

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

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE GATOS  
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELO  
*Trypanosoma evansi***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Márcio Machado Costa**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE GATOS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE PELO *Trypanosoma evansi***

**por**

**Márcio Machado Costa**

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

**Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

C837p Costa, Márcio Machado, 1983-  
Proteinograma sérico de gatos infectados experimentalmente pelo *Trypanossoma evansi* / Márcio Machado Costa. - 2010.  
54 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2010.  
"Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes"

1. Medicina veterinária 2. Felinos 3. Eletroforese de proteínas 4. Tripanossomos I. Lopes, Sonia Terezinha dos Anjos II. Título

CDU: 619:636.028

Ficha catalográfica elaborada por  
Patrícia da Rosa Corrêa – CRB 10/1652  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

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

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

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE GATOS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE PELO *Trypanosoma evansi***

elaborada por  
**Márcio Machado Costa**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dra.**  
(Presidente/Orientador)

**Alexander Welker Biondo, Dr. (UFPR)**

**Cinthia Melazzo Andrade Mazzanti, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2010.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, pelo amor, carinho e pelo apoio na realização do meu mestrado.

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

A Cristiane, pelo amor, carinho e por ser essa companheira maravilhosa e paciente.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, por tudo que me ensinou, pela confiança no meu trabalho e por ser a grande responsável pelo meu crescimento profissional.

A toda a equipe do LACVET – UFSM, em especial a Raqueli e a Francine, pela grande ajuda e dedicação concedida nessa e em outras pesquisas. Ao Doutorando Roberto Marinho Maciel, pela grande amizade e pelos conselhos sempre pertinentes.

A professora Silvia Gonzalez Monteiro e a toda a equipe do LAPAVET, em especial ao doutorando Aleksandro da Silva, pela grande ajuda na realização dessa pesquisa. Foi através do trabalho em conjunto desses dois laboratórios que essa pesquisa pôde ser realizada.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, por oportunizar a realização de mais uma etapa de minha formação.

## RESUMO

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

### **PROTEINOGRAMA SÉRICO DE GATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELO *Trypanosoma evansi***

AUTOR: MÁRCIO MACHADO COSTA  
ORIENTADORA: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES  
Data e local da Defesa: Santa Maria, 04 de março de 2010

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil eletroforético das proteínas séricas de gatos experimentalmente infectados pelo *Trypanosoma evansi*, em diferentes períodos de infecção. Utilizaram-se 13 felinos (*Felis catus*) adultos, fêmeas e sem raça definida. Os gatos foram divididos em dois grupos homogêneos, sendo um o grupo controle (seis animais) e o outro o grupo infectado (sete animais). Os sete animais foram inoculados por via intraperitoneal, com um isolado de *T. evansi*. Nos outros seis animais, foi administrada pela mesma via solução fisiológica. Realizaram-se coletas de sangue nos dias 0, 7, 21 e 35 para avaliação das proteínas totais e fracionamento protéico através da técnica de eletroforese. Observou-se que os valores de albumina ( $p < 0,01$ ), alfa globulina 2 e gama globulinas ( $p < 0,05$ ) diferiram significativamente a partir do sétimo dia de infecção e que as beta globulinas ( $p < 0,05$ ) apresentaram diferença estatística a partir do 21º dia. Não houve diferença estatística na fração alfa globulina 1. Pode-se concluir que a infecção pelo *T. evansi* em gatos acarreta mudanças no perfil eletroforético das proteínas séricas. Assim, o aumento na fração  $\gamma$ -globulina é um achado frequente na infecção pelo *T. evansi*, causado principalmente pelo aumento da IgM e IgG. Contudo, a subfração  $\alpha_2$ -globulina apresentou aumento em todo o período experimental e, possivelmente, as proteínas dessa fração estejam diretamente envolvidas na defesa do hospedeiro contra o flagelado. Desse modo, é fundamental que novos estudos sejam realizados para definir o verdadeiro papel de cada proteína dessa fração no controle da infecção.

Palavras-chave: Eletroforese de proteínas; felinos; tripanossomose

## ABSTRACT

Master's Dissertation

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

### SERUM PROTEINOGRAM OF CATS EXPERIMENTALLY INFECTED BY *Trypanosoma evansi*

AUTHOR: MÁRCIO MACHADO COSTA

ADVISOR: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Date and place of Defense: Santa Maria, March 04, 2010.

This study aimed to evaluate the electrophoretic pattern of serum proteins in *Trypanosoma evansi*-infected cats during different periods of infection. Thirteen adult female non-breeding *Felis catus* were separated into two groups. Cats from the infected group (n=7) were intraperitoneally inoculated with a strain of *T. evansi*, and cats from the control group (n=6) received a physiological solution. Blood samples were collected at days 0, 7, 21, and 35 for evaluation total protein and protein fractions by electrophoresis. Albumin ( $P < 0.01$ ), alpha-2 globulin and gamma globulin ( $P < 0.05$ ) concentrations were statistically different from the seventh day post-inoculation. Beta globulin levels were increased from day 21 ( $P < 0.05$ ). Alpha-1 globulin fraction did not statistically differ. These results indicate that the infection by *T. evansi* in cats alters the serum protein electrophoretic profile. Thus, the increase in  $\gamma$ -globulin fraction is a common finding in infection by *T. evansi*, caused mainly by increased IgM and IgG. However, the  $\alpha_2$ -globulin subfraction showed increase throughout the experimental period and, possibly, the proteins of this subfraction are directly involved in host defense against flagellate. Thereby, further studies is essential to define the true role of each protein fraction in the control of infection.

Keywords: Protein electrophoresis, felines, trypanosomosis



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Formas Tripomastogotas de <i>T. evansi</i> em esfregaço sanguíneo de gatos infectados experimentalmente. Adaptado de Da Silva et al., 2009e .....	13
FIGURA 2: Transmissão e multiplicação (fissão binária) do <i>T. evansi</i> . Adaptado de Silva et al., 2002.....	16
FIGURA 3: Exemplos de proteinogramas de gatos domésticos. (A) Proteinograma normal (1 – albumina, 2 – alfa <sub>1</sub> -globulina, 3 – alfa <sub>2</sub> -globulina, 4 – betaglobulina, 5 – gamaglobulina); (B) aumento na subfração alfa <sub>2</sub> -globulina; (C) aumento na fração gamaglobulina e; (D) aumento na subfração alfa <sub>2</sub> -globulina e nas frações beta e gamaglobulina. Adaptado de Eckersall, 2008. ....	25
FIGURA 4: Sistema para a realização da eletroforese de proteínas. (A) Fonte e (B) cuba para eletroforese. Adaptado de Eckersall, 2008.....	29
FIGURA 5: Proteínas séricas separadas em bandas eletroforéticas e coradas com Ponceau. Adaptado de Eckersall, 2008.....	30

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – Means and standard deviations of hematocrit, total proteins, albumin, alpha-1 and 2, beta and gamma globulins of control and *Trypanosoma evansi*-infected cats ..... 45

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. CAPITULO I</b> .....	<b>13</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1. <i>Trypanosoma evansi</i></b> .....	<b>13</b>
<b>2.2. Proteínas Plasmáticas</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3. Eletroforese de proteínas</b> .....	<b>28</b>
<b>3. CAPÍTULO II</b> .....	<b>31</b>
<b>MANUSCRITO. Serun proteinogram of cats experimentally infected by <i>Trypanosoma evansi</i></b> .....	<b>31</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>33</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>33</b>
<b>2. Material and Methods</b> .....	<b>35</b>
<b>3. Results and Discussion</b> .....	<b>36</b>
<b>References</b> .....	<b>41</b>
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A tripanossomose é uma doença que afeta diversas espécies animais, tais como camelos, cavalos, burros, zebuínos, bovinos, caprinos, suínos, cães, elefantes, capivaras, quatis, antas, veados e pequenos roedores silvestres (SILVA et al., 2002). A surra, como é denominada na Índia, é causada pelo *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), um protozoário digenético da seção salivaria. Essa enfermidade tem uma distribuição mundial ampla, ocorrendo no norte da África, Índia, Filipinas, Malásia, Indonésia, China, Rússia, América Central e América do Sul (SILVA et al., 2002).

No Brasil, a tripanossomose equina é também denominada como “mal das cadeiras”, devido à sintomatologia nervosa apresentada pelos animais infectados, (paralisia dos membros posteriores), resultando em incoordenação motora (HERRERA, et al., 2004).

Segundo Nunes et al. (1993), a região do pantanal mato-grossense é, no país, conhecida como endêmica para essa enfermidade. Aquino (2007) alerta para a ocorrência da tripanossomose em cães fora da região pantaneira e para a importância desses animais no ciclo da doença, comportando-se como reservatórios e possíveis disseminadores da infecção.

Em 2004, na Índia, Joshi et al. (2005) constataram o primeiro caso de tripanossomose humana causada pelo *T. evansi*. Até então, os homens eram considerados resistentes ao *T. evansi* devido à sensibilidade do parasito ao plasma humano (HAWKING, 1978). Assim, em um estudo realizado por Shegokar et al. (2006), demonstrou-se que 22,7% da população do vilarejo de Seoni são positivos para o teste de aglutinação para tripanossomose/*T. evansi*. Dessa forma, é imprescindível a realização de novos estudos para acompanhar a evolução dessa enfermidade, pois se desconhece o real número de pessoas infectadas por esse parasito.

Os animais acometidos pela tripanossomose apresentam alterações clínicas como febre intermitente, edema, aumento dos linfonodos e do baço (TAYLOR & AUTHIÉ, 2004), anorexia (HOUSSEININEJAD et al., 2007; SILVA et al., 2009) e emagrecimento progressivo (COLPO et al., 2005; SILVA et al., 2007a). A anemia é o principal achado laboratorial encontrado nos animais parasitados pelo *T. evansi* (AQUINO et al. 2002; RODRIGUES et al., 2005; SILVA et al., 2008). Também, alterações no perfil protéico dos animais acometidos pela tripanossomose é um achado frequente, cursando, principalmente, com hiperproteinemia por hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (AQUINO et al., 2002; TAYLOR & AUTHIÉ, 2004, FRANCISCATO et al., 2007).

A eletroforese de proteínas é uma técnica empregada na separação dos diferentes tipos de proteínas plasmáticas, tornando possível a determinação de suas proporções relativas em uma dada amostra (BUSH, 2004). O padrão de alterações dessas frações é raramente patognômico para uma doença específica. No entanto, pode fornecer informações para o diagnóstico quando interpretado em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais (THOMAS, 2000).

Nos gatos domésticos, não havia relatos de infecção natural pelo *Trypanosoma evansi*. No entanto, em 2005, Tarello relatou três casos de gatos infectados pelo parasito. Desse modo, ainda é desconhecido o papel dos felinos no ciclo biológico do parasita e a resposta desses animais à infecção causada pelo referido agente. Portanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o perfil eletroforético das proteínas séricas de gatos experimentalmente infectados pelo *T. evansi* na fase aguda e crônica da enfermidade. Sua motivação deve-se também à facilidade de manutenção dos animais em isolamento e à presença da forma crônica da doença em gatos (CHOUDHURY & MISRA, 1972), o que torna possível avaliar vários períodos pós-infecção.

## 2. CAPITULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1. *Trypanosoma evansi*

O *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) é um flagelado da seção Salivaria, subgênero *Trypanozoon*, que apresenta distribuição cosmopolita. Em relação às características morfológicas, o *T. evansi* é tipicamente monomórfico, apresentando-se quase que exclusivamente na forma afilada (Tripomastigota) (STEVENS e BRISSE, 2004). O flagelado mede entre 14 a 33  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 a 2,2  $\mu\text{m}$  de largura, sendo indistinguível das formas intermediárias do *T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiense* ou *T. brucei gambiense* (BRUN et al., 1998) (Figura 1).

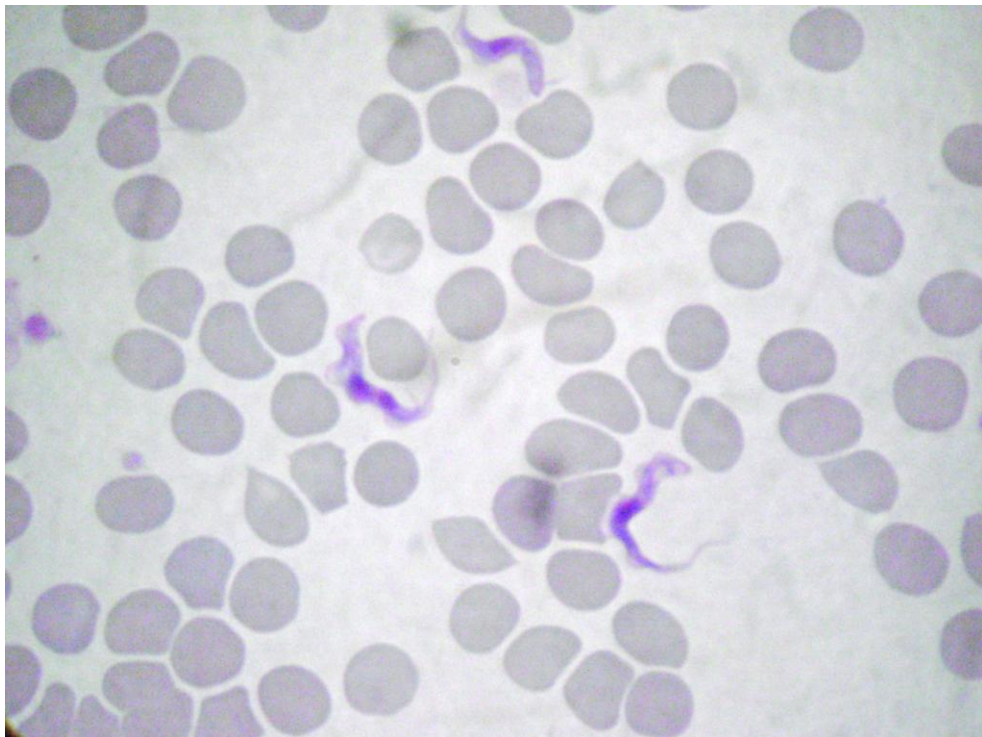


Figura 1: Formas Tripomastogotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de gatos infectados experimentalmente. Adaptado de Da Silva et al., 2009e

O *T. evansi* possui flagelo livre e um pequeno sub-cinetoplasto terminal. No entanto, as formas discinetoplásticas, em que o DNA circular do cinetoplasto está ausente, 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 as mesmas não apresentam cinetoplasto, o que pode ser um estado natural desses isolados.

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 o encontro de 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. Muitos nomes locais para a doença tem sido usados, 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 posteriores), 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 19 e nos início do século 20 na Indonésia e Filipinas. Todas as espécies de animais domésticos podem ser infectadas pelo *T. evansi*, no entanto, os principais hospedeiros variam geograficamente (LUCKINS e 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)

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 é a principal atividade econômica da região (AQUINO et al., 1999). Segundo Seidl et al. (1996), 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 são de US\$ 2.143 ou cerca de 6 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*) pode atuar como vetor mecânico do *T. evansi* (BRUN et al., 1998). Em um estudo realizado por Silva et al. (1995b), ficou evidente o papel dos tabanídeos como transmissores da tripanossomose no pantanal mato-grossense e as flutuações nessa região. O mesmo autor alerta que os níveis populacionais de tabanídeos atingem um pico nos meses de setembro a novembro, durante a primeira metade da temporada de chuva, mantendo-se até março, fim da estação chuvosa. Também, mutucas da espécie *Tabanus importunus* foram as mais abundantes no período de chuvas e atingiram picos populacionais de outubro a janeiro (SILVA et al., 1995b). 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, em estudos recentes, teve sua eficiência comprovada através da administração de tripomastigotas para cães e ratos (BAZZOLI et al., 2002; SILVA et al., 2007b). A rota oral de infecção pode ser importante na dispersão do *T. evansi* em cães, quatis e capivaras, pois os mesmos podem se infectar como consequência de suas freqüentes 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, como mostra a figura 2 (SILVA et al., 2002). Após a picada do inseto hematófago, os flagelados são inoculados pela via intradérmica do seu hospedeiro, o que pode induzir uma lesão edematosa cutânea denominada cancro (LUCKINS e DWINGER, 2004).



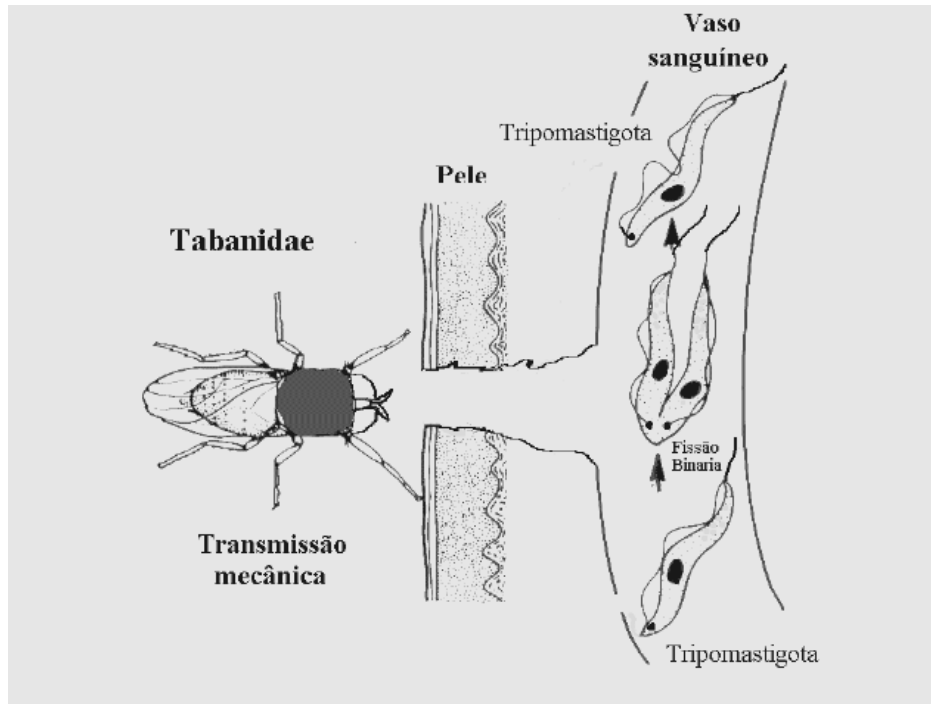


Figura 2: Transmissão e multiplicação (fissão binária) do *T. evansi*. Adaptado de Silva et al., 2002.

Geralmente, o número de tripomastigotas carregados 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 e DWINGER, 2004). Após a multiplicação na pele, os protozoários são drenados pelo sistema linfático, o que estimula a produção de células B (TAYLOR e AUTHIÉ, 2004).

A resposta imune contra o parasita depende da complexa composição antigênica do mesmo. Os antígenos do *T. evansi* podem ser divididos em antígenos comuns, que são derivados do organismo total desintegrado, e antígenos superficiais ou antígenos variantes, 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 mesmo em alterar seus antígenos de superfície (Aquino, 2007) Assim, esse fenômeno permite que o *T. evansi* evada do sistema imune do hospedeiro.

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 e AUTHIÉ, 2004). A fase aguda da enfermidade afeta principalmente animais jovens e fêmeas gestantes (TAILOR e AUTHIÉ, 2004) e cursa com

morte em poucas semanas ou meses (BRUN et al., 1998). Já a fase crônica é mais freqüente em áreas endêmicas da doença (TAYLOR e 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 e atrofia das massas musculares (SILVA et al., 1995a; 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. No entanto, em um surto relatado por Zanetti et al. (2008) no município de Cruz Alta (RS-Brasil), os equinos afetados pela tripanossomose apresentavam somente sinais neurológicos, encontrando-se em bom estado nutricional e de hidratação, e com temperatura retal normal. Em um estudo realizado por Herrera et al. (2004), ficou evidente a alta prevalência dessa enfermidade em cavalos da região pantaneira. Contudo, não foram evidenciados, no mesmo trabalho, sinais nervosos que caracterizam o “mal das cadeiras” nos cavalos, o que sustenta a importância dos próprios equinos como reservatórios do *T. evansi*.

Em cães, a tripanossomose cursa com altas taxas de morbidade e mortalidade (AQUINO, 2007). Os animais afetados apresentam sinais clínicos como febre intermitente, geralmente coincidindo com os picos de parasitemia (AQUINO et al., 1999), anorexia, apatia, edema de face, linfadenopatia, perda progressiva de peso corporal e anemia (COLPO et al., 2005, FRANCISCATO et al., 2007). Também, Hosseinejad et al. (2007) encontraram, além de alguns sinais citados anteriormente, opacidade de córnea em dois cães infectados pelo parasita. Os cães têm grande importância no ciclo da doença pela possibilidade de se comportarem como reservatórios naturais do *T. evansi* (AQUINO, 2007).

Em bovinos, a infecção pelo *T. evansi* pode apresentar-se assintomática, sendo necessários testes como o de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção de material nucleico do agente. Isso mostra a importância dessa espécie na manutenção do agente em regiões endêmicas como a do Pantanal (HERRERA et al., 2004). Porém, casos de bovinos apresentando a forma clínica da doença foram relatados por Silva et al. (2007a) no município de Videiras (RS-Brasil), demonstrando a emergência da enfermidade fora das regiões consideradas endêmicas.

Capivaras e quatis são considerados os principais reservatórios da tripanossomose na região pantaneira (NUNES et al., 1993). Segundo Herrera et al. (2004), as capivaras têm um papel importante na dispersão e manutenção do *T. evansi* no Pantanal, devido aos seguintes

aspectos: elevadas taxas de prevalência do flagelado; grau de tolerância à infecção pela resistência ao desenvolvimento de anemia, associada à alta parasitemia; parasitemia patente de longa duração; e ausência de sinais clínicos. Já os quatis, além do papel de reservatórios, podem apresentar doença clínica pela ação do protozoário (SILVA et al., 1997). Em um estudo realizado por Herrera et al. (2001), que consistiu na infecção experimental de quatis com isolados do *T. evansi*, os animais apresentaram sinais clínicos como emagrecimento progressivo, aumento dos linfonodos palpáveis, mucosas pálidas, depressão, letargia e fotofobia moderada. No entanto, não foi evidenciado febre nesses animais.

A anemia é o achado laboratorial mais frequentemente encontrado nos animais acometidos pela tripanossomose. Contudo, há uma grande variação na classificação morfológica dessa anemia. Em equinos, os animais acometidos apresentaram tanto uma anemia normocítica normocrômica (CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005) quanto uma anemia microcítica normocrômica (SILVA et al., 1995c). No entanto, em alguns casos, os animais acometidos podem não apresentar anemia (ZANETTI et al., 2008). Em cães, a anemia arregenerativa é a mais predominantemente encontrada (AQUINO et al., 2002; COLPO et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007; HOSSEININEJAD et al., 2007). Porém, Silva et al. (1995c) relataram anemia microcítica hipocrômica em cães acometidos por um surto na região pantaneira. Em um estudo experimental utilizando quatis, houve mudanças na classificação morfológica da anemia conforme o tempo de infecção. Inicialmente, os animais apresentaram uma anemia macrocítica normocrômica e, a partir dos 70 dias pós-infecção, os mesmos passaram a apresentar uma anemia normocítica normocrômica (HERRERA et al., 2002). Por fim, búfalos (HIALI et al., 2006) e coelhos (SILVA et al., 2008) experimentalmente infectados com isolados do *T. evansi* apresentaram uma anemia macrocítica hipocrômica, típica das doenças hemolíticas. As divergências entre os autores em relação à classificação da anemia, com base de dados de infecções naturais, se deve aos possíveis fatores concorrentes, como deficiências nutricionais e/ou outras doenças parasitárias (AQUINO, 2007).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem, ainda não completamente elucidada, das anemias na enfermidade causada pelo protozoário (AQUINO, 2007). Um dos principais mecanismos envolvidos na produção de anemia é a hemólise extravascular, que é resultado da destruição eritrocitária mediada por anticorpos (GAUNT, 2000). Os anticorpos produzidos são principalmente a imunoglobulina M (IgM) e a imunoglobulina G (IgG), que se ligam em epítomos dos agentes infecciosos, em complexo membrana do eritrócito ligado a proteínas microbianas ou em epítomos da membrana do

eritrócito que são expostas depois da infecção ou lise da célula (GAUNT, 2000). Assim, tanto os eritrócitos infectados, quanto os não infectados podem estar ligados a anticorpos, complexos imunes ou complemento, sendo fagocitados por macrófagos presentes no baço, medula óssea, fígado e pulmões (GAUNT, 2000). Assim, os animais inicialmente desenvolvem 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 produção de radicais livres também está estreitamente envolvida na patogênese do *T. evansi*. Saleh et al. (2009) demonstraram o envolvimento da produção de óxido nítrico na oxidação de eritrócitos durante a infecção crônica pelo *T. evansi*, o que contribui na formação de danos celulares em camelos infectados. Em estudo realizado por Wolkmer et al. (2009), em que ratos foram experimentalmente infectados pelo flagelado, concluiu-se que os danos oxidativos causados na membrana das hemácias podem ser uma das causas da produção de anemia na fase aguda da doença.

Dentre os achados patológicos, a esplenomegalia é uma alteração encontrada em equinos (RODRIGUES et al., 2005), cães (AQUINO et al., 2002), coelhos (UCHE e JONES, 1992), quatis (HERRERA et al., 2001) e cabras (DARGANTES et al., 2005) infectados naturalmente ou experimentalmente pelo *T. evansi*. Histologicamente, há presença de hiperplasia dos folículos linfóides (HERRERA et al., 2001), eritrofagocitose e hemossiderose (AQUINO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005). Os Macrófagos e os linfócitos podem estar presentes no tecido esplênico (UCHE e JONES, 1992; DARGANTES et al., 2005). Além disso, Damayant et al. (1994) observaram graves focos necróticos disseminados no baço. Outro órgão afetado pela doença é o fígado, que pode apresentar alterações macroscópicas e/ou microscópicas. Em coelhos e caprinos, foram descritas mudanças no tamanho do órgão acompanhado pela presença de bordos arredondados (UCHE e JONES, 1992; DARGANTES et al., 2005), juntamente com alterações microscópicas como degeneração gordurosa de hepatócitos, infiltrados celulares (linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos) e necrose centrolobular, que também são vistas em equinos (RODRIGUES et al., 2005), cães (AQUINO et al., 2002) e quatis (HERRERA et al., 2001).

Também, a hemossiderose, acompanhada de congestão venosa foi descrita em búfalos por Damayanti et al., (1994).

O diagnóstico da enfermidade é baseado nos achados clínicos e na presença do parasita no sangue analisado (AQUINO, 2007). A avaliação do esfregaço sanguíneo, através da microscopia de luz, é uma das técnicas de identificação de tripanossomas mais utilizada. Entretanto, esta técnica apresenta baixa sensibilidade para detecção de baixos níveis parasitários, o que é comum em grandes animais (EISLER et al., 2004). Outra técnica utilizada na detecção do protozoário é a técnica de centrifugação do hematócrito, que consiste na centrifugação do microhematócrito e avaliação da capa flogística. A vantagem dessa técnica é uma maior sensibilidade devido à concentração de parasitas pela centrifugação (EISLER et al., 2004). A prova biológica ou sub-inoculação também pode ser utilizada na detecção do *T. evansi*, através da inoculação de sangue suspeito em animais de laboratório, o que aumenta as chances de detecção do flagelado (AQUINO, 2007). Em relação aos testes sorológicos, determinação de anticorpos específicos para o *T. evansi* pode ser realizada através de imunofluorescência indireta (EISLER et al., 2004). Por fim, a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) apresenta alta sensibilidade na detecção do *T. evansi*, através da amplificação do DNA tripanossomal (BRUN et al., 1998).

Em felinos, a tripanossomose se apresenta de forma semelhante a outras espécies, o que acarreta nos animais infectados a presença de 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., 2009e). Em um estudo experimental realizado em 2009 com gatos domésticos, foram observadas alterações como anemia normocítica normocrômica (DA SILVA et al., 2009a), aumento dos níveis de cobre e decréscimo do níveis de zinco e ferro (DA SILVA et al., 2009b), trombocitopenia (DA SILVA et al., 2009c), redução na atividade das colinesterases (DA SILVA et al., 2009f) e alterações patológicas como perda da massa muscular generalizada, icterícia, hiperplasia linfóide no baço e linfonodos (DA SILVA et al., 2009g).

Em relação ao tratamento, o aceturato de diminazeno tem se mostrado eficaz na terapia contra o *T. evansi* em diferentes espécies animais (AQUINO, 2007). Em gatos, o tratamento com este fármaco obteve eficácia de 85,7% (DA SILVA et al., 2009d).

## 2.2. Proteínas Plasmáticas

As proteínas plasmáticas são de fundamental importância, pois executam diversas funções como formar a base da estrutura das células, tecidos e órgão; manter a pressão oncótica; atuar como catalisadores em reações bioquímicas; agir como tampões para a manutenção do equilíbrio ácido-básico; participar da coagulação sanguínea e da defesa do organismo; além de transportar e carrear compostos pela maior parte dos constituintes do plasma (ECKERSALL, 2008). Com exceção das imunoglobulinas, que são produzidas pelos linfócitos B, grande parte das proteínas plasmáticas são sintetizadas e secretadas pelos hepatócitos. O controle na produção e secreção é realizado por mecanismos variados. A albumina, por exemplo, é secretada a partir de um estímulo causado pela queda na pressão osmótica (ECKERSALL, 2008). Outro mecanismo envolvido na produção e secreção de proteínas está relacionado com a liberação de citocinas, devido a uma inflamação local ou sistêmica. As principais citocinas moduladoras da produção de proteínas são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 1 (IL-1) e a interleucina 6 (IL-6) (PALTRINIERI, 2007). Essas citocinas são simultaneamente responsáveis pelo aumento na síntese e secreção de proteínas de fase aguda (ECKERSALL, 2008). A ação dessas citocinas acontece de forma sinérgica, através da mobilização de aminoácidos periféricos, pela ação proteolítica do TNF- $\alpha$  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 negativas (albumina e transferrina), estimulando a produção de proteínas de fase aguda positivas (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). No entanto, tecidos não hepáticos como intestino, pulmão e tecido adiposo têm a capacidade de sintetizar algumas das proteínas do plasma, como a haptoglobina e o soro amiloide A (ECKERSALL, 2008).

A concentração de proteínas no plasma reflete um equilíbrio entre as proteínas do meio intra e extravascular. No entanto, a concentração de proteínas no sangue não prediz a reserva total de proteínas do corpo. A meia-vida das proteínas plasmáticas é espécie-dependente e, como regra geral, inversamente proporcional ao tamanho do animal. Existe uma remoção permanente dessas proteínas da circulação em função do catabolismo proteico, bem

como pela perda através dos tratos gastrintestinal e urinário. Assim, as perdas proteicas devem ser compensadas pela alimentação e produção nos hepatócitos (THOMAS, 2000a).

Para a identificação e quantificação das proteínas plasmática, cada componente proteico deve ser separado ou cada proteína deve ser mensurada de forma independente. A separação primária das proteínas do plasma acontece entre a albumina e as globulinas (ECKERSALL, 2008). Assim, as proteínas totais podem ser determinadas por prova colorimétrica, utilizando o método de biureto, em que a reação esta baseada na formação, em meio alcalino, de um composto azul, devido à ligação das proteínas a sais de cobre (reativo de biureto). A albumina também é mensurada por métodos colorimétricos, empregando a técnica do verde de bromocresol. Em pH ácido, o verde de bromocresol se fixa seletivamente a albumina, produzindo uma coloração azul (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Por fim, as concentrações de globulinas não são medidas, mas calculadas a partir da subtração do teor sérico de albumina das proteínas totais (LASSEN, 2007b).

A eletroforese é uma técnica empregada na separação dos diferentes tipos de proteínas plasmáticas, tornando possível a determinação de suas proporções relativas em uma dada amostra. Assim, o soro ou o plasma são colocados em um suporte de gel e expostos a um campo elétrico, provocando migração das diferentes frações de proteínas em diferentes velocidades na direção do anodo. Após a coloração, as frações apresentam-se na forma de bandas, com intensidade de cor variável, que podem ser escaneadas por um densitômetro para produzir um traçado eletroforético. O comprimento e a largura de cada seção da curva indica a quantidade relativa de uma proteína particular ou de um grupo de proteínas. Isto pode ser traduzido em uma leitura percentual e, combinando essa informação com a concentração de proteínas totais, os valores absolutos da concentração de proteínas ou grupo de proteínas podem ser calculados (BUSH, 2004).

O número de frações obtidas na eletroforese varia conforme o tipo de técnica empregada e a espécie animal pesquisada (LASSEN, 2007b). Geralmente, as proteínas plasmáticas são separadas em quatro frações: albumina, alfa ( $\alpha$ ) globulinas, beta ( $\beta$ ) globulinas e gama ( $\gamma$ ) globulinas. Caninos e felinos ainda podem apresentar as frações  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -globulinas divididas em subfrações:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$ . (WERNER e TURNWALD, 1999).

A albumina é a mais proeminente das proteínas séricas, constituindo, nos animais, cerca de 35-50% do total das proteínas do soro (THOMAS, 2000a). No entanto, ela é, dentre as proteínas, a que apresenta menor tamanho. Assim, a albumina responde por cerca de 80% da pressão oncótica do sangue, que impede a passagem da água do sangue para o tecido. Também, essa proteína tem papel importante no transporte de ácidos graxos livres, ácidos

biliares, bilirrubina, cálcio, hormônios e medicamentos. A meia vida da molécula de albumina circulante é variável, sendo, nos cães, em torno de oito dias (LASSEN, 2007b).

As globulinas representam um grupo heterogêneo de proteínas, de tamanhos variados, mas predominantemente grandes. Abrangem diversos tipos de moléculas de anticorpos; outras proteínas que atuam na resposta imune (tais como o complemento); fatores de coagulação; enzimas; e proteínas transportadoras de lipídeos, vitaminas, hormônios, hemoglobina extracelular e íons metálicos (ferro e cobre) (LASSEN, 2007b).

A fração alfa globulina é composta basicamente de proteínas transportadoras, tais como a transcortina, a lipoproteína, a ceruloplasmina e a haptoglobina. A antitrombina III (inibidora da trombina) e a alfa<sub>2</sub>-macroglobulina (inibidora da tripsina) também fazem parte dessa fração. A fração beta globulina é ainda constituída de algumas proteínas transportadoras, como, por exemplo, a transferrina, a ferritina e outras lipoproteínas. Dentre os outros constituintes dessa fração, estão a proteína C-reativa, os componentes do complemento (C3 e C4), o plasminogênio e o fibrinogênio, presente somente no plasma. Ademais, as moléculas de imunoglobulinas dos tipos IgM e IgA podem migrar para a fração beta durante o fracionamento eletroforético (LASSEN, 2007b). Por fim, a fração gama globulina contém os mais variados tipos de imunoglobulinas como IgM, IgA, IgE e IgG (ECKERSALL, 2008).

Anormalidades nas proteínas séricas podem ser identificadas em diversas enfermidades e, dessa forma, fornecer a lógica para estudos novos e definitivos para o paciente (ECKERSALL, 2008). O padrão de alterações dessas frações é raramente patognomônico para uma doença específica. No entanto, pode fornecer informações para o diagnóstico quando interpretado em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais (THOMAS, 2000a).

As alterações do proteinograma devem ser interpretadas tendo em vista as muitas influências que não estão associadas a doenças. Porém, variações fisiológicas em um indivíduo são relativamente constantes ao longo de um período considerável de tempo. Desse modo, pequenas mudanças no perfil eletroforético das proteínas pode ser significativa, justificando um exame mais minucioso (ECKERSALL, 2008).

Na avaliação das proteínas plasmáticas, deve-se levar em conta a idade do animal estudado (THOMAS, 2000). Assim, animais neonatos apresentam níveis baixos de proteínas, devido as pequenas quantidades de albumina e globulinas. A medida que o animal ingere o colostro, há um aumento progressivo no nível das globulinas até a maturidade (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Em animais velhos, há um aumento nas proteínas totais devido a um leve decréscimo na albumina e um aumento nas  $\alpha$  e  $\beta$ -globulinas (THOMAS, 2000a). Na gestação,



há um decréscimo na albumina materna um aumento nas globulinas em algumas espécies (ECKERSALL, 2008). Contudo, no término da gestação, há um aumento nas  $\gamma$ -globulinas, o que promove um aumento nas proteínas totais (GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

Embora inúmeros hormônios causem efeitos drásticos nas proteínas teciduais, as alterações hormonais apresentam um efeito mínimo sobre as proteínas plasmáticas. Os efeitos hormonais sobre as proteínas do plasma são difíceis de prever, pela ação negativa desses sobre a albumina e as globulinas (THOMAS, 2000a). O estresse, causado pela liberação de cortisol, produz um decréscimo nas proteínas totais e albumina, mas geralmente leva a um aumento na fração  $\alpha_2$ -globulina associada à resposta de fase aguda (ECKERSALL, 2008). Em cães, o hiperadrenocorticismo espontâneo pode apresentar aumento nas proteínas totais causado pelo aumento nas  $\alpha_2$ -globulinas, com simultâneo decréscimo na albumina e  $\gamma$ -globulinas (THOMAS, 2000a).

As alterações nos níveis das proteínas totais são anormalidades laboratoriais comumente detectadas em animais. Tais alterações se devem a anormalidades nos teores de albumina e/ou globulinas. A interpretação das mudanças nos níveis de proteínas depende da identificação da fração do soro ou plasma que esta alterada. No entanto, aumento ou diminuição na concentração de albumina ou globulinas nem sempre gera alterações detectáveis nas proteínas totais. Portanto, para que haja uma interpretação adequada, deve-se avaliar os teores de albumina e de globulinas, além da concentração de proteínas totais (LASSEN, 2007b) (figura 3).

O aumento na concentração de proteínas totais pode derivar de aumento nos teores de albumina e/ou de globulinas (LASSEN, 2007b). A desidratação é a causa principal de aumento simultâneo entre albumina e globulinas ou somente aumento de albumina (BUSH, 2004). Já o aumento somente nos teores de globulinas indica alterações em uma ou mais frações proteicas e o diagnóstico depende do tipo de globulina que está aumentada (LASSEN, 2007).

A diminuição dos teores de proteínas se deve a uma diminuição simultânea da albumina e globulinas ou da diminuição individual de cada uma (LASSEN, 2007b). A hipoalbuminemia, com hipoglobulinemia, pode ser causada por hemorragias, queimaduras, lesões exudativas (GONZÁLEZ e SILVA, 2006) ou por enteropatias com perda de proteínas, causadas por neoplasias, como o linfoma, infecções por parvovirus, enterite eosinofílica ou histoplasmose (BUSH, 2004).

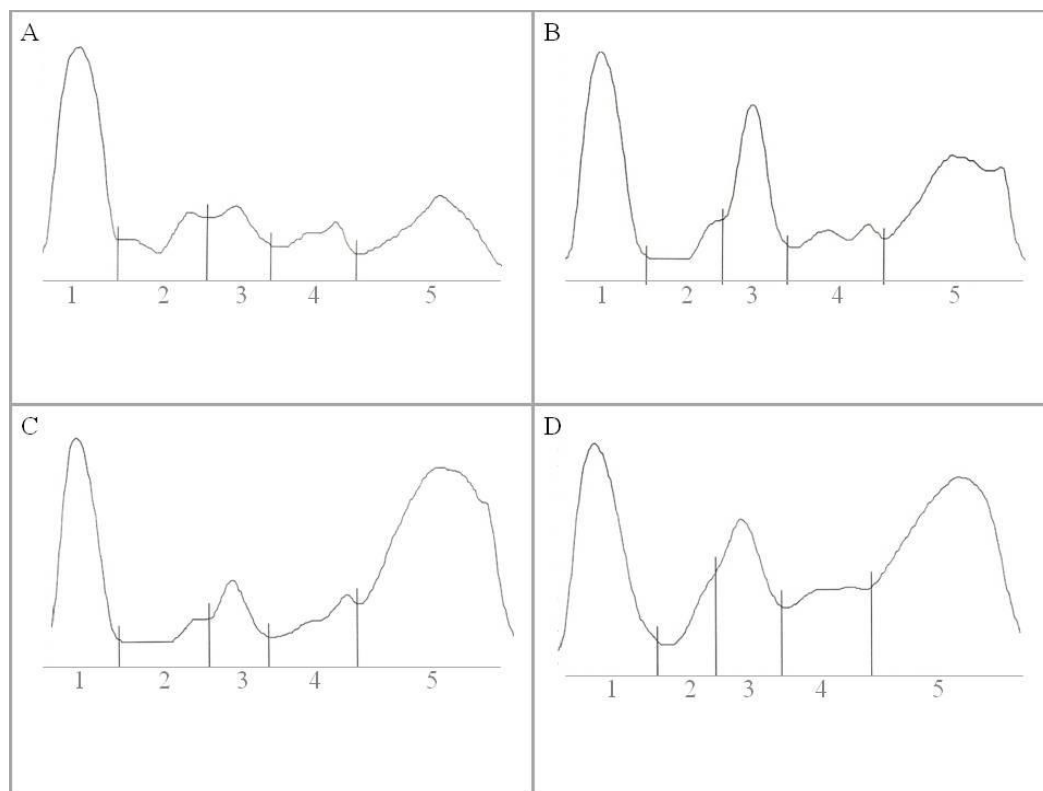


Figura 3: Exemplos de proteinogramas de gatos domésticos. (A) Proteinograma normal (1 – albumina, 2 –  $\alpha_1$ -globulina, 3 –  $\alpha_2$ -globulina, 4 – betaglobulina, 5 – gamaglobulina); (B) aumento na subfração  $\alpha_2$ -globulina; (C) aumento na fração gamaglobulina e; (D) aumento na subfração  $\alpha_2$ -globulina e nas frações beta e gamaglobulina. Adaptado de Eckersall, 2008.

O decréscimo de albumina é a forma mais comum de distúrbio proteico. Geralmente, o decréscimo de albumina pode ser atribuído à perda ou falha na síntese de albumina (ECKERSALL, 2008). As perdas de albumina podem ocorrer através da urina ou pelo intestino. Perdas de albumina em nível renal são causadas principalmente por doenças glomerulares primárias, como glomerulonefrite e amiloidose renal, podendo levar ao desenvolvimento da síndrome nefrótica (BUSH, 2004). A perda seletiva de albumina ocorre devido ao tamanho das moléculas de albumina que são menores do que as globulinas, assim, passando facilmente pelas membranas glomerulares lesadas (LASSEN, 2007b).

As perdas intestinais de albumina podem ser geradas pelo parasitismo gastrointestinal, tanto pela absorção de nutrientes pelo parasita e privação da absorção de aminoácido para produção de proteínas, quanto pela fixação na parede gástrica ou intestinal seguido de hematofagia. Raramente o parasitismo gastrointestinal resulta em deficiência grave o suficiente de aminoácidos que induza à hipoglobulinemia (LASSEN, 2007b). A síndrome da má absorção ou a insuficiência pancreática exócrina também podem levar a um quadro de hipalbuminemia por perda intestinal, devido ao menor aproveitamento dos aminoácidos ou pela falta de digestão adequada de proteínas, respectivamente (LASSEN, 2007b).

Na insuficiência hepática, a diminuição de albumina pode ser moderada a severa, conforme o grau de alteração na função hepática, que deve apresentar uma diminuição na massa funcional do fígado de 70 a 80% para que a hipoalbuminemia possa ocorrer (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Também, a albumina é considerada como uma proteína de fase aguda negativa que, pela ação de citocinas nos hepatócitos, pode apresentar a sua produção diminuída (ECKERSALL, 2008; PALTRINIERI, 2008).

O aumento da fração  $\alpha$ -globulina frequentemente ocorre em animais devido a danos teciduais ou inflamação, como parte de uma resposta aguda. Muitas das proteínas de fase aguda migram para as regiões  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ -globulina (ECKERSALL, 2008). Essas proteínas ajudam a regular a reação inflamatória, removem produtos gerados pelos danos celulares ou biprodutos da resposta inflamatória (THOMAS, 2000b).

Dentre as proteínas de fase aguda da fração  $\alpha$ , três delas são de maior importância em gatos domésticos:  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, soro amilóide A e haptoglobina. O soro amilóide A é a proteína de fase aguda de maior importância em felinos, atuando como imunomodulador em reações inflamatórias. Seu aumento é descrito principalmente em neoplasias, na peritonite infecciosa felina, na insuficiência renal, nas desordens hepáticas e no diabetes. A haptoglobina também está incluída como um indicador inflamatório em gatos, mas apresenta um papel menor que as outras proteínas. Da mesma forma que o soro amilóide A, a peritonite infecciosa felina (PIF) induz um aumento precoce nos níveis de haptoglobina em felinos. Por fim, a  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida é o objeto de maior estudo em gatos com PIF. A função dessa proteína ainda não é bem definida, mas sabe-se que ela tem um papel imunomodulatório e anti-inflamatório, regulando a resposta neutrofílica, inibindo a agregação plaquetária e a proliferação de linfócitos. Também, o aumento da  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida é descrito em outras infecções virais, como a imunodeficiência felina e a leucemia viral felina (PALTRINIERI, 2008).

O decréscimo nas  $\alpha$ -globulinas está associado com cirrose hepática em caninos. Esse decréscimo é resultado da diminuição dos níveis de  $\alpha_1$ -antitripsina e haptoglobina, sendo sugestivo de mau prognóstico (THOMAS, 2000b).

O aumento das  $\beta$ -globulinas frequentemente ocorre associado ou ao aumento nas  $\alpha$ -globulinas, como parte de uma resposta aguda, ou ao aumento das  $\gamma$ -globulinas, como parte de uma inflamação e/ou infecção crônica. O aumento da fração  $\beta$  está associado à síndrome nefrótica, doença hepática ativa e resposta imune (LASSEN, 2007b). Na dermatite supurativa, há uma simultânea estimulação antigênica na produção de IgM e complemento, elevando a fração  $\beta$  (ECKERSALL, 2008). O fenômeno ponte beta-gama acontece devido ao aumento de

imunoglobulinas que migram para as subfrações  $\beta_2$  e  $\gamma_1$ . Geralmente está associada à hepatite crônica ativa, que estimula a produção das imunoglobulinas IgA e/ou IgM (ECKERSALL, 2008). Ocasionalmente, um pico monoclonal nas  $\beta$ -globulinas pode ocorrer em pacientes com mieloma múltiplo ou linfoma (THOMAS, 2000b).

O decréscimo nas  $\beta$ -globulinas tem sido associado a cães com hipoadrenocorticismismo ou após a terapia com mitotane para o hiperadrenocorticismismo. Dessa forma, a diminuição da fração  $\beta$  pode ocorrer secundariamente à produção deficiente do hormônio adrenocortical (THOMAS, 2000b).

A fração  $\gamma$ -globulina inclui a maior parte das imunoglobulinas e o aumento dessa fração é denominado de gamopatia, que pode ser classificada como policlonal ou monoclonal, sendo diferenciadas com base na largura do pico da fração  $\gamma$ , através do traçado eletroforético. O aumento amplo ou difuso das  $\gamma$ -globulinas caracteriza uma gamopatia policlonal e é resultado da produção de clones heterogêneos de linfócitos B e plasmócitos, que produzem uma população policlonal de imunoglobulinas. A gamopatia policlonal está associada à inflamação e/ou infecção crônica, como, por exemplo, na erliquiose canina e na peritonite infecciosa felina (LASSEN, 2007b). As doenças imunomediadas também podem cursar com uma gamopatia policlonal, bem como enfermidades que cursam com a produção de imunocomplexos, como glomerulonefrite, piometra e lúpus eritematoso sistêmico (ECKERSALL, 2008). Infrequentemente, pode-se observar gamopatia policlonal nos casos de linfoma e leucemia linfocítica, devido a maior produção de imunoglobulinas heterogêneas pelas células linfoides neoplásicas. As gamopatias monoclonais são caracterizadas por apresentar a fração  $\gamma$  com base estreita ou afilada, o que indica um aumento da produção de imunoglobulinas induzida por um único clone de linfócitos B ou de plasmócitos. O mieloma múltiplo é a neoplasia maligna que produz uma gamopatia monoclonal em função de se originar da proliferação de um único clone de linfócitos B, comumente diferenciados em plasmócitos (LASSEN, 2007b). Os linfomas podem apresentar uma gamopatia monoclonal, dependendo do grau de clonagem das células tumorais (ECKERSALL, 2008). No entanto, esse distúrbio é mais comum na leucemia linfocítica crônica, com elevação predominante de IgM (LASSEN, 2007b). A presença de gamopatia monoclonal também é descrita com menor frequência em animais com leishmaniose ou erliquiose canina (ECKERSALL, 2008). O decréscimo das  $\gamma$ -globulinas, com os teores normais de albumina, ocorre na síndrome da imunodeficiência hereditária ou adquirida, ou em neonatos com falha na transferência de imunidade passiva (THOMAS, 2000b).

### 2.3. Eletroforese de proteínas

A eletroforese é uma técnica analítica baseada no movimento de partículas carregadas através de uma solução, sob influência de um campo elétrico. A técnica consiste em aplicar o soro em uma matriz que permita a migração das proteínas, devido às diferenças em suas cargas elétricas (LASSEN, 2007a). Entre os meios disponíveis para o fracionamento das proteínas em laboratórios clínicos, pode-se citar as eletroforeses em acetato de celulose e em gel de agarose (NAOUM,1999).

A eletroforese em gel de agarose produz melhor resultado no processo de fracionamento do que o acetato de celulose. No entanto, esta técnica tem o inconveniente do seu custo e da complexidade de sua preparação. Assim, o acetato de celulose além de proporcionar um menor custo para sua realização, apresenta maior facilidade operacional (NAOUM, 1999).

Geralmente, as matrizes, como as fitas de acetato de celulose, se apresentam na forma de folhas ou lâminas, as quais é adicionada solução tampão no momento de sua produção ou essas são embebidas antes do uso (LASSEN, 2007a). É necessário que as fitas permaneçam embebidas antes do uso por um período mínimo de 15 minutos, não ultrapassando um período de 4 horas (NAUOM, 1999).

Na cuba eletroforética, as duas extremidades da matriz de separação devem estar em contato com a solução tampão em compartimentos adjacentes, sem que haja mistura das soluções desses compartimentos (LASSEN, 2007a). Convencionalmente, a eletroforese de proteínas de fluídos biológicos é realizada em tampão alcalino, com pH variável de 8,5 a 9,5, faixa em que a maioria das proteínas, com exceção das imunoglobulinas, migram em direção ao ânodo (NAUOM, 1999).

Para que haja migração de proteínas sobre a matriz de separação, é necessária a aplicação de uma corrente elétrica no sistema. Assim, as proteínas irão migrar em direção ao ânodo ou cátodo, conforme sua carga elétrica. A velocidade de migração depende da carga elétrica da molécula e de seu tamanho e conformação. De um modo geral, a amostra de soro é aplicada na extremidade próxima a cátodo, pois grande parte das proteínas apresenta carga negativa e migra em direção ao ânodo (LASSEM, 2007a) (figura 4).

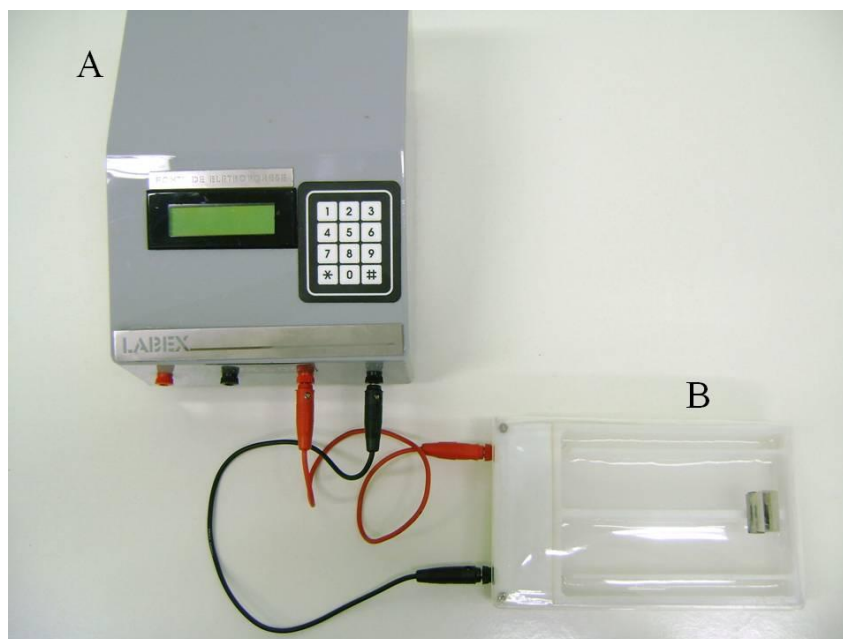


Figura 4: Sistema para a realização da eletroforese de proteínas. (A) Fonte e (B) cuba para eletroforese. Adaptado de Eckersall, 2008.

A albumina é a proteína que apresenta a maior carga negativa e o menor tamanho, o que facilita sua migração mais rapidamente ao polo positivo. Em contrapartida, as  $\gamma$ -globulinas apresentam as menores cargas negativas e são afetadas pelo fenômeno denominado eletroendosse, causado pelo fluxo do tampão na direção do ânodo para o cátodo, levando-as em direção ao cátodo. Por fim, as frações  $\alpha$  e  $\beta$ -globulinas apresentam mobilidade intermediária entre a albumina e as  $\gamma$ -globulinas (NAOUM, 1999; ECKERSALL, 2008).

Após a aplicação do soro na matriz de separação, é aplicada uma corrente elétrica de 150 Volts, em um período de 20 a 30 minutos (NAOUM, 1999), sendo que o tempo exato e a voltagem devem ser estabelecidos após algumas corridas eletroforéticas, em função das várias metodologias descritas em diferentes estudos com eletroforese de proteínas em gatos (MIRÓ et al., 2007; PALTRINIERI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007).

Concluído o fracionamento eletroforético, as frações proteicas são identificadas através do auxílio de uma coloração. Vários tipos de corantes podem ser empregados para a coloração das fitas, como o Ponceau, o negro de amido, o azul de bromofenol e o azul brilhante de Coomassie (figura 5).

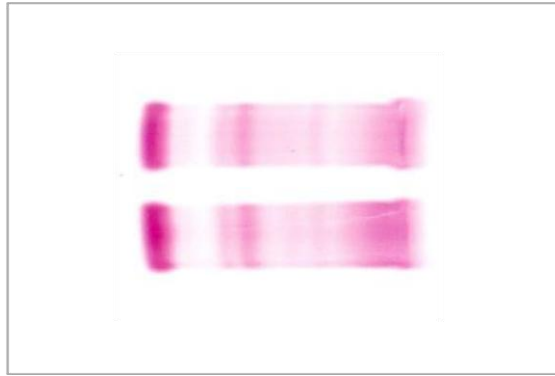


Figura 5: Proteínas séricas separadas em bandas eletroforéticas e coradas com Ponceau. Adaptado de Eckersall, 2008.

Após a coloração, é possível identificar as frações proteicas em sua ordem de migração (LASSEN, 2007a). A quantificação é obtida por densitometria, que permite a formação de um traçado gráfico das proteínas e o cálculo das respectivas porcentagens (NAUOM, 1999; LASSEN, 2007a).

### **3. CAPÍTULO II**

#### **MANUSCRITO**

Os resultados dessa dissertação são apresentados na forma de manuscrito, de acordo com as normas a qual esse foi submetido:

#### **Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi***

Autores: Márcio Machado Costa, Aleksandro Schafer da Silva, Patrícia Wolkmer, Régis Adriel Zanette, Raqueli Teresinha França, Silvia Gonzalez Monteiro, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

De acordo com as normas para a submissão em:

Preventive Veterinary Medicine



**Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi***

**Márcio Machado Costa<sup>a\*</sup>, Aleksandro Schafer da Silva<sup>b</sup>, Patrícia Wolkmer<sup>a</sup>, Régis  
Adriel Zanette<sup>b</sup>, Raqueli Teresinha França<sup>a</sup>, Silvia Gonzalez Monteiro<sup>b</sup>, Sonia Terezinha  
dos Anjos Lopes<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Small Animals Department, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, Brazil

<sup>b</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa  
Maria - RS, Brazil

\*Corresponding author: Departamento de Pequenos Animais da UFSM. Faixa de Camobi -  
Km 9, Campus Universitário, Santa Maria – RS, Brasil. Hospital Veterinário, Sala 109,  
97105-900. Fone: +55 55 3220-8814 and Fax: +55 55 3220-8958

E-mail address: marmcvet@yahoo.com.br (M.M. Costa)

## Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the electrophoretic pattern of serum proteins in *Trypanosoma evansi*-infected cats during different periods of infection. Thirteen adult female non-breeding *Felis catus* were separated into two groups. Cats from the infected group (n=7) were intraperitoneally inoculated with a strain of *T. evansi*, and cats from the control group (n=6) received a physiological solution. Blood samples were collected at days 0, 7, 21, and 35 for evaluation total protein and protein fractions by electrophoresis. Albumin ( $P < 0.01$ ), alpha-2 globulin and gamma globulin ( $P < 0.05$ ) concentrations were statistically different from the seventh day post-inoculation. Beta globulin levels were increased from day 21 ( $P < 0.05$ ). Alpha-1 globulin fraction did not statistically differ. These results indicate that the infection by *T. evansi* in cats alters the serum protein electrophoretic profile. Thus, the increase in  $\gamma$ -globulin fraction is a common finding in infection by *T. evansi*, caused mainly by increased IgM and IgG. However, the  $\alpha_2$ -globulin subfraction showed increase throughout the experimental period and, possibly, the proteins of this subfraction are directly involved in host defense against flagellate. Thereby, further studies is essential to define the true role of each protein fraction in the control of infection.

**Keywords:** protein electrophoresis, felines, trypanosomosis.

### 1. Introduction

Trypanosomosis is a disease known to affect camels, horses, bovines, caprines, swines, dogs, elephants, capybaras, coatis, tapirs, deers, rabbits and humans (Silva et al., 2002; Joshi et al., 2005; Da Silva et al., 2007). Surra, as the disease is known in India, is

caused by the *Trypanosoma evansi*, a digenetic protozoan of the section Salivaria. Widely distributed in the north of the African continent, India, Philippines, Malaysia, China, Russia and in the Central and South America (Silva et al., 2002), the equine trypanosomosis in Brazil is called “hind limb disease” due to the paralysis of the hind limbs and consequent motor incoordination showed by infected animals (Herrera et al., 2004).

The parasite is mechanically transmitted mainly due to vectors of the genus *Tabanus*, although insects of the genus *Stomoxys*, *Haematopota* and *Lypersia* can also spread the disease (Silva et al., 2002). The vampire bat *Desmodus rotundos* act as reservoir and vector of the protozoan in Latin America (Taylor and Authié, 2004).

The diagnosis of trypanosomosis is based in parasitological exams, as peripheral blood smear evaluation, xenodiagnosis, and microhematocrit techniques; immunology, where serology and indirect immunofluorescence assays are applied; and molecular, with the polymerase chain reaction (PCR) test (Taylor and Authié, 2004). Complementary exams as hemogram and serum biochemistry are also used. Increased total protein levels are often reported in *T. evansi* infections (Romdhane et al., 1999; Aquino et al., 2002; Rodrigues et al., 2005; Da Silva et al., 2007).

Electrophoresis is a technique employed in the separation of two different plasmatic proteins, making possible the determination of their relative proportions in a sample (Bush, 2004). The alteration pattern of these fractions is rarely patognomonic for a specific disease, although is a useful data when interpreted concomitantly with other clinical and laboratory findings (Thomas, 2000).

Tarello et al. (2005) reported the first three cases of natural infection by *T. evansi* in cats. The role of this species in the life cycle of the parasite is still uncertain, as well as the immunological answer of the felines to the parasite. To address this issue, the present study

aimed at evaluating the serum protein electrophoretic profile of cats experimentally infected by *T. evansi* in the acute and chronic phases of the disease.

## 2. Material and Methods

Thirteen adult female non-breeding *Felis catus* were used. Animals were kept in individual cages with temperature and humidity controlled at 23 °C and 70%, respectively. They were fed with commercial ration and water ad libitum. All animals received a formulation containing pyrantel pamoate, praziquantel, and fenbendazole and were submitted to a period of 30 days for adaptation. Hematological (erythrogram, leukogram, and platelet count) and biochemical (hepatic and renal function) examinations were performed three times at 15-day intervals.

Cats were divided in two groups, a control group with six animals and an infected group with seven animals. They were inoculated intraperitoneally with a strain of *T. evansi* that had been obtained from a naturally infected dog (Colpo et al., 2005) and had been kept in liquid nitrogen. The infected group received  $10^8$  infectious trypomastigote forms of *T. evansi*; whereas, the control group received a physiological solution. Parasitemia was estimated daily by microscopic examination of smears. Each slide was mounted with blood collected from the tail vein, stained by the panoptic method, and visualized at a magnification of 1,000×.

Blood samples were collected at days 0, 7, 21, and 35 by jugular puncture after anesthesia with ketamine ( $0.08 \text{ mL kg}^{-1}$ ) and xylazine ( $0.05 \text{ mL kg}^{-1}$ ). Samples without anticoagulant were centrifuged for 10 minutes and serum was kept deep frozen until analysis. Blood with anticoagulant was also collected for hematocrit evaluation. During experimental period, the animals were monitored for physical exam, which consisted of cardiorespiratory frequency, rectal temperature, body weight and color of mucous membranes.

Total protein was determined using commercial reagents (Labtest<sup>®</sup>) and analyzed in an automatic biochemical analyzer (Bioplus<sup>®</sup> 2000). The protein fractionation was determined using cellulose acetate strip electrophoresis in a horizontal cube (Labex<sup>®</sup>), with Tris-glycine buffer (pH 8.6). Samples were applied to the strips and run using a constant voltage of 150 volts for 25 minutes. Strips were stained with Ponceau for 15 minutes. 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 seconds and washed for 1 minute with a destain solution. Strips were dried at 60 °C for 15 minutes (Naoum, 1999) and read by the Denscan system. The fractions analyzed were the albumin, alpha-1, alpha-2, beta and gamma globulins.

The data were submitted to analysis of variance followed by the Tukey's test ( $P < 0.05$ ). The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of Federal University de Santa Maria, number 23081.002891/2008-47, in accordance to Brazilian laws and ethical principles published by the Brazilian College of Animal Experimentation.

### **3. Results and Discussion**

The animals on day 0 of the experiment showed hematologic and biochemical values within the normal reference ranges (Feldman et al., 2000; Bush, 2004). Examination of the peripheral blood smears showed a prepatent period ranging between 24 and 48h in the infected cats, with the peak of parasitemia recorded at day 5 PI (10 to 15 trypanosomes per microscopic field at 1,000x magnification). Thereafter, irregular waves of parasitemia ranging from zero to three trypomastigotes per microscopic field were observed, as observed in previous study (Choudhury and Misra, 1972).

Clinical signs as vomiting, diarrhea, hyperthermia, progressive weight of loss, edema of the face tissues, corneal opacity and lymphadenopathy were observed in the present study. These findings are consistent with those found in felines naturally or experimentally infected

by this protozoan (Choudhury and Misra, 1972; Tarello, 2005). Along with the clinical signs a significant decrease in hematocrit levels ( $P < 0.05$ ) was observed from the seventh day PI onwards (Table 1). Anemia has been frequently reported in horses and dogs infected by *T. evansi* (Aquino et al., 2002; Rodrigues et al., 2005; Da Silva et al., 2009).

The results of total proteins, alpha-1, alpha-2, beta and gamma globulins are observed in Table 1. Total protein levels were increased from day 21 PI ( $P < 0.01$ ), in accordance to other studies (Romdhane et al., 1999; Aquino et al., 2002; Da Silva et al., 2007). Notwithstanding, the protein total levels were only above reference values at day 35 PI (Bush, 2004). This might be related to the increase in globulin levels (Lassen, 2007) due to the antigenic stimulation caused by the trypanosomes.

A decrease in albumin levels was observed in the infected cats from the seventh day PI ( $P < 0.01$ ). These levels were above the normal physiological range (Bush, 2004) at the end of the experiment. Hypoalbuminemia is a common finding in dogs, rabbits and rats infected by the *T. evansi evansi* (Aquino et al., 2002; Hosseininejad et al., 2007; Da Silva et al., 2007; Teixeira et al., 2008). However, hypoalbuminemia was not observed in reports involving buffaloes and goats, indicating different responses to the infection in different animal species (Hilali et al., 2006; Patelli et al., 2008).

Several hypotheses have been proposed to explain the hypoalbuminemia observed in the animals infected by the *T. evansi*. The decrease in albumin levels would imply in a compensatory mechanism for the maintenance of plasma osmolarity, since hypoalbuminemia is followed by the development of hyperglobulinemia (Aquino et al., 2002). The hypoalbuminemia might be related to liver impairment as demonstrated by low alanine aminotransferase levels in rabbits experimentally infected (Da Silva et al., 2007). And, furthermore, the decreased albumin levels may be in consequence of high vascular

permeability and outward movement of proteins to the interstitial space (Hosseininejad et al., 2007), what may explain the generalized edema observed in the felines of our study.

The mechanism that alters protein synthesis is related to the binding of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6) to the inflammatory sites. Interleukin 1 (IL-1) may be the key cytokine in the modulation of protein synthesis by hepatocytes, responsible for the decrease in the production of albumin and transferrin and the increase in positive proteins as haptoglobin, C-reactive protein and others. Moreover, the interleukin 6 (IL-6) mediates the release of acute phase proteins in the bloodstream (Paltrinieri, 2008). Therefore, our study is in accordance to Paltrinieri (2008) since the decrease in albumin levels was observed seven days PI.

No significative alteration was observed in the alpha-1 globulin subfraction. However, the alpha-2 globulin fraction increased in the infected animals from the seventh day PI ( $P < 0.05$ ). No marked changes in the alpha globulin fractions are reported in *T. evansi*-infected animals (Boyd et al., 1980; Monzón and Villavicencio, 1990; Romdhane et al., 1999). The alpha-2-macroglobulin, the ceruplasmin, the serum amyloid and the haptoglobin are among the proteins present in the alpha-2 fraction (Eckersall, 2008). The increase in this fraction is due to the alpha-2 subfraction, often increased in the acute inflammatory diseases. Thus, as the main responsive acute phase proteins in cats are the haptoglobin, the serum amyloid and the alpha-1-acid glycoprotein (Paltrinieri, 2008) the increase observed in the alpha-2 subfraction might be due to the increase of one or more of these proteins.

An increase in the beta globulin fraction from 21 days of infection was observed ( $P < 0.05$ ), although values remained within the normal range (Bush, 2004). Similar results were observed in the proteinogram of a naturally infected dog (Franciscato et al., 2007). Other studies showed a decrease in beta globulin values, but the causes for this remain unclear (Monzón and Villavicencio, 1990; Hosseininejad et al., 2007).

The beta globulin fraction is composed of many acute phase proteins, as fibrinogen, complement C3 and C4 components, C-reactive protein and ferritin (Eckersall, 2008). In relation to this point, C3 is the most important central molecule in the complement system, since it is the main activator of the complement cascade (Tizard, 2002). Uche and Jones (1993) reported the importance of the C3 component in the immune response, since its depletion can determine the course of the infection and the response of the animal to a second exposition to the agent. Thus, due to the importance of the complement in *T. evansi* infections, the increase in beta-globulin fraction might be caused by the higher activity of this system.

The gamma globulins were statistically increased ( $P < 0.05$ ) from the seventh day, and above the normal physiological range from 21 days PI onwards. This fraction is composed by the immunoglobulins IgM, IgG, IgA, IgE and IgD, which are produced only by the lymphoid tissue (Kaneko, 1997). The increase in the gamma globulin fraction is reported in camels, guinea pigs, horses, dogs and feral camels infected with *T. evansi* (Boid et al., 1980; Monzón and Villavicencio, 1990; Romdhane et al., 1999; Hosseinijad et al., 2007). The polyclonal gammopathies are characterized by the increase in the gamma fraction, with a large area under the electrophoretic curve due to the production of heterogeneous immunoglobulins. In general, the polyclonal gammopathies are consequence of a chronic infection or the prolonged presence of a foreign body (Lassen, 2007). Animal trypanosomosis is often characterized by high IgM levels (Taylor and Authié, 2004), which are directly involved in the control of parasitemia and host survival (Baral et al., 2007). Moreover, Uche and Jones (1993) reported increased IgG and IgM levels in *T. evansi*-infected rabbits. Thus, the increased gamma globulin levels observed in our study might be due to the increase in the immunoglobulin levels.



The acute phase of infection includes the first 7 days PI. During this period, there is an increase of alpha-2 globulin subfraction associated with an increase in gamma globulin fraction. This increase is attributed to the posterior peak of parasitemia, promoting antigenic stimulation, release of acute phase proteins and immunoglobulins. In the chronic phase of infection, which starts from 21 days PI, there is an increase in the beta globulin fraction, together with the high subfraction alpha-2 and gamma fraction. Increased beta globulin fraction associated with an increase in gamma globulin fraction characterizes an inflammation or chronic infection (Thomas, 2000). However, there was no decrease in alpha-2 globulin subfraction. The constant antigen stimulation is due to the changes of surface glycoproteins of African trypanosomes (Stijlemans et al., 2007), promoting production and constant release of both acute phase proteins, and immunoglobulins.

Based upon our results it is concluded that cats infected by *T. evansi* show changes in the electrophoretic profile from the seventh day PI onwards. Probably, the increase in globulin fractions is related to the immunological response of the animals to the parasite. Thus, the increase in  $\gamma$ -globulin fraction is a common finding in infection by *T. evansi*, caused mainly by increased IgM and IgG. However, the  $\alpha_2$ -globulin subfraction showed increase throughout the experimental period and, possibly, the proteins of this subfraction are directly involved in host defense against flagellate. Thereby, further studies is essential to define the true role of each protein fraction in the control of infection.

## 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 54, 8-18.
- Baral, T.N., Baetselier, P.D., Brombacher, F., Magez, S., 2007. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 195, 1513-1520.
- Boid, R., Luckins, A.G., Rae, P.F., Gray, A.R., Mahmoud, M.M., Malik, K.H., 1980. Serum immunoglobulin levels and electrophoretic patterns of serum proteins in camels infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* 6, 333-345.
- Bush, B.M., 2004. Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais. Roca, São Paulo, 376 pages.
- Colpo, C.B., Monteiro, S.G., Stainki, D.R., Colpo, E.T., Henriques, G.B., 2005. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. *Ciênc. Rural* 35, 717-719.
- Choudhury, A., Misra, K.K., 1972. Experimental infection of *T. evansi* in the cat. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66, 672-673.
- Da Silva, A.S., Costa, M.M., Cargnelutti, J.F., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2007. Alterações bioquímicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 16, 43-46.
- Da Silva, A.S., Costa, M.M., Wolkmer, P., Zanette, R.A., Faccio, L., Gressler, L.T., Dorneles, T.E.A., Santurio, J.M., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2009. *Trypanosoma evansi*: Hematologic changes in experimentally infected cats. *Exp. Parasitol.*, San Diego, v. 123, p. 31-34.

- Eckersall, P.D., 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. Academic Press, San Diego, 5, 117-156.
- Feldman, B.V., Zinkl, J.G., Jain, N.C., 2000. Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1344 pages.
- Franciscato, C., Lopes, S.T.A., Teixeira, M.M.G., Monteiro, S.G., Wolkmer, P., Garmatz, B.C., Paim, C.B., 2007. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS. Ciênc. Rural 37, 288-291.
- Herrera, H.M., Dávila, A.M.R., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., D'Andrea, P.S., Jansen, A.M., 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in pantanal, Brasil. Vet. Parasitol. 125, 263-275.
- Hilali, M., Abdel-Gawad, A., Nassar, A., Abdel-Wahab, A., 2006. Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. Vet. Parasitol. 139, 237-243.
- Hosseininejad, M., Shirani, D., Nabian, S., Nassiri, S.M., Mazaheri, R., 2007. *Trypanosoma evansi* in three dogs in Iran. Comp. Clin. Pathol. 16, 69-71.
- Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Powar, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., Dani, V.S., Bhargava, J.J., Truc, P., 2005. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in Índia: the first case report. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73, 491-495.
- 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. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. Roca, São Paulo, 26, 376-387.
- Monzón, C.M., Villavicencio, V.I., 1990. Serum proteins in guinea-pigs and horses infected with *Trypanosoma evansi* (steel, 1885). Vet. Parasitol. 36, 295-301.

- Naoum, P.C., 1999. Proteínas plasmáticas. In: Naoum, P.C. Eletroforese – Técnicas e Diagnóstico. Santos, São Paulo, 2, 13-38.
- Paltrinieri, S., 2008. The feline acute phase reaction. *Vet. J.* 177, 26-35.
- Patelli, T.H.C., Marques, L.C., Fagliari, J.J., Silva, P.C., 2008. Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 45, 481-487.
- Rodrigues, A., Figuera, R.A., Souza, T.M., Schild, A.L., Soares, M.P., Milano, J., Barros, C.S., 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.
- Romdhane, S.B., Jemli, M.H., Romdane, M.N., 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 Méd. Vét.* 150, 951-956.
- 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, 2002, 141 pages.
- Stijlemans, B., Guilliams, M., Raes, G., Beschin, A., Magez, S., Baetselier, P., 2007. African trypanosomosis: From immune escape and immunopathology to immune intervention. *Vet. Parasitol.* 148, 3-13.
- Tarello, W., 2005. *Trypanosoma evansi* infection three cats. *Revue Méd. Vét.* 156, 133-134.
- 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, 18, 331-354.

- Teixeira, M.C.A., Marques, L.C., Cadioli, F.A., Fagliari, J.J., Machado, R.Z., Silva, P.C., 2008. Proteinogama sérico de ratos Wistar experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 60, 1447-1453.
- Tizard, I.R., 2002. Sistema complemento. In: Tizard, I.R. Imunologia Veterinária: uma introdução. Roca, São Paulo, 16, 190-200.
- Thomas, J.S., 2000. Overview of plasma proteins. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. Schalm's veterinary hematology. Lippincott, Philadelphia, 134, 891-898.
- 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*. Vet. Parasitol.. 47, 205-213.

**Table 1** – Means and standard deviations of hematocrit, total proteins, albumin, alpha-1 and 2, beta and gamma globulins of control and *Trypanosoma evansi*-infected cats

Parameters	Days	Control group	Infected group	Reference*
Hematocrit (%)	00	32.8 <sup>a</sup> (±2.48)	30.4 <sup>a</sup> (±2.07)	25 – 45
	07	31.4 <sup>a</sup> (±2.50)	24.8 <sup>b</sup> (±1.06)	
	21	31.5 <sup>a</sup> (±1.87)	24.2 <sup>b</sup> (±3.03)	
	35	30.8 <sup>a</sup> (±0.98)	24.7 <sup>b</sup> (±1.79)	
Total proteins (g/dL)	00	7.42 <sup>a</sup> (±0.44)	7.63 <sup>a</sup> (±0.18)	5.8 – 8.0
	07	7.40 <sup>a</sup> (±0.26)	7.56 <sup>a</sup> (±0.16)	
	21	7.20 <sup>a</sup> (±0.30)	8.06 <sup>b</sup> (±0.35)	
	35	7.02 <sup>a</sup> (±0.25)	8.21 <sup>b</sup> (±0.32)	
Albumin (g/dL)	00	3.32 <sup>a</sup> (±0.33)	3.11 <sup>a</sup> (±0.37)	2.5 – 4.0
	07	3.42 <sup>a</sup> (±0.25)	2.77 <sup>b</sup> (±0.30)	
	21	3.26 <sup>a</sup> (±0.31)	2.54 <sup>b</sup> (±0.35)	
	35	2.90 <sup>a</sup> (±0.15)	2.31 <sup>b</sup> (±0.30)	
Alpha-1 globulin (g/dL)	00	0.82 <sup>a</sup> (±0.06)	0.90 <sup>a</sup> (±0.15)	0.2 – 1.1
	07	0.85 <sup>a</sup> (±0.22)	0.81 <sup>a</sup> (±0.13)	
	21	0.90 <sup>a</sup> (±0.10)	0.92 <sup>a</sup> (±0.11)	
	35	0.75 <sup>a</sup> (±0.12)	0.84 <sup>a</sup> (±0.11)	
Alpha-2 globulin (g/dL)	00	0.76 <sup>a</sup> (±0.25)	0.74 <sup>a</sup> (±0.22)	0.4 – 0.9
	07	0.64 <sup>a</sup> (±0.18)	0.94 <sup>b</sup> (±0.21)	
	21	0.49 <sup>a</sup> (±0.14)	0.92 <sup>b</sup> (±0.13)	
	35	0.70 <sup>a</sup> (±0.19)	1.12 <sup>b</sup> (±0.25)	
Beta globulin (g/dL)	00	0.86 <sup>a</sup> (±0.14)	0.99 <sup>a</sup> (±0.24)	0.7 – 1.6
	07	1.00 <sup>a</sup> (±0.17)	1.01 <sup>a</sup> (±0.12)	
	21	1.00 <sup>a</sup> (±0.16)	1.18 <sup>b</sup> (±0.11)	
	35	0.93 <sup>a</sup> (±0.12)	1.16 <sup>b</sup> (±0.15)	
Gamma globulin (g/dL)	00	1.66 <sup>a</sup> (±0.17)	1.89 <sup>a</sup> (±0.27)	1.5 – 3.5
	07	1.51 <sup>a</sup> (±0.12)	2.03 <sup>b</sup> (±0.41)	
	21	1.55 <sup>a</sup> (±0.30)	2.49 <sup>b</sup> (±0.47)	
	35	1.74 <sup>a</sup> (±0.12)	2.78 <sup>b</sup> (±0.29)	

P.s.: Means followed by the same letter in the line do not differ among themselves by the Tukey test at 5% of probability. \*Bush (2004) and Feldman et al. (2000).

#### 4. CONCLUSÃO

A infecção por *T. evansi* em gatos doméstico acarreta mudanças no perfil eletroforético das proteínas a partir do sétimo dia PI. Provavelmente, o aumento das frações de globulinas esteja relacionado à resposta imunológica frente ao parasito. Assim, o aumento na fração  $\gamma$ -globulina é um achado frequente na infecção pelo *T. evansi*, causado principalmente pelo aumento da IgM e IgG. Contudo, a subfração  $\alpha_2$ -globulina apresentou aumento em todo o período experimental e, possivelmente, as proteínas dessa fração estejam diretamente envolvidas na defesa do hospedeiro contra o flagelado. Desse modo, é fundamental que novos estudos sejam realizados para definir o verdadeiro papel de cada proteína dessa fração no controle da infecção.

## 5. REFERÊNCIAS

AQUINO, L.P.C.T. Importância da infecção por *Trypanosoma evansi* em cães no Brasil, 2007. Disponível em : <[http://www.fav.br/programasinst/Revistas/revistas2007/veterinaria/Importancia\\_da\\_infeccao.pdf](http://www.fav.br/programasinst/Revistas/revistas2007/veterinaria/Importancia_da_infeccao.pdf)> Acesso em: 29 dez. 2009.

\_\_\_\_\_ et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 255-260, 1999.

\_\_\_\_\_ et al. Hematological, bioquimical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 1, p. 8-18, 2002.

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

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

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

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

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



CHOUHDURY, A.; MISRA, K.K. Experimental infection of *T. evansi* in the cat. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 672-673, 1972.

DA SILVA, A.S. et al. *Trypanosoma evansi*: hematologic changes in experimentally infected cats. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 123, p. 31-34, 2009a.

\_\_\_\_\_ et al. *Trypanosoma evansi*: levels of copper, iron, and zinc in the bloodstream of infected cats. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 123, p. 35-38, 2009b.

\_\_\_\_\_ et al. Clotting disturbances in *Trypanosoma evansi*-infected cats. **Comparative Clinical Pathology**, Londres, 2009c. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/r32613nx4757232v/?p=1a235ae70be94c81a663f6853d58b306&pi=1>> Acesso em: 29 dez. 2009.

\_\_\_\_\_ et al. Diminazene aceturate in the control of *Trypanosoma evansi* infection in cats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, p. 47-50, 2009d.

\_\_\_\_\_ et al. Clinical aspects of cats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Comparative Clinical Pathology**, Londres, 2009e. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/c6m0v60q52454486/?p=d02b73b6721c461790c1bd7272900c08&pi=0>> Acesso em: 29 de dez. 2009.

\_\_\_\_\_ et al. Influence of *Trypanosoma evansi* in boold, plasma, and braincholinesterase of experimentally infected cats. **Research in Veterinary Science**, Oxford, 2009f. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WWR-4X9D5F7-2&\\_user=10&\\_coverDate=04%2F30%2F2010&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1251736082&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=c9f9b2e6f1610794e01100df4858f0df](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WWR-4X9D5F7-2&_user=10&_coverDate=04%2F30%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1251736082&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=c9f9b2e6f1610794e01100df4858f0df)> Acesso em: 29 dez. 2009.

\_\_\_\_\_ et al. Pathological findings associated with experimental infection by *Trypanosoma evansi* in cats. **Journal of Comparative Pathology**, Oxford, 2009g. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WHW-4XTYD6K-](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WHW-4XTYD6K-)

7&\_user=10&\_coverDate=04%2F30%2F2010&\_alid=1251739544&\_rdoc=1&\_fmt=high&\_orig=search&\_cdi=6861&\_sort=r&\_docanchor=&view=c&\_ct=36&\_acct=C000050221&\_version=1&\_urlVersion=0&\_userid=10&md5=7f839837bb0ef03dc97db69eca9af3f1> Acesso em: 29 dez. 2009.

DAMAYANTI, R.; GRAYDON, R.J.; LADDS, P.W. The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Comparative Pathology**, Oxford, v. 110, p. 237-252, 1994.

DARGENTES, A.P. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. ii. pathology. **Journal of Comparative Pathology**, Oxford, v. 133, p. 267-276, 2005.

ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. cap. 5, p. 117-148.

EISLER, M.C. et al. Diagnosis and epidemiology of African animal trypanosomiasis. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P.H.; MILES, M.A. **The trypanosomiases**. London: CABI publishing, 2004. cap. 14, p. 253-268.

FRANCISCATO, C. et al. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 288-291, 2007.

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

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Bioquímica clínica de proteínas e compostos nitrogenados. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução a bioquímica clínica veterinária**. 2. ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. cap. 3, p. 81-119.

HAWKING, F. The resistance of *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. evansi* to human plasma. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 405-407, 1978.

HERRERA, H.M. et al. *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 209-216, 2001.

\_\_\_\_\_ et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 81, p. 203-210, 2002.

\_\_\_\_\_ et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in pantanal, Brasil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, p. 263-275, 2004.

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

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

JAIN, N.C. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.

JOSHI, P.P. et al. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in Índia: the first case report. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 73, n. 3, p. 491-495, 2005.

LASSEN, E.D.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em medicina veterinária. In: THRALL, M.A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veretινάρια**. São Paulo: Roca, 2007a. cap. 1, p. 376-387

\_\_\_\_\_. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sangüíneo. In: THRALL, M.A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veretινάρια**. São Paulo: Roca, 2007b. Cap. 26, p. 3-36.

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

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

MIRÓ, G. et al. Plasma electrophoretogram in feline immunodeficiency virus (FIV) and/or feline leukaemia virus (FeLV) infections. **Journal of Veterinary Medicine series A**, Malden, v. 54, p. 203-209, 2007.

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

NAOUM, P.C. Proteínas plasmáticas. In: NAUM, P.C. **Eletroforese – técnicas e diagnóstico**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1999. cap. 2, p. 13-38.

NUNES, V.L.B et al. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma evansi* no pantanal sul-mato-grossense: estudo de reservatórios. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 41-44, 1993.

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

\_\_\_\_\_ et al. Evaluation of inflammation and immunity in cats with spontaneous parvovirus infection: consequences of recombinant feline interferon- $\omega$  administration. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 118, p. 68-74, 2007.

\_\_\_\_\_. The feline acute phase reaction. **The Veterinary Journal**, Oxford, v. 177, p. 26-35, 2008.

PATELLI, T.H.C. et al. Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, p. 481-487, 2008. Suppl.

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

RODRIGUES, A.M.A; ZANUTTO, M.S.; HAGIWARA, M.K. Concentrações séricas de proteína total, albumina e gamaglobulinas em gatos infectados pelo Vírus da imunodeficiência felina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 153-158, 2007.

SALEH, M.A.; AL-SALAHY, M.B.; SANOUSI, S.A. Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, p. 192-199, 2009.

SEIDL, A. et al. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 33, p. 219-234, 1998.

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

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

SILVA, A.S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videiras – SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 373-376, 2007a.

\_\_\_\_\_ et al. Infecção via oral por *Trypanosoma evansi* em animais de laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 897-900, 2007b.

\_\_\_\_\_ et al. Alterações hematológicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 538-542, 2008.

\_\_\_\_\_; PEREIRA, P.L.; MONTEIRO, S.G. Achados patológicos, sinais clínicos e ganho de peso de coelhos infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 93-98, 2009.

SILVA, R.A.M.S. et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 60, p. 167-171, 1995a.

\_\_\_\_\_; BARROS, A.T.M.; HERRERA, H.M. Trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil. A preliminary approach on risk factors. **Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, France, v. 4, n. 3, p. 315-319, sept. 1995b.

\_\_\_\_\_ et al. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 233-238, 1995c.

\_\_\_\_\_ et al. *Trypanosoma evansi* on the blood chemistry and hematology of coats (*Nasua nasua*) naturally infected in the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, p. 110, 1997. Suppl. 1.

\_\_\_\_\_ et al. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – biologia, diagnóstico e controle**. Corumba: Embrapa Pantanal, 2002. 141 p.

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

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

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

THOMAS, J.S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, 2000a. cap. 134, p. 891-898.

\_\_\_\_\_. Protein electrophoresis. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, 2000b. cap. 135. p. 899-903.

UCHE, U.E., JONES, T.W. Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. **Jouranal of Comparative Pathology**, Oxford, v. 106, p. 299-309, 1992.

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 domestics and wild mammals. **The Journal of Parasitology**, Lincoln, v. 86, n. 6, p. 1289-1298, 2000.

WERNER, L.L.; TURNWALD, G.H. Immunologic and plasma protein disorders. In: WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G.H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 3<sup>a</sup> ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999. cap. 12, p. 248-264.

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

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