods.

The infected group showed an increase in beta-1 fraction on days 35, 65 and 95 PI. However, in other studies it was observed a decrease in total beta fraction or in beta-1 fraction of animals naturally or experimentally infected with *T. evansi* (Hosseininejad et al., 2007; Monzón and Villavicencio, 1990). The decrease in this fraction is explained by the presence of transferrin, a negative APP that is present in low levels during inflammatory or infectious processes (Eckersall, 2008). It was not observed in this study a decrease in transferrin concentration during the whole experimental period. Not only transferrin, but other proteins are part of this fraction; ferritin and hemopexin are positive APP that may be increased during

inflammatory and/or infectious processes, which can explain the results found in this study (Eckersall, 2008).

Beta-2 fraction was significantly higher in infected group at days 5, 20, 35 and 65 PI, when compared with control group, which corroborates the results related by Franciscato et al. (2007) and Costa et al. (2010), who observed, respectively, an increase in total beta globulin values of a naturally infected dog and cats experimentally infected with *T. evansi*. Controversially, Hosseininejad et al. (2007) observed a decrease in beta-2 fraction in naturally infected dogs, differently from the results found in this study.

Total Beta globulin fraction is composed by positive APP, such as C3 and C4 complement components, C-reactive protein and fibrinogen, which are present in plasma (Eckersall, 2008). C3 component of the complement system presents the highest concentration levels in serum and it is of fundamental importance, since it is the main activator of the complement cascade (Tizard, 2002). Uche and Jones (1993) reported the importance of the complement system in the immune response against the agent, once the depletion of C3 component can determine the course of the infection and the response of the animal to a second exposure to the same pathogen. Thus, due to the significant importance of the complement in immune response to *T. evansi* infections, the increase in beta-2 fraction may be caused by a higher activity of this system.

In this study, it was observed an increased concentration of C-reactive protein in infected group from the fifth day PI until day 118. This protein is an APP that presents a rapid rise, and high levels are evident even before a detection of increased rectal temperature, during infectious processes (Petersen et al., 2004). The main function of this protein is opsonization of the pathogen by activating the classical complement pathway and modulation of the action of monocytes and macrophages (Eckersall, 2008; Petersen et al., 2004). An increase of C-reactive protein levels has previously been observed during diseases caused by

other protozoa, such as infections caused by *Babesia canis* (Matijatko et al., 2007) and *Leishmania infantum* in dogs (Martinez-Subiela et al., 2002). Thereby, it is possible to presume that C-reactive protein may be related to the increase in beta-2 fraction; however, as the increase of C-reactive proteins extended until the last day of the experiment (118 days) and beta-2 fraction increased only until day 65 PI, it is assumed that the decrease of this fraction probably was caused by other proteins instead of C-reactive protein.

Gamma globulin fraction from infected group increased from the fifth day PI and remained elevated until the last day of the experiment. This fraction is composed by the immunoglobulins IgM, IgG, IgA, IgE and IgD, produced exclusively by lymphoid tissues, without an hepatic involvement (Eckersall, 2008). Increased gamma globulin fraction is described in camels, guinea pigs, horses, dogs, and cats infected with *T. evansi* (Boyd et al., 1980; Costa et al., 2010; Hosseinijad et al., 2007; Monzón and Villavicencio, 1990).

The polyclonal gammopathies are characterized by increased gamma fraction, with a large area peak in the electrophoretic curve due to the production of heterogeneous immunoglobulins. Polyclonal gammopathies are usually a consequence of a chronic infection or prolonged presence of a foreign substance in the body (Lassen, 2007). In *T. evansi* infections, high levels of IgM are often observed in infected animals (Taylor and Authié, 2004), what was confirmed in this study from day 20 PI until day 118 PI. Considering IgG levels, there was an increase only at day 20 PI, and remained at the basal levels at the subsequent days. Even with these results diverging from those found by Uche et al. (1992), who reported the protective function of IgG in rabbits infected with *T. evansi*, it is known that IgM plays important role in survival and controlling parasitemia of infected rats (Baral et al., 2007), which might explain the permanent increase of this immunoglobulin observed in this experiment.

The Pearson test showed correlation between IgM and C-reactive protein, and between IgM and haptoglobin. The positive correlation suggests a possible synergism between both proteins and IgM, which can be explained by Coutinho et al. (1998), who found a possible role for C-reactive protein in infections caused by *T. cruzi*, once an antigenic molecule related to C-reactive protein is present on the surface of the parasite, causing an inhibitory effect on invasion of the cardiac muscle cells by *T. cruzi*. The positive relationship between the resistance of animals and increased APP has been documented in other studies. Shapiro and Black (1992) found higher concentrations of haptoglobin in mice resistant to infection caused by *T. brucei*, when compared to susceptible mice. Likewise, different researches report that optimal trypanolytic activity results from the simultaneous presence of apolipoprotein L1 (ApoL1) and haptoglobin-related protein (Hpr) on the same high-density lipoprotein (HDL) particles (Pays and Vanhollebeke, 2008; Vanhollebeke et al., 2008). Furthermore, the bacteriostatic action of haptoglobin was well documented by Delanghe et al. (1998), who related an inhibitory effect of haptoglobin on the growth of *Streptococcus pyogenes* in vitro. In addition, Meade et al. (2009) observed that animals resistant to *T. congolense* may have elevated levels of SAA protein and may represent the key feature of the trypanotolerance in N'Dama cattle.

Thereby, infection caused by *T. evansi* stimulated the production of proteins, observed by elevation of the electrophoretic fractions, except for albumin. This rise was caused by increased APP and immunoglobulins levels, once the infected animals presented increased concentrations of C-reactive protein, haptoglobin, alpha-2 macroglobulin and IgM. The increase in IgM, related to the increase of C-reactive protein and haptoglobin levels, suggests that these proteins are directly involved in host defense against the parasite, and, possibly, participate in controlling parasitemia of rabbits infected with *T. evansi*.

Acknowledgments

The authors would like to thank "National Counsel of Technological and Scientific Development" (CNPq) and "Universal – CNPq" for the financial support.

References

- Aquino, L.P.C.T., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Santana, A.E., Castro, M.B., Marques, L.C., Malheiros, E.B., 2002. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 54, 8-18.
- 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. *The Journal of Infectious Diseases* 195, 1513-1520.
- Ben Romdhane, S., Jemli, M., Romdane, M., Landolsi, R., Kaabachi, N., Feki, M., M'Bazaa, A., 1999. Électrophorèse des protéines sériques chez Le dromadaire en Tunisie: application à La trypanosomose à *Trypanosoma evansi*. *Revue de Médecine Vétérinaire* 150, 951-956.
- Boid, R., Luckins, A., Rae, P., Gray, A., Mahmoud, M., Malik, K., 1980. Serum immunoglobulin levels and electrophoretic patterns of serum proteins in camels infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology* 6, 333-345.
- Campbell, T.W., 2007. Hematologia de mamíferos: Animais de laboratório e espécies variadas, In: Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A., Weiser, G. (Eds.) *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. Roca, São Paulo, pp. 201-214.
- Colpo, C.B., Monteiro, S.G., Stainki, D.R., Colpo, E.T.B., Henriques, G.B., 2005. Infecção natural por *Trypanosoma evansi*. *Ciência Rural* 35, 717-719.

- Costa, M.M., da Silva, A.S., Wolkmer, P., Zanette, R.A., Franca, R.T., Monteiro, S.G., dos Anjos Lopes, S.T., 2010. Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Preventive Veterinary Medicine* 95, 301-304.
- Costa, M.M., Silva, A.S., Paim, F.C., França, R., Dornelles, G.L., Thomé, G.R., Serres, J.D.S., Schmatz, R., Spanevello, R.M., Gonçalves, J.F., 2012. Cholinesterase as inflammatory markers in a experimental infection by *Trypanosoma evansi* in rabbits. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84, 1105-1113.
- Coutinho, C.M.M., Cavalcanti, G.H., Bonaldo, M.C., Mortensen, R.F., Araujo-Jorge, T.C., 1998. *Trypanosoma cruzi*: detection of a surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein. *Experimental Parasitology* 90, 143-153.
- Da Silva, A.S., Costa, M.M., Cargnelutti, J.F., Lopes, S.T., Monteiro, S.G., 2007. Biochemical changes in rabbits experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 16, 43.
- Da Silva, A.S., Costa, M.M., Doyle, R.L., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2008a. Infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em coelhos. *Ciência Animal Brasileira* 9, 519-523.
- Da Silva, A.S., Costa, M.M., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2008b. Alterações hematológicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi*. *Ciência Rural* 38, 538-542.
- Delanghe, J., Langlois, M., Ouyang, J., Claeys, G., De Buyzere, M., Wuyts, B., 1998. Effect of haptoglobin phenotypes on growth of *Streptococcus pyogenes*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 36, 691-696.
- Eckersall, P.D., 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias, In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, San Diego, pp. 117-148.

- Franciscato, C., Lopes, S.T.A., Teixeira, M.M.G., Monteiro, S.G., Garmatz, B.C., Paim, C.B., 2007. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. *Ciência Rural* 37, 288-291.
- Herrera, H.M., Alessi, A.C., Marques, L.C., Santana, A.E., Aquino, L.P., Menezes, R.F., Moraes, M.A., Machado, R.Z., 2002. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. *Acta Tropica* 81, 203-210.
- Herrera, H.M., Aquino, L.P., Menezes, R.F., Marques, L.C., Moraes, M.A., Werther, K., Machado, R.Z., 2001. *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. *Veterinary Parasitology* 102, 209-216.
- Herrera, H.M., Davila, A.M., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., D'Andrea, P.S., Jansen, A.M., 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Veterinary Parasitology* 125, 263-275.
- Hosseininejad, M., Shirani, D., Nabian, S., Nassiri, S.M., Mazaheri, R., 2007. *Trypanosoma evansi* in three dogs in Iran. *Comparative Clinical Pathology* 16, 69-71.
- James, K., 1990. Interactions between cytokines and [alpha] 2-macroglobulin. *Immunology Today* 11, 163-166.
- Kaminsky, R., Brun, R., 1998. In vitro and in vivo activities of trybazine hydrochloride against various pathogenic trypanosome species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 2858-2862.
- Kostro, K., Wojcicka-Lorenowicz, K., Glinski, Z., 2003. Acute phase proteins in rabbits. *Medycyna Weterynaryjna* 59, 864-867.
- Lassen, E.D., 2007. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo, In: Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen,

- E.D., Rebar, A., Weiser, G. (Eds.) Hematologia e bioquímica clínica veterinária. Roca, São Paulo, pp. 376-387.
- Lim, S.K., Kim, H., bin Ali, A., Lim, Y.K., Wang, Y., Chong, S.M., Costantini, F., Baumman, H., 1998. Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. *Blood* 92, 1870-1877.
- Martinez-Subiela, S., Tecles, F., Eckersall, P.D., Ceron, J.J., 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *The Veterinary Record* 150, 241-244.
- Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., Romic, Z., Simec, Z., Ceron, J.J., 2007. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology* 144, 242-250.
- Meade, K.G., O’Gorman, G.M., Hill, E.W., Narciandi, F., Agaba, M., Kemp, S.J., O’Farrelly, C., MacHugh, D.E., 2009. Divergent antimicrobial peptide (AMP) and acute phase protein (APP) responses to *Trypanosoma congolense* infection in trypanotolerant and trypanosusceptible cattle. *Molecular Immunology* 47, 196-204.
- Monzón, C.M., Villavicencio, V.I., 1990. Serum proteins in guinea-pigs and horses infected with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). *Veterinary Parasitology* 36, 295-301.
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 168, 28-40.
- Naoum, P.C. (Ed.), 1999. Eletroforese – técnicas e diagnóstico, 2 Edition. Santos, São Paulo, 154 pp.
- Ngure, R., Burke, J., Eckersall, P., Jennings, F., Mbai, F., Murray, M., 2009. Secondary bacterial infection in plasma endotoxin levels and the acute-phase response of mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasite Immunology* 31, 357-365.
- Paltrinieri, S., 2007. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins. *Veterinary Research Communications* 31, 125-129.

- Paltrinieri, S., 2008. The feline acute phase reaction. *The Veterinary Journal* 177, 26-35.
- Pays, E., Vanhollebeke, B., 2008. Mutual self-defence: the trypanolytic factor story. *Microbes and Infection* 10, 985-989.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187.
- Shapiro, S.Z., Black, S., 1992. Identification of an acute-phase reactant in murine infections with *Trypanosoma brucei*. *Infection and Immunity* 60, 3921-3924.
- Silva, R.A.M.S., Arosemena, N.A.E., Herrera, H.M., Sahib, C.A., Ferreira, M.S.J., 1995. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Matogrossense, Brazil. *Veterinary Parasitology* 60, 167-171.
- Silva, R.A.M.S., Seidl, A., Ramirez, L., Dávila, A.M.R., 2002. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – biologia, diagnóstico e controle. Embrapa Pantanal, Corumbá, 141 pp.
- Taborda, C., Mehnert, D.U., Silva, C.A., 2004. Manual de Normas Técnicas: biotério de experimentação animal do Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas – USP. July 07, 2012. <<http://eventos.uece.br/siseventos/processaEvento/evento/downloadArquivo.jsf;jsessionid=9fe449be11a08ff8961aae0bb231.eventoss1?id=12&diretorio=documentos&nomeArquivo=12-28022011-105938.pdf&contexto=animalab3>>
- Taylor, K., Authié, E.M.L., 2004. Pathogenesis of animal trypanosomiasis, In: Maudlin, I., Holmes, P.H., Miles, M.A. (Eds.) *The Trypanosomiases*. CABI publishing, London, pp. 331-354.
- Teixeira, M., Marques, L., Cadioli, F., Fagliari, J., Machado, R., Silva, P., 2008. Proteinogramas séricos de ratos Wistar experimentalmente infectados com

- Trypanosoma evansi*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 60, 1447-1453.
- Tizard, I.R. (Ed.), 2002. Imunologia Veterinária: uma introdução. Roca, São Paulo, 532 pp.
- Uche, U.E., Jones, T.W., 1993. Effect of complement (C3) depletion on the generation of memory in rabbits primed with antigens of *Trypanosoma evansi*. Veterinary Parasitology 47, 205-213.
- Uche, U.E., Jones, T.W., Boid, R., 1992. Antibody patterns in rabbits showing different levels of susceptibility to an experimental *Trypanosoma evansi* infection. Acta Tropica 52, 139-147.
- Uche, U.E., Jones, T.W., Boid, R., 1993. Class-specific antibody response in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. Tropical Medicine and Parasitology 44, 27-31.
- Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M.J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S.K., Pays, E., 2008. A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. Science Signalling 320, 677-681.
- Wolkmer, P., Da Silva, A.S., Cargnelutti, J.F., Costa, M.M., Traesel, C.K., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2007. Resposta eritropoética de ratos em diferentes graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. Ciência Rural 37, 1682-1687.

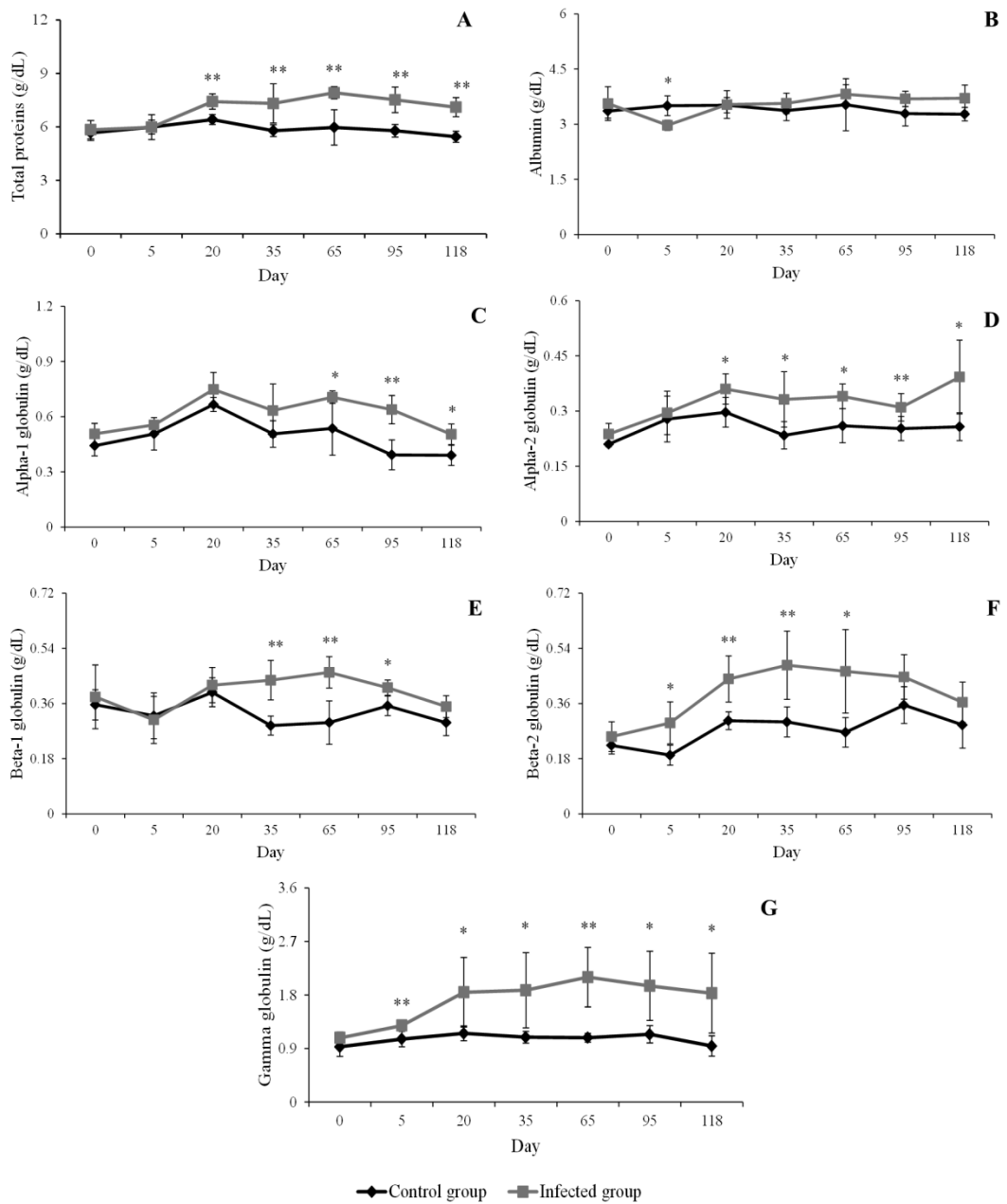


Fig. 1. Serum protein concentrations in rabbits experimentally infected with *T. evansi*: Total proteins (A), albumin (B) alpha-1 globulin (C), alpha-2 globulin (D), beta-1 globulin (E) beta-2 globulin (F) and gamma globulin (G). * or ** indicate statistical difference between groups (independent *t* test - * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

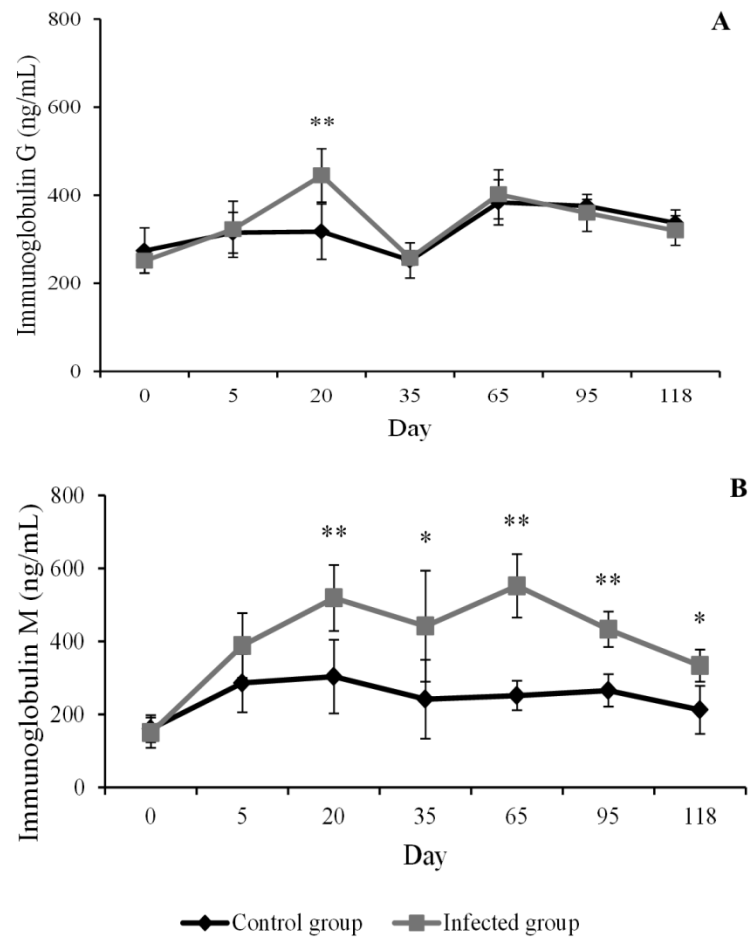


Fig. 2. Immunoglobulins levels in rabbits experimentally infected with *T. evansi*: (A) IgG and (B) IgM. * or ** indicate statistical difference between groups (independent *t* test - * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

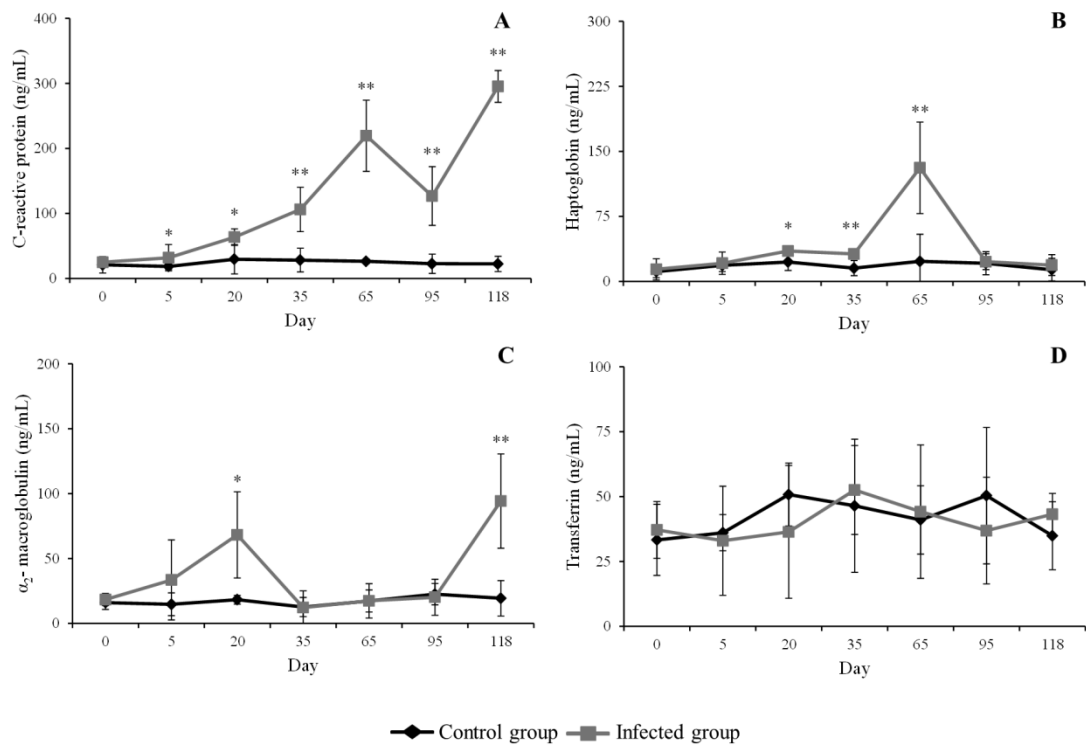


Fig. 3. Acute phase proteins of rabbits experimentally infected with *T. evansi*: (A) C-reactive protein, (B) Haptoglobin, (C) α_2 -macroglobulin, and (D) transferrin. * or ** indicate statistical difference between groups (independent *t* test - * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

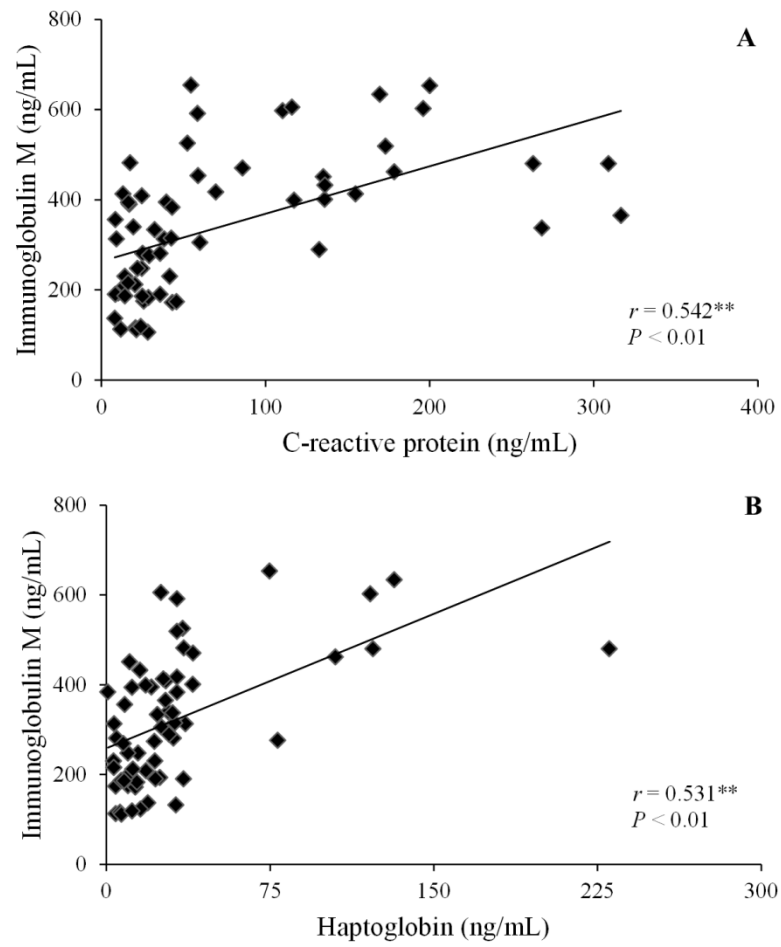


Fig. 4. Pearson correlation test of rabbits experimentally infected with *T. evansi*. (A) Immunoglobulin M and C-reactive protein, (B) immunoglobulin M and haptoglobin.

3 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi observado que os animais apresentaram um quadro inicial compatível com uma reação de fase aguda, com a presença de hiporexia, febre, perda de peso, edema de face e de vulva. Contudo, a maioria dos sinais clínicos não foram mais observados com o passar do tempo de infecção, permanecendo em alguns animais, somente o edema de face e de vulva, como achados persistentes até a eutanásia. Alguns animais não apresentaram quadros de edema persistente, porém, nesses locais em que foi observado o edema, notou-se a formação de lesões cutâneas (Figura 5) ou alopecia (Figura 6). Alterações como alopecia não tinham sido descritas em coelhos e ratos infectados com *T. evansi*, mas foram observadas em um estudo realizado por Da Silva et al. (2010b) em gatos infectados experimentalmente.



Figura 5 – Lesões cutâneas localizadas na pálpebra superior (A) e na vulva de coelhos infectados experimentalmente pelo *T. evansi*. Foi observada, nos animais do grupo infectado, a presença de lesões cutâneas em locais que apresentaram previamente edema.

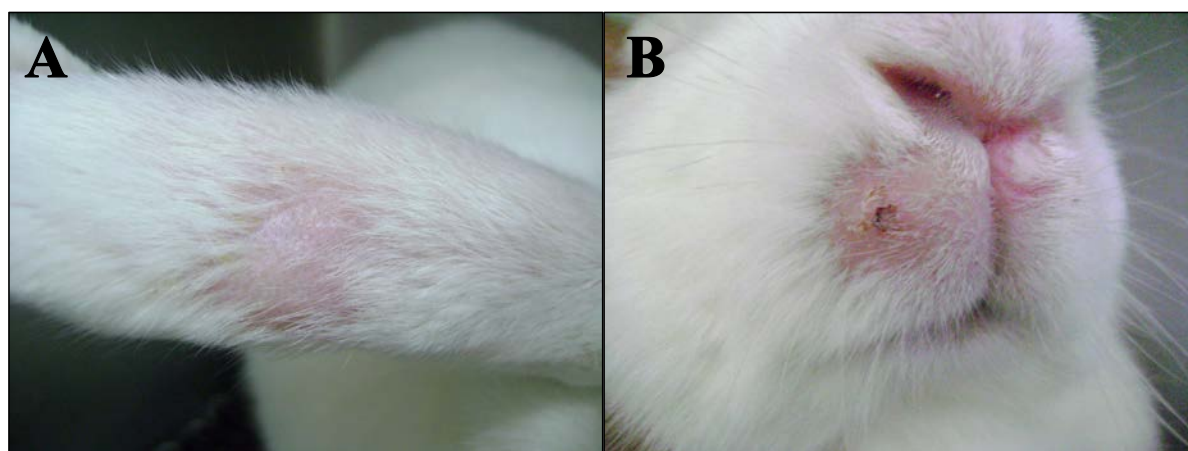


Figura 6 – Alopecia focal na porção dorsal da orelha (A) e no lábio superior de coelhos infectados experimentalmente pelo *T. evansi*. Foi observada, nos animais do grupo infectado, a presença de alopecia focal em locais que apresentaram previamente edema.

Os animais do experimento apresentaram reduções pontuais no hematócrito (Ht) nos dias 5 e 65 pós-infecção (PI) e aumento no peso corporal ao final do período experimental (118° dia PI), comparado com o dia zero (Tabela 2). Esses achados são semelhantes aos encontrados nos bovinos N'Dama, considerados tripanotolerantes à infecção por *T. congolense*, que apresentaram o mesmo ganho de peso dos animais controle e não apresentaram anemia, diferente dos bovinos Borans, que necessitaram de tratamento com fármacos tripanocidas em função da severa anemia e redução do peso corporal (PALING et al., 1991). Notou-se que, no 65° dia PI, houve um decréscimo no Ht dos animais infectados, acompanhado de um grande aumento na haptoglobina (Hp). A haptoglobina tem um papel importante na retirada da hemoglobina (Hb) livre, visto que essa se torna uma substância pró-oxidante nos tecidos (MURATA et al., 2004), o que denota à haptoglobina um papel auxiliar nas defesas antioxidantes (LIM et al., 1998; ECKERSALL, 2008).

Tabela 2 – Peso corporal de coelhos infectados experimentalmente pelo *T. evansi*. Média e desvio padrão do peso corporal nos dias 0, 30 60, 90 e 118 PI.

| Parâmetro | Tempo de infecção (dias) | Grupo controle (n=6) | Grupo infectado (n=6) |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Peso corporal (Kg) | 00 | 4,19 ^a ±0,50 | 3,82 ^a ±0,36 |
| | 30 | 4,33 ^a ±0,44 | 3,71 ^b ±0,36 |
| | 60 | 4,46 ^a ±0,55 | 3,97 ^a ±0,44 |
| | 90 | 4,41 ^a ±0,54 | 4,05 ^a ±0,46 |
| | 118 | 4,43 ^a ±0,43 | 4,06 ^a ±0,50 |

Obs: Média seguida por letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes, com $P < 0,05$ (teste *t* para amostras independentes).

Sabe-se que a ação do próprio flagelado, através da produção de neuraminidase, resulta na clivagem do ácido siálico da superfície do eritrócito, o que poderia favorecer a hemólise extravascular (SHEHU et al., 2006). No entanto, a remoção das hemácias pelo sistema fagocítico mononuclear não justificaria o aumento da Hb livre no plasma, já que o processo de hemólise extravascular não necessita da Hp como transportador da Hb (JAIN, 1993). Assim, é possível que seja verdadeira a hipótese de que a Hp apresente um importante papel no controle da parasitemia.

O aumento da atividade da BChE no período inicial da infecção pelo *T. evansi* pode estar fortemente relacionada com o início da reação de fase aguda, que é responsável pela modulação na síntese de proteínas e produção de PFA positivas em grande quantidade (PALTRINIERI, 2008). Nesse período, os macrófagos têm papel crucial na produção de uma resposta imune eficiente contra os tripanossomas africanos. Essa célula é responsável pela produção inicial de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) e na síntese do óxido nítrico (NO) (STIJLEMANS et al., 2007). Assim, a BChE poderia estar envolvida na ativação de tais macrófagos, haja vista existir neles receptores nicotínicos para a ACh. A ACh, ligada a esses receptores, produz uma inibição dose dependente na produção de citocinas (ULLOA, 2005). Dessa forma, possivelmente o aumento da atividade da BChE está relacionado com a hidrólise da acetilcolina, reduzindo os níveis dessa e impedindo sua ação supressora, o que estimularia a produção de citocinas e, conseqüentemente, a produção de PFA positivas como a proteína C-reativa, que apresentou elevação a partir do 5º dia PI e permaneceu elevada até o fim do período experimental (118 dias PI). A diferença observada neste estudo entre a atividade das colinesterases comparada ao estudo de Wolkmer et al. (2010), que observaram redução tanto na atividade da AChE, quanto na atividade da BChE, em ratos infectos pelo *T. evansi*, pode indicar uma resposta diferente entre as espécies frente a infecção pelo parasita, o que poderia justificar um melhor controle na parasitemia em coelhos do que em ratos, que geralmente apresentam alta parasitemia e morte entre o quinto a sétimo dia PI.

Foi observado um retorno aos valores basais da atividade da BChE, seguido de aumento da atividade da AChE no 27º dia PI, o que poderia sugerir uma mudança na resposta inflamatória, tornando a mesma uma resposta mediada por linfócitos, uma vez que a ação dos linfócitos também é modulada pela ligação da ACh em receptores de membrana (KAWASHIMA; FUJII, 2003). Assim, o aumento na atividade da AChE poderia promover um aumento na hidrólise da ACh, reduzindo as concentrações do mediador químico sobre os receptores nicotínicos dos linfócitos T, o que aumentaria a atividade imunológica das células, resultando em uma melhor resposta na produção de citocinas. Também, o aumento na atividade da AChE poderia ser um mecanismo compensatório devido a redução no número de linfócitos. Existe uma hipótese de que a redução no número de linfócitos circulantes em processos inflamatórios agudos seja gerada pela migração dessas células até o tecido inflamado ou pelo seu retorno aos linfonodos (STOCKHAM; SCOTT, 2011). No entanto, a linfopenia persistente, encontrada até os 95 dias PI não poderia ser justificada somente por esse mecanismo. Assim, possivelmente a linfopenia apresentada está relacionada à teoria de

que, da mesma forma que nos casos de leishmaniose, houve uma destruição dos linfócitos pela ação direta do protozoário (BUSH, 2004; DA SILVA et al., 2008b).

As quatro PFA selecionadas para este estudos apresentaram diferentes tipos de resposta conforme o tempo de infecção. A proteína C-reativa foi a única PFA a permanecer com altas concentrações no grupo infectado em todo o período experimental. Esse achado só confirma a suspeita de que essa PFA, em sinergismo com a IgM, tem um papel importante no controle da parasitemia. A IgM possui papel crucial na sobrevivência e no controle da parasitemia de ratos infectados pelo *T. evansi* (BARAL et al., 2007), o que justificaria o aumento permanente dessa imunoglobulina, encontrado neste estudo. Assim, possivelmente a proteína C-reativa apresente um papel bastante semelhante ao descrito por Coutinho et al. (1998), que constataram um possível papel para essa PFA nas infecções pelo *Trypanosoma cruzi*, já que uma molécula antigenicamente relacionada à proteína C-reativa foi observada na superfície do parasita, o que produziu um efeito inibitório na invasão das células do músculo cardíaco pelo *T. cruzi*. O importante papel da imunidade inata no controle da parasitemia de coelhos pode ser explicado pelo estudo realizado por Otto et al. (2009), que utilizaram plasma de coelhos saudáveis e infectados pelo *T. evansi* como terapia para ratos experimentalmente infectados com o protozoário. Foi observado que os ratos tratados com plasma de coelhos saudáveis tiveram uma longevidade bem maior do que os ratos que não foram tratados, e até mesmo dos animais tratados com plasma de coelhos expostos ao agente. Esses resultados só vêm reforçar os achados deste trabalho, demonstrando que os constituintes do plasma como as PFA e as imunoglobulinas apresentam um papel chave na tripanotolerância de coelhos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se, ao longo deste trabalho, que a infecção pelo *T. evansi* promoveu mudanças na via inflamatória e anti-inflamatória colinérgica de coelhos infectados, uma vez que foi observada uma maior atividade nas colinesterases (AChE e BChE), sendo ambas as enzimas responsáveis pela hidrólise e regulação das concentrações de ACh, que é um potente mediador anti-inflamatório. Dessa forma, uma maior atividade das enzimas BChE e AChE poderia reduzir as concentrações de ACh e influenciar, de modo positivo, na produção de citocinas por macrófagos. O aumento na produção de citocinas gera a uma reação de fase aguda, influenciando na produção de PFA nos hepatócitos. Assim, a resposta inflamatória desencadeada pela infecção pelo *T. evansi* promoveu um aumento nas concentrações de PFA como proteína C-reativa, haptoglobina e α_2 macroglobulina, além de estímulo na produção de imunoglobulinas, principalmente IgM. O aumento nas concentrações de IgM, relacionada com o aumento da proteína c-reativa e haptoglobina, sugere que essas proteínas tenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra o flagelado e, possivelmente, estejam relacionadas a tripanotolerância de coelhos infectados com *T. evansi*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 7th ed., Elsevier: Philadelphia, 2012. 545 p.

ACKERMANN, M. R. 2009. Inflamação aguda. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. Elsevier: Rio de Janeiro, 2009. cap. 3, p. 101-152.

AQUINO, L. P. C. T. Importância da infecção por *Trypanosoma evansi* em cães no Brasil. **Ensaio e Ciência**, v. 5, n. 5, p. 61-68, Jul. 2007.

AQUINO, L. P. C. T. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 255-260, Mar-Apr. 1999.

AQUINO, L. P. C. T. D. et al. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 1, p. 8-18, 2002.

BARAL, T. N. et al. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 10, p. 1513-1520, May. 2007.

BAZOLLI, R. S. et al. Transmissão oral de *Trypanosoma evansi* em cães. **ARS Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 148-152, 2002.

BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z. R. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 95-107, Oct. 1998.

BRUNEAU, E. G.; AKAABOUNE, M. Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. **Molecular Neurobiology**, v. 34, n. 2, p. 137-151, Oct. 2006.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. Roca: São Paulo, 2004. 384 p.

ÇOKUĞRAŞ, A. N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 54-61, Oct. 2003.

COLPO, C. B. et al. Natural infection by *Trypanosoma evansi* in dogs. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 717-719, Mai-Jun. 2005.

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, Jul-Ago. 2005.

COUTINHO, C. M. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: detection of a surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 143-153, Oct. 1998.

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

DA SILVA, A. S. et al. Oral infection by *Trypanosoma evansi* in rats and mice. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 897-900, Jun. 2007a.

DA SILVA, A. S. et al. Infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 519-523, Abr-Jun. 2008a.

DA SILVA, A. S. et al. Alterações hematológicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 538-542, Mar-Abr. 2008b.

DA SILVA, A. S. et al. *Trypanosoma evansi*: Hematologic changes in experimentally infected cats. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 31-34, May. 2009.

DA SILVA, A. S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira-SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 373-376, Out. 2007b.

DA SILVA, A. S. et al. Clinical aspects of cats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 1, p. 85-89, Aug. 2010b.

DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 131-138, Feb. 2003.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 12, p. 214-221, Dec. 2007.

DE LA RUE, M.; SILVA, R.; CARLI, G. Leucocytes and reticulocytes counts in acute infection of dogs with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbani, 1888. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 40, n. 4, p. 163-166, 2000.

ECKERSALL, P. D. 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed., Academic Press: San Diego, 2008. cap. 5, p. 114-155.

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

FUJII, T.; TAKADA-TAKATORI, Y.; KAWASHIMA, K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 106, n. 2, p. 186-192, Feb. 2008.

GAUNT, S. D. 2000. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed., Lippincott: Philadelphia, 2000. cap. 27, p. 154-162.

GUTIERREZ, C. et al. *Trypanosoma evansi*: Recent outbreaks in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1, p. 26-29, Nov. 2010.

HERRERA, H. et al. Enzoootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 263-275, Nov. 2004.

HILALI, M. et al. Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 237-243, Jun. 2006.

HOSSEININEJAD, M. et al. *Trypanosoma evansi* in three dogs in Iran. **Comparative Clinical Pathology**, v. 16, n. 1, p. 69-71, Nov. 2007.

JAIN, N. C. 1993. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Lea & Febiger: Philadelphia, 1993. cap. 10, p. 177-192.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed., Academic Press: San Diego, 1997. 932 p.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**, v. 74, n. 6, p. 675-696, Dec. 2003.

LIM, S. K. et al. Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. **Blood**, v. 92, n. 6, p. 1870-1877, Sep. 1998.

LUCKINS, A. G.; DWINGER, R. H. 2004. Non-tsetse-transmitted animal trypanosomiasis. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P. H.; MILES, M. A. **The trypanosomiases**. CABI publishing: London, 2004. cap. 15, p. 269-281.

MARQUES, L. et al. Experimental infection with *Trypanosoma evansi* in horses: clinical and haematological observations. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 9, n. 1, p. 11-15, 2000.

MEADE, K. G. et al. Divergent antimicrobial peptide (AMP) and acute phase protein (APP) responses to *Trypanosoma congolense* infection in trypanotolerant and trypanosusceptible cattle. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 2, p. 196-204, Dec. 2009.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

MURRAY, M.; D'IETEREN, G. D. M.; TEALE, A. J. 2004. Trypanotolerance. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P. H.; MILES, M. A. **The trypanosomiases**. CABI publishing: London, 2004. cap. 25, p. 461-477.

NAESSENS, J. Bovine trypanotolerance: a natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome? **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 521-528, Feb. 2006.

OTTO, M. A. et al. Plasma de coelhos no controle da infecção por *Trypanosoma evansi* em ratos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 379-384, Jun. 2009.

- PAIM, F. C. et al. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 365-370, May. 2011.
- PALING, R. et al. Susceptibility of N'Dama and Boran cattle to sequential challenges with tsetse-transmitted clones of *Trypanosoma congolense*. **Parasite Immunology**, v. 13, n. 4, p. 427-445, Oct. 1991.
- PALTRINIERI, S. The feline acute phase reaction. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 26-35, 2008.
- PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 6, p. 493, May. 2005.
- PAYS, E.; VANHOLLEBEKE, B. Human innate immunity against African trypanosomes. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 5, p. 493-498, Jun. 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, Out-Dez. 2005.
- SEIDL, A. et al. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 33, n. 1, p. 219-234, Jan. 1998.
- SHEHU, S. et al. Neuraminidase (Sialidase) activity and its role in development of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. **Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. p. 2779-2783, 2006.
- SILVA, R. et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 1, p. 167-171, Nov. 1995.
- SILVA, R. A. M. S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: **biologia, diagnóstico e controle**. Embrapa Pantanal: Corumbá, 2002. 141 p.
- SIQUEIRA JR., J. F. 2000. Inflamação aguda: resposta vascular e celular. In: SIQUEIRA JR., J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. MEDSI: Rio de Janeiro, 2000. cap. 6, p. 73-82.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, Apr. 2001.

STEVENS, J. R.; BRISSE, S. 2004. Systematic of trypanosomes of medical and veterinary importance. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P. H.; MILES, M. A. **The trypanosomiasis**. CABI publishing: London, 2004. cap. 1, p. 1-23.

STIJLEMANS, B. et al. African trypanosomosis: from immune escape and immunopathology to immune intervention. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 1, p. 3-13, Aug. 2007.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2 ed., Guanabara koogan: Rio de Janeiro, 2011. 744 p.

TAMARIT, A. et al. *Trypanosoma evansi* infection in mainland Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 1, p. 74-76, Jan. 2010.

TARELLO, W. *Trypanosoma evansi* infection in three cats. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 156, n. 3, p. 133-134, 2005.

TAYLOR, K.; AUTHIÉ, E. M. L. 2004. Pathogenesis of animal trypanosomiasis. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P. H.; MILES, M. A. **The trypanosomiasis**. CABI publishing: London, 2004. cap. 18, p. 331-354.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. 1999. Nicotinic receptors. In: SIEGEL, G. J. et al. **Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects** 6th ed., Raven Press: New York, 1999. cap. 11, p. 248-254.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. Roca: São Paulo, 2002. 532 p.

UCHE, U. E.; JONES, T. W. Effect of complement (C3) depletion on the generation of memory in rabbits primed with antigens of *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 47, n. 3-4, p. 205-213, May. 1993.

UCHE, U. E.; JONES, T. W.; BOID, R. Antibody patterns in rabbits showing different levels of susceptibility to an experimental *Trypanosoma evansi* infection. **Acta Tropica**, v. 52, n. 2-3, p. 139-147, Dec. 1992.

ULLOA, L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 8, p. 673-684, Aug. 2005.

VENTURA, A. L. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação ea relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica (São Paulo)**, v. 37, n. 2, p. 66-72, Maio. 2010.

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, n. 6, p. 1289-1298, Dec. 2000.

VINCENDEAU, P.; BOUTEILLE, B. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 645-665, Oct. 2006.

VINCENDEAU, P. et al. Arginases in parasitic diseases. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 9-12, Jan. 2003.

WOLKMER, P. et al. *Trypanosoma evansi*: Cholinesterase activity in acutely infected Wistar rats. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 251-255, Jul. 2010.