

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ACETURATO DE DIMINAZENO ASSOCIADO AO  
SELENITO DE SÓDIO E A VITAMINA E: TESTES *IN  
VITRO* E EM RATOS EXPERIMENTALMENTE  
INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Alexandre Alberto Tonin**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2012**

**ACETURATO DE DIMINAZENO ASSOCIADO AO SELENITO  
DE SÓDIO E A VITAMINA E: TESTES *IN VITRO* E EM RATOS  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM  
*Trypanosoma evansi***

**Alexandre Alberto Tonin**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Mario Luiz De La Rue**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

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

**ACETURATO DE DIMINAZENO ASSOCIADO AO SELENITO DE  
SÓDIO E A VITAMINA E: TESTES *IN VITRO* E EM RATOS  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM  
*Trypanosoma evansi***

elaborada por  
**Alexandre Alberto Tonin**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Mario Luiz De La Rue, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Marta Lizandra do Rêgo Leal, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, Janeiro de 2012.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:*

*Meus pais, Enio e Claer, e a minha irmã, Paula;*

*Por sempre acreditarem em mim sem nunca medirem esforços  
para a realização de meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, criador de todas as coisas, pela vida e pela oportunidade de poder a cada dia aprender mais.

Agradeço aos meus pais, Enio e Claer, pela formação educacional, confiança, carinho e por terem sempre me guiado pelo caminho da simplicidade e do bem. Agradeço a minha irmã, Paula, pelo amor, amizade, carinho e ternura. Estes são os meus exemplos de vida, minha fonte de inspiração e admiração. Aos todos os demais familiares, muito obrigado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Luiz de La Rue, pela confiança, ensinamentos e por abrir todas as portas para que eu pudesse trilhar o meu caminho. Agradeço também a Co-Orientação das Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Silvia G. Monteiro e Sonia Terezinha dos Anjos Lopes pelos ensinamentos e toda ajuda ao disponibilizarem a estrutura do LAPAVET e LACVET para a realização deste trabalho.

De uma maneira geral agradeço aos meus grandes amigos, principalmente pelo apoio nos momentos de dificuldade no início deste mestrado. Um agradecimento mais do que especial aos meus eternos amigos do LABLEPTO, por todo o apoio educacional, financeiros e motivacionais fundamentais para a conclusão de mais esta etapa. Muito obrigado ao Prof. Maneco, aos meus grandes amigos Jorge e Paulo, e a todos os estagiários que dividiram o laboratório comigo.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia (UFSM) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela possibilidade de realização deste mestrado.

Reservo este último parágrafo para agradecer de maneira especial ao meu mais do que amigo, um verdadeiro irmão, e agora Dr. Prof. Aleksandro Schafer da Silva - "*Aleks*"-. Muito obrigado por todo o conhecimento passado, pela amizade, simplicidade e, fundamentalmente, por toda a ajuda durante o meu mestrado. Se não fosse pela tua ajuda e amizade e paciência, nada disso estaria acontecendo.

*MUITO OBRIGADO !!!*

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*JOSÉ ALENCAR*

## RESUMO

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

### **ACETURATO DE DIMINAZENO ASSOCIADO AO SELENITO DE SÓDIO E A VITAMINA E: TESTES *IN VITRO* E EM RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi***

Autor: Alexandre Alberto Tonin  
Orientador: Dr. Mario Luiz De La Rue  
Data da Defesa: Santa Maria, 27 de Janeiro de 2012.

O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de um tratamento padrão contra a infecção causada pelo *T. evansi*, baseado na utilização do aceturato de diminazeno associado ao selenito de sódio e a vitamina E. Os testes *in vitro* mostraram um efeito tripanocida relacionados ao tratamento com aceturato de diminazeno e selenito de sódio; contudo a vitamina E não gerou nenhum efeito nocivo sobre o tripanossomas. Experimentos *in vivo* utilizaram um total de 72 fêmeas adultas de ratos, separados em 9 grupos (A, B, C, D, E, F, G, H e I), com 8 animais cada grupo. O grupo A serviu como grupo não infectado; grupos de B a I foram infectados com 0,2 mL de sangue contendo  $10^6$  tripanossomas. A parasitemia foi estimada diariamente por exame microscópico de esfregaços sanguíneo. O grupo B serviu como controle positivo; grupo C, tratado com aceturato de diminazeno; grupo D, com selenito de sódio; grupo E, com vitamina E; grupo F, recebeu uma associação de aceturato de diminazeno e selenito de sódio; grupo G, associação de aceturato de diminazeno e vitamina E; grupo H, associação de aceturato de diminazeno, selenito de sódio e vitamina E; e por fim o grupo I o qual recebeu uma associação de selenito de sódio e vitamina E. O aceturato de diminazeno foi administrado em dose única no 3º dia pós-infecção (PI). Selenito de sódio e vitamina E foram administradas no 3º e 23º dias PI. Os testes *in vivo* mostraram aumento da longevidade nos grupos tratados com aceturato de diminazeno associado ao selenito de sódio (grupos F e H). Não foi encontrada diferença entre os grupos C e E, portanto, a vitamina E não aumentou a eficácia do tratamento contra *T. evansi* quando associado ao aceturato de diminazeno. A eficácia curativa dos tratamentos foi de 37.5, 87.7, 37.7 e 75% para os grupos C, F, G e H, respectivamente. Os demais tratamentos não mostraram eficácia. Assim, podemos sugerir que o selenito de sódio, quando combinado com a quimioterapia pode representar uma alternativa no tratamento da tripanossomose.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma evansi*. Aceturato de diminazeno. Selenito de sódio. Vitamina E. Roedores.

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DIMINAZENE ACETURATE ASSOCIATED TO SODIUM SELENITE AND VITAMIN E: TESTS *IN VITRO* AND IN RATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Trypanosoma evansi***

Author: Alexandre Alberto Tonin  
Advisor: Dr. Mario Luiz De La Rue  
Santa Maria, January 27<sup>th</sup>, 2012.

The aim of this study was to evaluate the utilization of a standard treatment with diminazene aceturate against the infection caused by *T. evansi*, associated to sodium selenite and vitamin E. *In vitro* tests showed trypanocidal effect related to the treatment with diminazene aceturate and sodium selenite, but vitamin E had no harmful effect on the trypanosomes. *In vivo* experiments utilized a total of 72 adult outbred females rats, separated into 9 groups (A, B, C, D, E, F, G, H and I), 8 animals each. Group A was the uninfected group; groups B to I were infected with 0.2 mL of blood containing  $10^6$  trypanosomes. Parasitemia was estimated daily by microscopic examination of blood smears. Group B served as positive control; group C was treated with diminazene aceturate; group D with sodium selenite; group E with vitamin E; group F received an association of diminazene aceturate and sodium selenite; group G received an association of diminazene aceturate and vitamin E; group H received an association of diminazene aceturate, sodium selenite and vitamin E, and group I received an association of sodium selenite and vitamin E. Diminazene aceturate was administered in a single dose on the 3rd day post infection (PI). Sodium selenite and vitamin E were administered at the 3rd and 23rd day PI. *In vivo* tests showed increase of longevity in groups treated with diminazene aceturate associated with sodium selenite (groups F and H). No difference was found between groups C and E, thus the vitamin E did not increase the efficacy of treatment against *T. evansi* when associated to diminazene aceturate. The curative efficacy of treatments was 37.5, 87.7, 37.7 and 75% to the groups C, F, G and H, respectively. Other treatments showed no efficacy. The sodium selenite when combined with chemotherapy may represent an alternative in the treatment of trypanosomosis.

**Keywords:** *Trypanosoma evansi*. Diminazene aceturate. Sodium selenite. Vitamin E. Rodents.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- FIGURA 1 – Animal apresentando dificuldade de locomoção em decorrência de infecção por *Trypanosoma evansi* ..... 17
- FIGURA 2 – Formas tripomastogotas de *Trypanosoma evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos infectados experimentalmente ..... 18
- FIGURA 3 – Transmissão e multiplicação do *Trypanosoma evansi* ..... 19
- FIGURA 4 – Mecanismo de ataque de EROS, partindo da redução monoelétrica do O<sub>2</sub> e os sistemas de defesa antioxidantes ..... 30

### CAPITULO II

- FIGURA 1 – Dose-response effect of diminazene aceturate (A), sodium selenite (B) and vitamin E (C) on the viability of *Trypanosoma evansi in vitro* compared to the control..... 53
- FIGURA 2 – Mean and standard deviation of hematocrit and lymphocytes from animals subjected to the infection by *Trypanosoma evansi* and treatment with diminazene aceturate, sodium selenite, vitamin E and association between these drugs..... 54
- FIGURA 3 – Mean and standard deviation of lipid peroxidation of *Trypanosoma evansi* infected and treated rats compared to the controls at different periods post-inoculation..... 55

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 1 – Compostos quimioterapêuticos e quimioproláticos existentes no mercado internacional, usados para a tripanosomose animal..... 26

TABELA 2 – Produtos usados no tratamento das tripanosomoses por *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* disponíveis no mercado brasileiro..... 27

TABELA 3 – Principais agentes de defesa antioxidante..... 29

### CAPÍTULO II

TABELA 1 – Mean and standard deviation of the pre-patent period, longevity, mortality and success of therapy using treatment with diminazene of aceturate, sodium selenite and vitamin E in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*..... 56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |   |
|---------------------|---|
| CAT                 | Catalase  |
| CATT                | <i>Card Agglutination Test for Trypanosomosis</i>   |
| DEAE                | Dimetilaminoetil Celulose                           |
| DNA                 | Ácido Desoxirribonucléico                           |
| ELISA               | <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>          |
| EROS                | Espécies Reativas de Oxigênio                       |
| G <sub>6</sub> P-DH | Glicose 6 Fosfato Desidrogenase                     |
| GPI                 | Glicosilfosfatidilinositolo                         |
| GSH                 | Glutationa Reduzida                                 |
| GSH-Rd              | Glutationa-Redutase                                 |
| GSH-Px              | Glutationa-Peroxidase                               |
| GSSH                | Glutationa Oxidada                                  |
| IL 1                | Interleucina tipo 1                                 |
| IL 6                | Interleucina tipo 6                                 |
| INF- $\gamma$       | Inferferon-Gama                                     |
| mAECT               | <i>Mini-anion Exchange Centrifugation Technique</i> |
| NADPH               | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato          |
| OIE                 | Organização Internacional de Epizootias             |
| PCR                 | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                    |
| Sec                 | Selenocisteína                                      |
| SeCis               | Selenocisteína                                      |
| SeMet               | Selenometionina                                     |
| SOD                 | Superóxido-dismutase                                |
| TBARS               | <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>      |
| TNF- $\alpha$       | Fator de Necrose Tumoral-Alfa                       |
| VSGs                | Glicoproteínas Variáveis de Superfície              |

## LISTA DE ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| ANEXO A – Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of <i>Trypanosoma evansi</i> infection in rats. <b>Experimental Parasitology</b> . 2011 Jul;128(3):243-9 ..... | 72 |
|--|----|

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>APRESENTAÇÃO</b> .....                          | <b>13</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                          | <b>14</b> |
| <b>CAPITULO I</b> .....                            | <b>16</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....               | <b>16</b> |
| <b>2.1 <i>Trypanosoma evansi</i></b> .....         | <b>16</b> |
| 2.1.1 Aspectos gerais e distribuição .....         | 16        |
| 2.1.2 Ciclo de vida e transmissão .....            | 18        |
| 2.1.3 Patogenicidade e alterações patológicas..... | 20        |
| 2.1.4 Resposta Imune .....                         | 23        |
| 2.1.5 Diagnóstico .....                            | 23        |
| <b>2.2 O Tratamento</b> .....                      | <b>25</b> |
| <b>2.3 Radicais livres e Antioxidantes</b> .....   | <b>28</b> |
| 2.3.1 Selênio .....                                | 30        |
| 2.3.2 Vitamina E.....                              | 31        |
| <b>CAPÍTULO II</b> .....                           | <b>34</b> |
| <b>3 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....                   | <b>34</b> |
| <b>4 CONCLUSÃO</b> .....                           | <b>57</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                           | <b>58</b> |
| <b>ANEXO</b> .....                                 | <b>71</b> |

## APRESENTAÇÃO

Os resultados e a discussão que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo publicado (*Experimental Parasitology*), o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As secções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** se referem somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação.

# 1 INTRODUÇÃO

*Trypanosoma evansi* é um protozoário digenético da seção salivaria, agente etiológico da doença conhecida como “Mal das Cadeiras” ou “Surra” em equinos (SILVA et al., 2002). Apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ocorrer na África, Ásia, América Central e do Sul. Comumente é observado parasitando diversas espécies de animais domésticos e silvestres (SILVA et al., 2002). Os humanos eram considerados refratários à infecção por *T. evansi* (KUBIAK & MOLFI, 1954), entretanto JOSHI e colaboradores (2005) relataram o primeiro caso de infecção pelo parasito em um fazendeiro na Índia e posteriormente uma investigação sorológica identificou 410 pessoas positivas para *T. evansi* pela técnica de *card agglutination test/T. evansi* (CATT) em populações de vilarejos na Índia (SHEGOKAR, 2006).

Os tripomastigotas presentes nos vasos sanguíneos de vertebrados são adquiridos por insetos durante a ingestão de sangue parasitado, sendo a transmissão atribuída principalmente aos tabanídeos (*Tabanus* sp., *Chrysops* sp. e *Hematopota* sp.). Existe também a possibilidade de transmissão por morcegos hematófagos (HOARE, 1972). A doença causada por este protozoário é caracterizada por rápida perda de peso, graus variáveis de anemia, febre intermitente, edema dos membros pélvicos e das partes baixas do corpo e fraqueza progressiva (HERRERA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005).

O aceturato de diminazeno é o produto mais comumente utilizado nas tripanossomoses dos animais domésticos, pois apresenta índice terapêutico maior do que as demais drogas utilizadas nestas espécies. Esta droga também possui atividade contra tripanossomas que são resistentes a outros medicamentos e apresenta baixa incidência de resistência (PEREGRINE & MAMMAM, 1993).

O selenito de sódio é a forma comum do selênio na dieta, reconhecido como um nutriente essencial para alimentação animal e humana (COMBS & GRAY, 1998; COMBS, 1999). Na forma do aminoácido selenocisteína, este é um componente de uma série de enzimas antioxidantes, por exemplo, a glutathiona peroxidase e tioredoxina redutase (ARNER & HOLMGREN, 2000; BRIGELIUS-FLOHE et al, 2000). Entre as funções do sistema imune estão à indução de apoptose e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (FORMAN & TORRES, 2001; MARSDEN & STRASSER, 2003). A vitamina E (alfa-tocoferol) é um nutriente antioxidante natural que desempenha um papel importante na saúde

dos animais através da inativação de radicais livres prejudiciais que são produzidos através da atividade celular normal e também por diversos tipos de estressores. A função antioxidante desse micronutriente poderia, pelo menos em parte, aumentar a imunidade, mantendo a integridade funcional e estrutural de importantes células no sistema imunológico (ARITA et al, 1998;. CHINOY & MEMON, 2001; YOUSEF et al, 2003;. EL-DEMERDASH et al., 2004).

Embora o aceturato de diminazeno geralmente conduza a resultados favoráveis no tratamento das tripanossomoses, muitas vezes quando este é utilizado em dose única o controle da infecção causada pelo *T. evansi* não é obtida com total sucesso, resultando em casos de recorrência da doença. Desta maneira é bastante importante a investigação de novas alternativas na terapêutica, como por exemplo, a associação de drogas a outros diferentes compostos. Devido o papel antioxidante de alguns compostos, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* e *in vivo*, em um modelo experimental, a utilização da terapêutica padrão nas infecções causadas pelo *T. evansi*, baseada no uso do aceturato de diminazeno associado ao selenito de sódio e/ou a vitamina E.



# CAPITULO I

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Trypanosoma evansi*

#### 2.1.1 Aspectos gerais e distribuição

*Trypanosoma* sp. são microorganismos pertencentes ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, sub-filo Sarcomastigophora, superclasse Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Cinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*. Os tripanossomas podem ser distribuídos em duas seções: Salivaria, aqueles transmitidos por picadas de vetores biológicos e Stercoraria, pela contaminação da pele ou das mucosas do hospedeiro com as fezes do vetor (HOARE, 1972). Os gêneros de *Trypanosoma* da seção Salivaria são altamente patogênicos para pessoas e animais domésticos e estão distribuídos em quatro subgêneros: *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*), *Nannomonas* (*T. congolense*, *T. simiae*), *Duttonella* (*T. vivax*) e *Pycnomonas* (*T. suis*) (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004).

A doença causada pela infecção por *T. evansi* é mundialmente conhecida por “Surra”, e na América Latina pode ser também chamada de “Mal das Cadeiras”. Desde a primeira descrição feita por Evans na Índia em 1880, foram relatados casos de tripanossomose por *T. evansi* em praticamente todos os continentes. Esta afeta um grande número de animais domésticos e selvagens, entre eles: cavalos, camelos, bovinos, gatos, caprinos, suínos, cães, búfalos, elefantes, capivaras, quatis, antas, tatus, marsupiais, zebuínos, veados e pequenos roedores silvestres (LEVINE, 1973; SILVA et al., 2002; ATARHOUCHE et al., 2003; HERRERA et al., 2004). Atualmente, esta doença é de notificação obrigatória para a Organização Internacional de Epizootias (OIE), e no Brasil parasita principalmente equínos (FIGURA 1). A doença é endêmica na África, com casos descritos no Egito (AMER et al., 2011), Marrocos (ATARHOUCHE et al., 2003), Sudão (MUSA et al., 1994; ELAMIN et al., 1998), Mauritânia (DIA et al., 1997), Quênia (NGAIRA et al., 2003; NJIRU et al., 2004),

Chade (DELAFOSSÉ & DOUTOUM, 2004) e Etiópia (ZELEKE & BEKELE, 2001). Vários países asiáticos também apresentaram surtos de *T. evansi*: Índia (LAHA & SASMAL, 2008), Israel (BERLIN et al., 2010), China (LUN et al., 1993), Tailândia (PHOLPARK et al., 1999) e Filipinas (DARGANTES et al., 2009). Na Europa, foram detectados casos na Espanha (GUTIERREZ et al., 2000) e França (DESQUESNES et al., 2008). Animais soropositivos foram identificados na Oceania, em Papua Nova Guiné por REID & COPEMAN (2000). Na América do Sul, o *T. evansi* é endêmico em algumas regiões. Segundo DÁVILA & SILVA (2000), há casos no Brasil, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Suriname, Venezuela e Argentina. Recentemente foi relatado o primeiro caso de infecção humana em um fazendeiro, na Índia (JOSHI et al., 2005).



FIGURA 1 – Animal apresentando dificuldade de locomoção em decorrência de infecção por *T. evansi*. Fonte: Rodrigues et al. 2005.

Estima-se que a chegada do *T. evansi* na América do Sul tenha ocorrido no final no século XIX com a importação de cavalos da Espanha (HOARE, 1972; SANTOS et al., 1992). No Brasil, já foram relatados casos de infecção natural no Rio Grande do Sul (COLPO et al., 2005; CONRADO et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007), Mato Grosso do Sul (MOREIRA & MACHADO, 1985; BRANDÃO et al., 2002), Santa Catarina (DA SILVA et al., 2008), Paraná (KUBIAK & MOLFI, 1954) e no Pantanal, onde a doença é endêmica, com recorrentes casos (SILVA et al., 2002). Desde então esta doença tem causado numerosos surtos

em equinos, resultando em morte e elevados prejuízos principalmente aos criadores de equinos (SILVA et al., 2002).

*T. evansi* é geralmente monomórfico, tem um pequeno cinetoplasto subterminal. No entanto, existem formas acinetoplásticas em que o DNA cinetoplástico circular é ausente. Estes exemplares são encontradas em cepas silvestres, geralmente como resultado de mutação ou após tratamento com tripanocidas (dentre estes o aceturato de diminazeno). Formas acinetoplásticas também são reportadas após longo tempo em cultura *in vitro* e criopreservação (ZWEYGARTH et al., 1990). As cepas brasileiras são comprovadamente acinetoplásticas (VENTURA et al., 2000). As formas encontradas na corrente sanguínea são basicamente lancetadas e o corpo é alongado e achatado, estando o flagelo livre sempre presente. Há uma membrana ondulante bem desenvolvida e a extremidade posterior pode ser arredondada ou afilada (FIGURA 2). Seu tamanho varia de 15-33  $\mu\text{m}$ , com média de 24  $\mu\text{m}$  (HOARE, 1972).

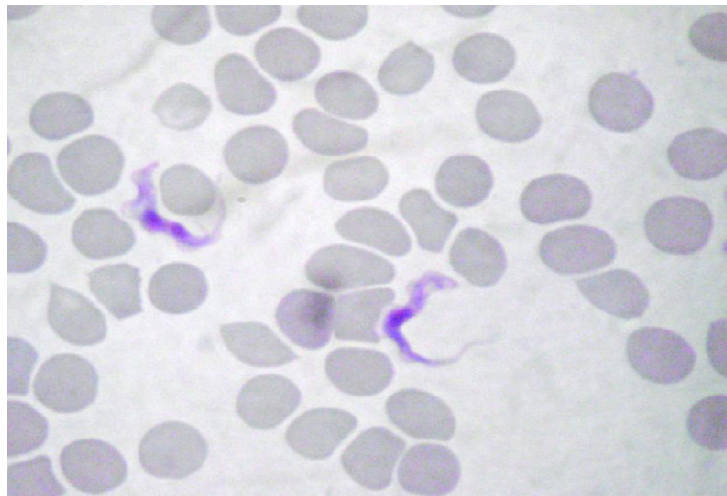


FIGURA 2 – Formas Tripomastigotas de *Trypanosoma evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos infectados experimentalmente.

#### 2.1.2 Ciclo de vida e transmissão

Tripomastigotas são as formas dos tripanossomas presentes nos vasos sanguíneos de vertebrados, que são disseminados por insetos hematófagos durante repasto sanguíneo (SILVA et al., 2002) (FIGURA 3).

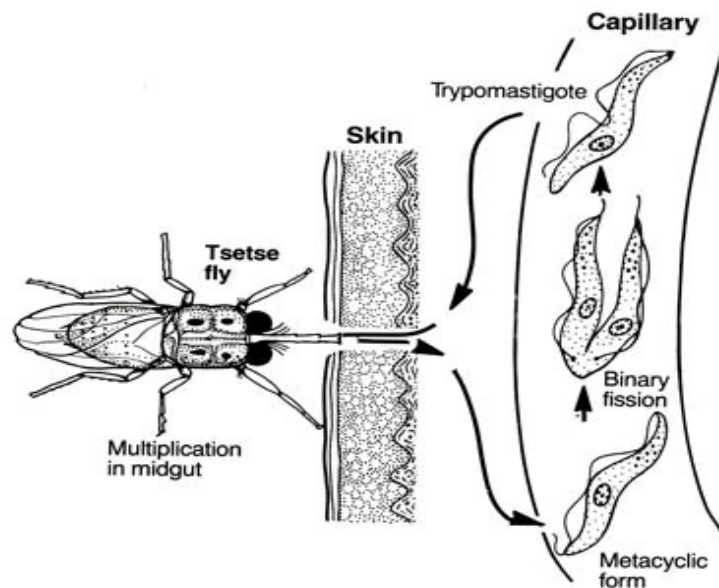


FIGURA 3 – Transmissão e multiplicação (fissão binária) do *T. evansi*. Fonte: SILVA et al., 2002.

Como a transmissão é mecânica, não há o desenvolvimento do hematozoário em nenhum órgão do vetor e quanto menor a diferença de tempo entre os repastos sanguíneos, maiores são as possibilidades de passagem do parasito para um novo hospedeiro (HOARE, 1972). Os principais vetores pertencem aos gêneros *Tabanus* sp., porém insetos dos gêneros *Stomoxys* sp, *Haematopota* sp. e *Lyperosia* sp. podem transmitir o parasito (SILVA 2002). Em moscas do gênero *Stomoxys*, a sobrevivência do parasito no aparelho bucal pode chegar a 480 minutos (SUMBA et al., 1998). Segundo um modelo matemático de transmissão por tabanídeos proposto por DESQUESNES e colaboradores (2009), para que ocorram frequentes surtos em uma determinada população, a prevalência de animais infectados deve estar em torno de 10 a 15% do total. De acordo com os autores, nesse modelo novos surtos podem acontecer em períodos de 3 a 5 anos. Condições estressantes como alterações climáticas e alimentares podem iniciar os casos. Na América Central e do Sul o morcego hematófago *Desmodus rotundus* é considerado um vetor importante, uma vez que, os tripomastigotas se multiplicam na corrente circulatória destes animais, os quais podem permanecer infectados por até um mês, atuando como vetor e também hospedeiro do parasito (HOARE, 1972). Ainda, existe a possibilidade de transmissão oral em carnívoros que se alimentam da carcaça de animais parasitados (RAMIREZ et al., 1979).

A via oral pode ser importante na dispersão de infecção de *T. evansi* em cães, quatis (*Nasua nasua*) e capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), que podem ser infectados em consequência das brigas entre animais infectados e não infectados. Além disso, espécies gregárias como coatis e capivaras tem um comportamento agressivo o que pode levar a transmissão do protozoário entre eles, mantendo a infecção no grupo social, já que a forma crônica da doença causada por *T. evansi* já foi identificada em capivaras e quatis, possíveis reservatórios do agente. Cães e ruminantes também podem atuar como reservatórios do *T. evansi* quando o curso da doença for crônico (HERRERA et al., 2004).

### 2.1.3 Patogenicidade e alterações patológicas

A patogenicidade dos tripanossomas no hospedeiro varia de acordo com a cepa do *Trypanosoma* sp., a espécie do hospedeiro, fatores não específicos concomitantemente afetando o animal (como outras infecções e estresse), e condições epizootiológicas locais. Diferente dos outros tripanossomatídeos que possuem vários estágios no seu ciclo de vida (HOARE, 1972), o *T. evansi* é monomórfico, ou seja, permanece sempre na forma tripomastigota, provavelmente devido a ausência parcial ou total do cinetoplasto (BORST et al., 1987), que impede a sobrevivência por longos períodos no vetor. Na circulação do hospedeiro, o *T. evansi* se divide assexuadamente por fissão binária. Esta multiplicação se inicia no local da picada (pele), seguido pela invasão da corrente sanguínea e do sistema linfático do hospedeiro, levando a picos de febre e induzindo uma resposta inflamatória (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). Apesar de não haverem evidências de transmissão venérea de *T. evansi*, UCHE & JONES (1992) o detectaram na mucosa vaginal de coelhas experimentalmente infectadas. Em condições naturais, há relatos de transmissão transplacentária em ruminantes (OGWU & NURU, 1981; MURALEEDHARAN & SRINIVAS, 1985) e camundongos experimentalmente infectados (SARMAH, 1998). A transmissão por via oral já foi comprovada experimentalmente em camundongos, cães (RAINA et al., 1985; BAZZOLI et al., 2002) e morcegos, que são vetores e reservatórios da doença (HOARE, 1972).

Os tripanossomatídeos africanos da seção Salivaria, a qual pertence o *T. evansi*, possuem uma interessante ferramenta para evadir as defesas do hospedeiro, a expressão das glicoproteínas variáveis de superfície, ou *variant surface glycoproteins* (VSGs). Toda a

superfície do protozoário (aproximadamente 95%) é recoberta por esses dímeros, que possuem a propriedade de se alterar, “enganando” a resposta imune humoral do hospedeiro (PAYS et al., 2004). O genoma desses tripanossomatídeos possui centenas de genes que codificam para diferentes VSGs, e apenas um é expresso por vez. As VSGs são traduzidas com um domínio N-terminal que é variável e um domínio C-terminal que é altamente conservado e possui uma sequência para âncoras de GPI (glicofosfatidilinositol) que as sustentam na superfície do parasito (CARRINGTON et al., 1991). Quando os protozoários mudam sua cobertura de VSGs ocorrem os picos de parasitemia, observados na forma crônica da doença. A parasitemia quando aumenta geralmente é acompanhada por respostas febris. Conforme anticorpos são produzidos, há eliminação do clone corrente, mas sucessivos novos padrões de antígenos de superfície são gerados para evadir a resposta do hospedeiro (LUCAS et al., 1992).

Em infecções naturais e experimentais foi observado que a tripanossomose por *T. evansi* pode cursar com um quadro clínico agudo e, também, crônico. Geralmente a fase aguda da infecção é caracterizada pelo surgimento de febre intermitente, edema subcutâneo, anemia progressiva, cegueira, letargia e alterações hemostáticas. Os animais afetados agudamente podem morrer dentro de semanas ou poucos meses, no entanto, infecções crônicas podem persistir por anos (BRUN et al., 1998). Durante a fase crônica, ocorre o agravamento dos sinais clínicos, seguido de outras complicações como a caquexia, edema, incoordenação motora e paralisia de posterior (BRANDÃO et al., 2002; SILVA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005). Sinais neurológicos têm sido descritos na fase terminal da doença, principalmente em equinos, bovinos, veados e búfalos infectados naturalmente (TUNTASUVAN et al. 1997; TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998; TUNTASUVAN et al., 2000; RODRIGUES et al., 2005). Lesões oculares também podem estar associadas à tripanossomose em algumas espécies. Cabras experimentalmente infectadas produziram úlcera de córnea e retinocoroidite crônica (MORALES et al., 2006).

A principal alteração hematológica identificada em animais com tripanossomose é anemia acentuada (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). A doença é marcada pela diminuição no hematócrito, na concentração de hemoglobina e no número de eritrócitos totais. A anemia descrita em infecções experimentais geralmente é macrocítica hipocrômica (OMER et al., 2007), macrocítica normocrômica (AQUINO et al., 1999) e normocítica normocrômica (DA SILVA et al., 2010). Após 72h de infecção, MIJARES e colaboradores (2009) encontraram uma queda de 49,5% para 33% no hematócrito de ratos experimentalmente infectados, demonstrando haver hemólise. Alterações eritrocitárias podem

incluir microesferócitos, acantócitos, micrócitos, vacuolização eritrocitária, policromasia, poiquilocitose, adesão eritrocitária dos tripanossomas aos eritrócitos circulantes e eritrofagocitose (ANOSA & KANEKO, 1983; SILVA et al., 1995; CONRADO et al. 2005). HERRERA e colaboradores (2004) não encontraram anemia em capivaras no Pantanal brasileiro, mesmo estando às mesmas com alta parasitemia. Este achado corrobora o importante papel destes roedores como reservatórios da doença. Conforme a literatura, o principal mecanismo responsável pela anemia seria a liberação de hemolisinas e enzimas pelos tripanossomas, que podem induzir lesões diretamente na membrana dos eritrócitos, aumento a fragilidade dos mesmos devido ao aumento da temperatura; lesões induzidas pelos antígenos do parasito que se aderem à superfície dos eritrócitos; adesão dos complexos antígeno-anticorpo às membranas eritrocitárias e dos componentes do complemento aos eritrócitos, que irão promover eritrofagocitose (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). Desde que JAKTAR & PUROHIT (1971) propuseram que a causa da anemia na tripanossomose não era devido a depressão da medula óssea e sim a destruição de eritrócitos, recentes trabalhos tem objetivado explicar suas causas, elucidando alguns pontos importantes na sua patogenia. A membrana dos eritrócitos de animais infectados apresenta uma maior fragilidade osmótica, tornando-se mais susceptível à lise (MIJARES et al., 2009). Associado a isso, a infecção por *T. evansi* gera um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), acarretando em uma elevação na peroxidação lipídica da membrana dos eritrócitos devido a interação com essas EROS (WOLKMER et al., 2009; MIJARES et al. 2009). OMER e colaboradores (2007) comprovaram um aumento da concentração nas enzimas do sistema antioxidante glicose-6-fosfato desidrogenase (G<sub>6</sub>P-DH) e glutathiona-peroxidase (GSH-Px). O aumento da atividade da G<sub>6</sub>P-DH está relacionado a uma maior atividade da via das pentoses-fosfato, que produz a coenzima NADPH. O NADPH mantém a GSH-Px em sua forma reduzida, para que ela possa atuar como um potente antioxidante. Esses trabalhos demonstraram então que a infecção por *T. evansi* está associada a uma alta taxa de peroxidação lipídica associada a uma produção de EROS que aumentam a fragilidade da membrana dos eritrócitos, podendo levar a hemólise e a produção da anemia. Outro mecanismo para a anemia que pode também estar atuando conjuntamente com o descrito acima é a eritrofagocitose promovida pela enzima sialidase ou neuraminidase. A sialidase hidrolisa glicoconjugados que sustentam o ácido siálico negativamente carregado da membrana dos eritrócitos, causando alterações estruturais na célula facilitando a eritrofagocitose por macrófagos e consequente anemia (DUROCHER et al., 1975). SHEHU e colaboradores (2006) dosaram a atividade da sialidase em cabras experimentalmente

infectadas por *T. evansi* e encontraram um aumento no número de moléculas de ácido siálico livre concomitante com uma diminuição de ácido siálico na membrana de eritrócitos e aumento da parasitemia.

#### 2.1.4 Resposta Imune

Depois de atingir o sistema linfático, o *T. evansi* leva a uma resposta celular T e B, dependendo do tipo da molécula de superfície do parasito (VSG) (TAYLOR & AUTHIÉ, 2004). A maioria das imunoglobulinas produzidas em resposta a hemoparasitose pertencem às classes IgM e IgG. Esses anticorpos se ligam a epítomos específicos na superfície do parasito que causa sua morte (BARAL et al., 2007). COSTA e colaboradores (2010) relataram um aumento nos níveis totais de proteínas séricas em gatos infectados por *T. evansi* correspondentes à alfa-2-globulina, beta-globulina e gama-globulina em frações de soro. Paim e colaboradores (2011) recentemente relataram que a infecção por *T. evansi* causa um aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Os IFN- $\gamma$  normalmente ativam os macrófagos, aumentando a sua capacidade de destruir os organismos, e estes macrófagos ativados por sua vez, induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF-  $\alpha$  a desempenhar um papel importante no processo de replicação do parasito, assim como na resposta imune do hospedeiro (PAULNOCK & COLLER, 2001; GAO & PEREIRA, 2002; MAGEZ et al, 2007).

#### 2.1.5 Diagnóstico

Os sinais clínicos da infecção por *T. evansi* são em sua maioria inespecíficos, principalmente no início da doença, sem nenhum sinal patognomônico (SILVA et al., 2002). Segundo a OIE, vários procedimentos diagnósticos são indicados. A identificação direta do agente pode ser realizada na fase aguda da doença, através da análise de esfregaço sanguíneo ou de linfonodos em microscópio. A busca por protozoários pode ser realizada, analisando-se o material em lâmina e lamínula (busca por parasitos móveis) ou, corando-se o esfregaço com *Giemsa*.



Como em muitos casos a tripanossomose apresenta baixa parasitemia, algumas técnicas de concentração podem ser utilizadas. A primeira delas é a técnica de centrifugação em microhematócrito ou método de WOO (WOO, 1970), na qual o sangue é separado em tubos capilares com anticoagulante e os protozoários podem ser observados na junção entre a camada de células brancas e o plasma. Outra técnica bastante sensível é a *mini-anion exchange centrifugation technique* (mAECT), que consiste na realização de uma cromatografia de troca iônica em DEAE (dietilaminoetil)-Celulose. As células sanguíneas do hospedeiro são mais negativamente carregadas do que os protozoários, fazendo com que, com o uso de tampões com a força iônica adequada, os parasitos sejam eluídos pela coluna enquanto as células do sangue permanecem retidas (LANHAM & GODFREY, 1970). Os protozoários devem então ser centrifugados e visualizados em microscópio óptico.

Como o *T. evansi* é altamente infectante para pequenos roedores, a inoculação em animais de laboratórios de sangue suspeito pode ser realizada. A parasitemia deve ser acompanhada a cada 48h através de esfregaço sanguíneo com sangue colhido da veia caudal, e o período pré-patente geralmente é curto (5 dias), variando conforme a patogenicidade da cepa. Alternativamente, uma maior sensibilidade pode ser obtida com a inoculação da camada de células brancas, sendo assim possível detectar até 1,25 parasitos/mL de sangue (REID et al., 2001).

Um dos mais sensíveis métodos é a detecção específica de DNA de *T. evansi* através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Atualmente o padrão ouro para a identificação do subgênero *Trypanozoon* são os iniciadores NRP ou TBR (MASIGA et al., 1992; MOSER et al., 1989). Para a identificação da espécie, podem ser utilizados iniciadores específicos para *T. evansi*, como, por exemplo, os que amplificam o gene RoTat 1.2, que é uma VSG exclusiva de *T. evansi*, não presente em *T. brucei* (CLAES et al., 2004). Algumas cepas de *T. evansi* provenientes do Quênia não apresentam o gene RoTat 1.2, e para estas podem ser utilizados iniciadores que amplificam outra VSG, desenvolvidos por NGAIRA e colaboradores (2005). Apesar de ser a técnica mais sensível para o diagnóstico, o resultado pode ser falso negativo em casos em que não é observada parasitemia (BENGALY et al., 2001). Por não serem baseados em DNA do cinetoplasto, que é ausente em grande parte das cepas de *T. evansi*, estes dois últimos iniciadores são capazes de abranger o diagnóstico específico de *T. evansi* para a grande maioria das cepas (NGAIRA et al., 2005).

Métodos sorológicos também são bastante empregados na detecção de anticorpos específicos anti- *T. evansi* no soro de animais suspeitos. Podem ser utilizados vários testes, sendo que os mais empregados são imunofluorescência indireta, ELISA (*enzyme-linked*

*immunosorbent assay*) e o CATT. Em cavalos experimentalmente infectados com *T.evansi*, WERNERY e colaboradores (2001) compararam os três métodos, e concluíram que o CATT detectou os antígenos com 7,8 dias pós-infecção, seguido pela imunofluorescência indireta com 15,7 dias e ELISA com 17,4 dias. Reações cruzadas podem acontecer entre tripanossomatídeos, principalmente entre os da mesma seção.

## 2.2 O Tratamento

Estima-se que o custo com tratamento desta doença no Pantanal, incluindo gastos com tratamento, pode chegar a 2,4 milhões de dólares com 6462 cavalos afetados por ano (SEIDL et al., 1998). A quimioterapia é provavelmente o mais importante método pelo qual a tripanosomose é controlada em animais domésticos. O tratamento para a Surra é baseado principalmente em quatro drogas: suramina, aceturato de diminazeno, quinapiramina e melarsomina (BRUN et al., 1998). A TABELA 1 lista a dosagem, o nome comercial citado na literatura internacional, a espécie animal e a espécie do parasito contra qual é usada, e a TABELA 2 lista os produtos disponíveis no mercado brasileiro. Ao contrário dos três primeiros, a melarsomina foi desenvolvida há pouco mais de 20 anos (RAYNAUD et al., 1989), e é o único composto que apresenta eficácia comprovada em diversas espécies (PAYNE et al., 1994). Os grandes problemas encontrados no tratamento são a alta toxicidade destas drogas para o hospedeiro e o surgimento de cepas resistentes, visto que grande parte destes compostos vem sendo utilizados no campo há mais de 40 anos (SILVA et al., 2002). ZHANG e colaboradores (1993) induziram a formação de resistência ao aceturato de diminazeno, melarsomina e suramina em laboratório, demonstrando que o uso indiscriminado destas drogas pode culminar com uma menor sensibilidade dos protozoários aos tratamentos disponíveis.

O tratamento da tripanosomose pode ser curativa, usando uma droga que dá pouca ou nenhuma ação residual ou preventiva. A diferença entre cura e prevenção depende da droga que está sendo usada e, em alguns casos, da dosagem que está sendo administrada. Algumas drogas são armazenadas nos tecidos e por uma lenta liberação na corrente circulatória mantém a concentração do composto ativo suficiente para controlar os tripanosomas (PEREGRINE, 1994). As drogas curativas são usadas quando a incidência é baixa, quando somente poucos casos ocorrem em um rebanho durante o período de um ano ou quando o tratamento de

poucos casos ocorre principalmente durante uma estação a qual geralmente é a das chuvas. Já a profilaxia ou prevenção é requerida quando existe constante risco ou quando a enfermidade ocorre em um alto nível durante o ano (BOYT, 1994).

TABELA 1 – Compostos quimioterapêuticos e quimioprofiláticos existentes no mercado internacional, usados para a tripanosomose animal (Fonte: PEREGRINE, 1994).

| Composto  | Nome Comercial  | Dosagem mg/Kg         | Via          | Uso              | Parasito  | Animal   |
|---|---|-----------------------|--------------|------------------|---|--|
| Aceturato de Dimenazene                           | Beronal <sup>®</sup><br>Veribem <sup>®</sup><br>Ganaseg <sup>®</sup><br>Ganatet <sup>®*</sup> | 3,5-7,0               | I.M.         | T                | <i>T. congolense</i><br>( <i>T. vivax</i> )<br>( <i>T. evansi</i> )<br>( <i>T. brucei</i> )         | Bovinos<br>Pequenos ruminantes<br>[Cães]<br>[Equídeos] |
| Brometo de Homidium                               | Ethidium <sup>®</sup>   | 1,0                   | I.M.         | T/P              | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i>   | Bovinos<br>Pequenos Ruminantes<br>[Equídeos]           |
| Cloreto de Homidium                               | Novidium <sup>®</sup>   | 1,0                   | I.M.         | T/P <sup>a</sup> | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i>   | Bovinos<br>Pequenos Ruminantes<br>[Equídeos]           |
| Cloreto de Isometamidium                          | Samorim <sup>®</sup><br>Trypamidium <sup>®</sup>  | 0,25-0,5<br>0,5-1,0   | I.M.         | T<br>P           | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i><br><i>T. brucei</i><br><i>T. evansi</i>                     | Bovinos<br>Pequenos Ruminantes<br>Equídeos<br>Camelos  |
| Dimetilsulfato de Quinapiramina                   | Trypacide sulphate <sup>®</sup>   | 3,0-5,0               | S.C.         | T                | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i><br><i>T. brucei</i><br><i>T. evansi</i><br><i>T. simiae</i> | Suínos<br>Cães<br>Equídeos<br>Camelos                  |
| Dimetilsulfato de Quinapiramina:<br>Cloreto (3:2) | Trypacide Pro-salt <sup>®</sup>   | 3,0-5,0 <sup>b</sup>  | S.C.         | P                | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i><br><i>T. brucei</i><br><i>T. evansi</i><br><i>T. simiae</i> | Suínos<br>Cães<br>Equídeos<br>Camelos                  |
| Suramin   | Naganol <sup>®</sup>  | 7,0-10,0 <sup>c</sup> | I.V.         | T(P)             | <i>T. evansi</i>  | Camelos<br>Equídeos                                    |
| Melarsomina                                       | Cymellarsan <sup>®</sup>  | 0,25                  | S.C/<br>I.M. | T                | <i>T. evansi</i>  | Camelos  |

I.M.: intra-muscular; S.C.: sub-cutâneo; I.V.: intra-venoso; T: agente terapêutico; P: agente profilático; ( ): atividade limitada; [ ]: pequeno índice terapêutico. <sup>a</sup>Profilaxia observada com baixo desafio de Tsé-tsé; <sup>b</sup>Dosagem do sulfato; <sup>c</sup>Gramas por animal; \*Ganatet<sup>®</sup>: Dimenazene em associação com Tetraciclina. diminui a atividade catalítica da topoisomerase II, assim como MILNER e colaboradores (1997) relataram a depressão da atividade da acetilcolinesterase em glóbulos vermelhos.

O aceturato de diminazeno, uma diamidina aromática, foi desenvolvido a partir de uma droga chamada “Congasin”, a qual possuía propriedades trypanocidas e babesicidas. No Brasil, o aceturato de diminazeno é o produto mais comumente utilizado nas tripanossomoses dos animais domésticos, pois apresenta maior índice terapêutico que as outras drogas na maioria das espécies domésticas, têm atividade contra tripanossomas que são resistentes a outros medicamentos e apresenta baixa incidência de resistência (PEREGRINE & MAMMAM, 1993).

Existem amplas evidências que o aceturato de diminazeno interage com DNA na célula (DA'DARA et al, 1998;. GONZALEZ et al, 1999). REDDY e colaboradores (1999) descreveram a existência de uma ligação desta droga a filamentos de DNA. Trabalhos posteriores revelaram ainda que o aceturato de diminazeno e seus análogos preferencialmente se ligam ao DNA no sulco menor dos domínios ricos em A-T provocando um enrijecimento local das hélices do DNA alterando as curvas das hélices intrínsecas, ou mesmo a flexão reta do DNA (REINERT, 1999). PORTUGAL (1994) demonstrou que o aceturato de diminazeno

TABELA 2 – Produtos usados no tratamento das tripanossomoses por *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* disponíveis no mercado brasileiro (Fonte: PEREGRINE, 1994).

| Nome Comercial | Parasito  | Fabricante   |
|----------------|---|--|
| Beronal        | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i><br><i>T. brucei</i> | Quimio Produtos Químicos<br>Com. Ind. Ltda.        |
| Tristeril      | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i><br><i>T. brucei</i> | Probion-Ind. de Medicamentos<br>Veterinários Ltda. |
| Hemo Clin      | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i><br><i>T. brucei</i> | Embrasvet-Empresa Brasileira<br>Veterinária Ltda.  |
| Plasmosil      | <i>Babesia spp</i>  | Philips Couto Indústria<br>Farmacêutica<br>Ltda.   |
| Babesin        | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i><br><i>T. brucei</i> | Fagra-Farmacêutica S.A. Imp. &<br>Exportação       |
| Pirental       | <i>T. congolense</i><br><i>T. vivax</i><br><i>T. brucei</i> | Minerthal Ltda.                                    |
| **Ganatet      | <i>Babesia spp</i><br><i>Anaplasma spp</i>                  | Ciba Geigy Química S.A.                            |
| Ganaseg        | Tripanosomose   | Ciba Geigy Química S.A.                            |
| Nambiusol      | Piroplasmose<br>bovina e canina                             | Farmavet Produtos Veterinários<br>Ltda.            |

\*Os produtos têm como droga o aceturato de Diminazeno. A dose recomendada é 3,5 mg/Kg por via intramuscular. \*\*Apesar de nenhum dos fabricantes referir-se ao tratamento da tripanosomose pelo *Trypanosoma evansi* o Diminazeno é efetivo na dosagem de 7,0 mg / Kg.

Quando ocorre, a resistência ao aceturato de diminazeno, esta pode estar associada à expressão de um gene, o TeDR40. WITOLA e colaboradores (2005) demonstraram que este gene tem a expressão aumentada em 1000 vezes em parasitos resistentes. Outro fator envolvido na resistência ao aceturato de diminazeno é o transportador de aminopurinas P2, que carrega a droga para dentro do protozoário. Quando foi realizado o *knock-out* deste gene por RNA de interferência em *T. evansi*, o parasito foi capaz de crescer axenicamente com doses 5,5 vezes maiores do que o máximo recomendado (WITOLA et al., 2004).

### 2.3 Radicais livres e Antioxidantes

Entre vários agentes químicos produzidos pelo hospedeiro contra os parasitas, citam-se também a produção de radicais livres (KAZURA & MESNICK, 1984). Radicais livres são quaisquer espécies químicas de existência independente que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Esta configuração eletroquímica muito instável confere a estas estruturas alta reatividade e vida curta. Uma vez formados, os radicais livres interagem com outras moléculas através de reações de oxirredução com o propósito de estabilizar sua configuração eletrônica. Cedendo ou captando elétrons de espécies vizinhas, os radicais livres buscam se estabilizar (SCHANAIDER, 2000). Estas, por sua vez, viram radicais livres e se estabilizam, tomando ou cedendo elétrons de outras substâncias. Cria-se uma reação em cadeia que termina por alterar a conformação, a estrutura ou as funções de proteínas, fosfolipídios de membrana, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (RIEGEL, 2002). Esta deteriorização oxidativa dos lipídios polinsaturados é chamada de lipoperoxidação (NORDBERGER & ARNER, 2001). Uma forma de determinar esta peroxidação lipídica é através do método de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por OHKAWA et al., 1979. A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres. Os principais agentes de defesa antioxidante podem ser visualizados na TABELA 3.

A classificação dos radicais livres se dá pelo grupo funcional presente em sua molécula, porém os processos aeróbicos que envolvem o oxigênio são os mais comuns e seus produtos são denominados de espécies reativas do oxigênio (EROS) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As EROS incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas: o radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil (OH) e o

peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HERSHKO, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

TABELA 3 – Principais agentes de defesa antioxidante (Fonte: SIES, 1993).

| Não Enzimáticos              | Enzimáticos                     |
|------------------------------|---------------------------------|
| $\alpha$ -Tocoferol          | Superóxido Dismutase (SOD)      |
| $\beta$ -Caroteno            | Catalase (CAT)                  |
| Ácido Ascórbico (Vitamina C) | NADPH - Quinona oxireductase    |
| Flavonóides                  | Glutathione Peroxidase (GSH-Px) |
| Selênio                      | Enzimas de Reparo               |
| Proteínas do Plasma          |                                 |
| Glutathione                  |                                 |
| Clorofilina                  |                                 |
| L-Cisteína                   |                                 |
| Curcumina                    |                                 |

Em sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agente óxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante (FIGURA 4). Para se proteger, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída pelas enzimas glutathione reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-peroxidase (GSH-Px) e pela vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico e pelas enzimas glutathione-redutase (GSH-Rd), GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (HEBBEL, 1986; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Em células de hospedeiros infectados com diferentes espécies de parasitas as quantidades de EROS que causam lipoperoxidação são elevadas, provocando danos em tecidos e células orgânicas (DEGER, 2008). O desequilíbrio entre a produção de EROS e a remoção dos mesmos pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica com elevada concentração de EROS que causa danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (DRÖGE, 2002; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

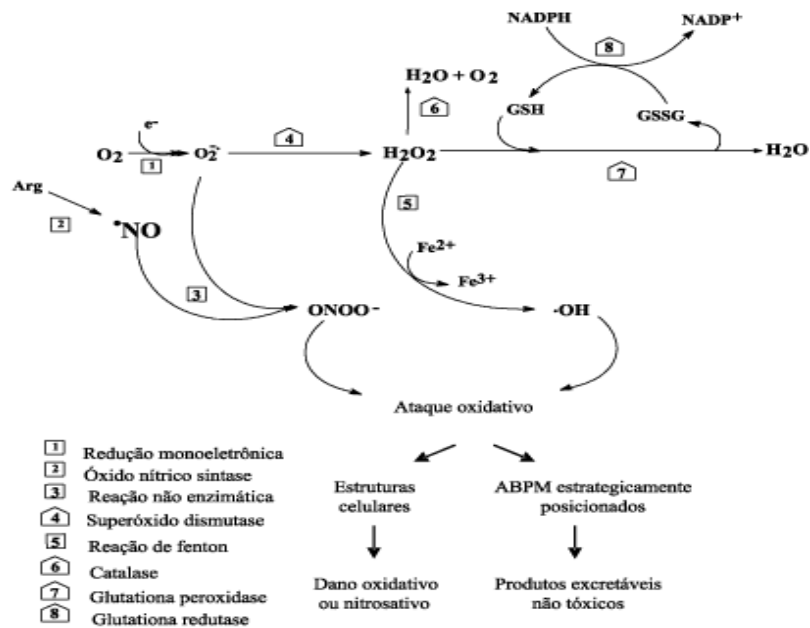


FIGURA 4 – Mecanismo de ataque de EROS, partindo da redução monoeletrônica do  $O_2$  e os sistemas de defesa antioxidantes. O símbolo  $\square$  refere-se a mecanismos de produção de EROS e o símbolo  $\square$ , as principais enzimas de defesa antioxidante (Fonte: GANDRA et al. 2004).

### 2.3.1 Selênio

Em 1818, o cientista sueco Jöns Jacob Berzelius detectou pela primeira vez o elemento selênio em câmaras de chumbo de uma fábrica de ácido sulfúrico, atribuindo-o este nome em homenagem à lua, do grego “selene” (BERZELIUS et al., 1818). A partir de 1950, o selênio foi reconhecido como um micronutriente essencial, relacionado a vários benefícios na saúde. Possui atividade antioxidante, antiinflamatória, antiviral, reprodutiva, anticancerígena e na prevenção de doenças cardiovasculares e musculares (revisado por HATFIELD & GLADYSHEV, 2002; PAPP et al., 2007). O selênio também foi comprovadamente reconhecido como etiologia de intoxicações em pessoas e animais a partir de 1944, causando doenças através de sua ingestão excessiva, além de ser teratogênico e possivelmente carcinogênico (YANG et al., 1983; TIWARY et al., 2006; KAMBLE et al., 2009; FLOHÉ, 2009).

O selênio está envolvido em várias funções fisiológicas, possui efeito antioxidante e atua como modulador do sistema imune, agindo nas barreiras contra infecções e atuando

sobre a ação dos macrófagos, sendo este mineral essencial para a eficiência e efetiva operação de vários aspectos da defesa imunológica, tanto em animais quanto em humanos. Em casos de deficiência de selênio há uma diminuição na proliferação de linfócitos e, conseqüentemente, dos títulos de imunoglobulinas (HALLIWELL et al., 2000; ARTHUR et al., 2003).

Os suplementos minerais utilizados na nutrição animal também possuem selênio, tanto na forma inorgânica como orgânica. A forma inorgânica mais comum utilizada em misturas minerais é o  $\text{Se}^{4+}$  (selenito, ex.:  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), mas os estados de oxidação do selênio em compostos de ocorrência natural também podem corresponder às formas  $\text{Se}^{2-}$  (seleneto, ex.:  $\text{Na}_2\text{Se}$ ), Se elementar ( $\text{Se}^0$ ), e  $\text{Se}^{6+}$  (selenato, ex.:  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) (REILLY, 1995). Na forma orgânica existe como análogo de aminoácidos sulfurados, principalmente selenometionina (SeMet) e selenocisteína (SeCis). (HATFIEDL & GLADYSHEV, 2002). Essas proteínas são essenciais para diversos processos celulares, sendo que a ingestão de baixas quantidades de selênio, resultando em uma deficiência de selenoproteínas, é a etiologia de algumas doenças, como a de Keshan (miocardiopatia que ocorre em regiões na China com o solo deficiente em selênio), a de Kashin-Beck (osteoartrite associada a ingestão de baixas quantidades de selênio), cretinismo endêmico mixedematoso (a deficiência de selênio pode estar associada a deficiências na tireóide que irão acarretar em nanismo e deficiência mental) e infertilidade masculina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [WHO], 1987).

Uma das principais funções das selenoproteínas é a proteção contra as EROS, atuando como antioxidantes. As EROS são capazes de causar danos às macromoléculas celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídeos (ARNÉR, 2010). Desta forma o interesse sobre o selênio tem evoluído devido a sua presença na enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px). A GSH-Px é uma das enzimas antioxidantes que removem o peróxido de hidrogênio ou outros hidroperóxidos orgânicos, combinando-os com a glutathiona para formar glutathiona oxidada (GSSH), que pode então ser reduzida a glutathiona redutase (GSH-Rd) (JI et al, 1998).

### 2.3.2 Vitamina E

As vitaminas são nutrientes essenciais que atuam em mais de 30 reações metabólicas celulares (MARKS, 1979). Normalmente as vitaminas são divididas em dois grupos, hidrossolúveis e as lipossolúveis. A vitamina E está no grupo das lipossolúveis juntamente com a A, D, K (McDOWELL, 1989).



A vitamina E é um termo utilizado para descrever duas gamas de compostos: tocoferóis e tocotrienóis. A diferença estrutural básica entre eles reside no número de ligações duplas da cadeia lateral. Esta particularidade resulta em alteração na atividade biológica da vitamina. Em geral, considera-se o  $\alpha$ -tocoferol como padrão de comparação para a determinação da atividade de outras formas de vitamina E. A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) age como protetor de membrana celular, antioxidante biológico, evita danos em fibras musculares cardíacas e esqueléticas, tendo atividade na coagulação sanguínea, transporte de elétrons, proteção do organismo contra metais pesados, possuindo ainda mecanismo modulador da resposta imune dos animais, protegendo os leucócitos e macrófagos durante a fagocitose (McDOWELL, 1989).

A vitamina E pode ser encontrada na forma natural ou sintética. Na forma natural o termo genérico "vitamina E" é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados  $\alpha$ ,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis (CHUN et al. 2006). Tocoferóis e tocotrienóis são encontrados em proporções variáveis em plantas, sendo que as fontes principais são óleos vegetais, germe de trigo, sementes oleaginosas, vegetais folhosos verde-escuros e alimentos de origem animal, principalmente gema de ovo e fígado (SHEPPARD et al., 1992; CHEN et al., 1998; SRIDHAR & LAKSHMINARAYANA, 1993). Já as formas comerciais mais comuns são o acetato de d- $\alpha$ -tocoferol ou acetato de d- $\alpha$ -tocoferol. A forma esterificada confere estabilidade a vitamina, mas não permite ação antioxidante. É importante salientar que a forma alcoólica (tocoferol), que é a que ocorre naturalmente, está sujeita a destruição no trato digestivo. Na forma esterificada (acetato), isto não ocorre. O acetato é prontamente clivado na parede intestinal e a forma alcoólica é então absorvida, permitindo assim que a vitamina exerça a sua ação antioxidante (McDOWELL, 1989).

Por sua natureza lipossolúvel, a vitamina E está localizada em nível de membrana, sabidamente de constituição lipoprotéica. Estruturalmente, ela reside entre os ácidos graxos componentes de fosfolipídeos. Ali localizada, a vitamina E exerce a sua função mais conhecida, qual seja a de antioxidante natural. Nesta função também atuam outras substâncias lipossolúveis denominadas de carotenóides. Além destes compostos, este papel biológico é coadjuvado intracelularmente por compostos reconhecidamente de natureza hidrossolúvel como a vitamina C e a GSH-Px dependente de selênio. Todos os elementos do sistema antioxidante interagem entre si de forma eficiente. Esta interação provavelmente inicia ao nível de absorção de nutrientes e se continua no metabolismo. Por exemplo, o selênio dietético poupa a vitamina E, de forma que, por exemplo, galináceos (THOMPSON &

SCOTT, 1970) e patos (DEAN & COMBS, 1981) apresentam concentrações mais elevadas de vitamina E no plasma ao receberem dietas suplementadas com selênio. Por outro lado, a vitamina E mantém o selênio no organismo de uma forma ativa, impedindo a sua perda do organismo. Além disso, ao impedir a destruição dos lipídeos de membrana, impedindo a produção de hidroperóxidos, reduz a quantidade de GSH-Px necessária para destruir peróxidos dentro do citosol das células (MCDOWELL, 1989).

Mecanismo de ação alternativo da vitamina E junto ao sistema imunológico esta relacionado com a sua participação na síntese de eicosanóides que modulam a produção de prostaglandinas e leucotrienos. As prostaglandinas são imunossupressoras, enquanto que os leucotrienos são estimulantes do sistema imunológico (ADEREM et al., 1985). Tendo em vista que os macrófagos são o principal tipo de célula responsável pela produção de prostaglandinas (ADEREM et al., 1985), a vitamina E apresenta papel vital na redução da produção de prostaglandinas ao antagonizar a peroxidação do ácido araquidônico, limitando a entrada de precursores na via das prostaglandinas. LIKOFF e colaboradores (1981) demonstraram que a função fagocítica de aves recebendo 300 ppm de vitamina E era aumentada.

O mecanismo que explica os efeitos da vitamina E e do selênio na imunidade não estão bem elucidados, mas está relacionado às suas fortes propriedades antioxidantes; eles eliminam os peróxidos livres formados durante processos de oxidação, os quais podem diminuir a permeabilidade e elasticidade das membranas citoplasmáticas. Desta forma os efeitos antioxidantes do selênio e vitamina E podem reforçar um ao outro pela sobrecarga de ação terapêutica. O mineral funciona junto com o tocoferol para proteger as membranas e organelas celulares de danos oxidativos, facilitar a união entre o oxigênio e hidrogênio no final da cadeia metabólica, transferir íons através de membranas celulares e ajudar na síntese de imunoglobulinas (MAHAM & ESCOTT-STUMP, 1998).

## CAPÍTULO II

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados dessa dissertação são apresentados na forma de artigo, de acordo com as normas da revista *Experimental Parasitology*:

**Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of  
*Trypanosoma evansi* infection in rats**

Alexandre A. Tonin, Aleksandro S. Da Silva, Marcio M. Costa, Mateus A. Otto, Gustavo Thomé, Kaio S. Tavares, Luiz Claudio Miletti, Marta do Rego Leal, Sonia T.A. Lopes, Cinthia M. Mazzanti, Silvia G. Monteiro, Mario L. de La Rue

**Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of  
*Trypanosoma evansi* infection in rats**

Alexandre A. Tonin<sup>a,\*</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>a</sup>, Marcio M. Costa<sup>a</sup>, Mateus A. Otto<sup>a</sup>, Gustavo Thomé<sup>a</sup>, Kaio S. Tavares<sup>b</sup>, Luiz Claudio Miletto<sup>b</sup>, Marta do Rego Leal<sup>a</sup>, Sonia T.A. Lopes<sup>a</sup>,  
Cinthia M. Mazzanti<sup>a</sup>, Silvia G. Monteiro<sup>a</sup>, Mario L. de La Rue<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup> Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil

Corresponding Author: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Prédio 20, sala 4235. Santa Maria, CEP 97105-970. RS, Brazil.

E-mail: [tonin\\_alexandre@yahoo.com.br](mailto:tonin_alexandre@yahoo.com.br).

**Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of  
*Trypanosoma evansi* infection in rats**

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the utilization of a standard treatment with diminazene aceturate against the infection caused by *Trypanosoma evansi*, associated to sodium selenite and vitamin E. *In vitro* tests showed trypanocidal effect related to the treatment with diminazene aceturate and sodium selenite, but vitamin E had no harmful effect on the trypanosomes. *In vivo* experiments utilized a total of 72 adult outbred females rats, separated into 9 groups (A, B, C, D, E, F, G, H and I), 8 animals each. Group A was the uninfected group; Groups B to I were infected with 0.2 mL of blood containing  $10^6$  trypanosomes. Parasitemia was estimated daily by microscopic examination of blood smears. Group B served as positive control; group C was treated with diminazene aceturate; group D with sodium selenite; group E with vitamin E; group F received an association of diminazene aceturate and sodium selenite; group G received an association of diminazene aceturate and vitamin E; group H received an association of diminazene aceturate, sodium selenite and vitamin E, and group I received an association of sodium selenite and vitamin E. Diminazene aceturate was administrated in a single dose on the third day post infection (PI). Sodium selenite and vitamin E were administered at the 3<sup>rd</sup> and 23<sup>rd</sup> day PI. *In vivo* tests showed increase of longevity in groups treated with diminazene aceturate associated with sodium selenite (group F and H). No difference was found between groups C and E, thus the vitamin E did not increase the efficacy of treatment against *T. evansi* when associated to diminazene aceturate. The curative efficacy of treatments was 37.5, 87.7, 37.7 and 75% to the groups C, F, G and H, respectively. Other treatments showed no efficacy. The sodium selenite when combined with chemotherapy may represent an alternative in the treatment of trypanosomosis.

**Keywords:** *Trypanosoma evansi*, diminazene aceturate, sodium selenite, Vitamin E, rodents.

## 1 Introduction

*Trypanosoma evansi* is a digenetic flagellate implicated in the infection of a large number of domestic and wild animals, such as equines, canines, felines, rabbits, capybaras, ring-tailed coatis, bovines, buffaloes, armadillos and humans (Dávila and Silva, 2000; Herrera et al., 2004; Tarello, 2005; Joshi et al., 2005; Da Silva et al., 2008a). This protozoan is the agent of trypanosomosis, a disease with broad distribution in Africa, Asia, and Latin America (Lun and Desser, 1995). The trypomastigotes present in blood vessels of vertebrate hosts are transmitted by blood-sucking insects during feeding. The insect vectors are most commonly tabanidae species (*Tabanus* sp., *Chrysops* sp. and *Hematopota* sp.) (Hoare, 1972).

Treatment of trypanosomosis relies on the use of diminazene aceturate which is effective for treatment in cattle, buffalo, sheep, pigs and camels (Peregrine and Mamman, 1993; Sirivan et al., 1994). However, single dose are not effective for horses, mules and dogs (Tuntasuvan et al., 2003; Colpo et al., 2005). Da silva et al. (2008b) did not found a complete control of the infection using a single dose, resulting in recurrence of parasites. Thus, it is important to investigate alternatives to improve the success of treatment using new drugs, drugs associations and other components that could increase the curative efficacy. In this sense there is a growing interest in the utilization of antioxidants in the prevention and treatment of this disease.

Sodium selenite is a common dietary form of selenium, recognized as an essential nutrient for animal and human nutrition (Combs and Gray, 1998; Combs, 1999). In the form of the amino acid selenocysteine, it is a component of a number of antioxidant enzymes, *e.g.*, glutathione peroxidase and thioredoxin reductase (Arner and Holmgren, 2000; Brigelius-Flohe et al., 2000). Among the functions of the immune system are the induction of apoptosis and the production of reactive oxygen species (ROS) (Forman and Torres, 2001; Marsden and Strasser, 2003). Vitamin E (VE) (alpha-tocopherol) is a naturally occurring antioxidant nutrient that plays an important role in animal health by inactivating harmful free radicals that are produced through normal cellular activity and from various stressors. The antioxidant function of this micronutrient could, at least in part, enhance immunity by maintaining the functional and structural integrity of important immune cells (Arita et al., 1998; Chinoy and Memon, 2001; Yousef et al., 2003; El-Demerdash et al., 2004).

Thus, the objective of this study was to evaluate the utilization of a standard treatment with diminazene aceturate against the infection caused by *T. evansi*, associated to the antioxidant compounds sodium selenite and vitamin E *in vitro* and *in vivo*.

## **2 Materials and methods**

### **2.1. Compounds**

Diminazene aceturate tested is a commercial product (Ganaseg<sup>®</sup> 7% - Novartis). Sodium selenite was acquired from Merck Brazil in powder and diluted in physiologic solution (0,9%) resulting in a final concentration of 1,67%. Vitamin E utilized is a commercial product (Monovin E<sup>®</sup> 10% - Bravet).

### **2.2. *T. evansi* isolated**

*T. evansi* was originally isolated from a dog naturally infected (Colpo et al., 2005). Initially, two rats (Rat 1 and Rat 2) were infected intraperitoneally with blood (cryopreserved in liquid nitrogen) containing  $10^6$  parasites/animal. This procedure was performed to obtain a large amount parasites for posterior tests *in vitro* and *in vivo*.

### **2.3. *In vitro* tests**

When rat 1 showed high parasitemia (85 trypanosomes per microscopic field at a magnification of 1000x), it was anesthetized with isoflurane inside an anesthetic chamber to further collect the blood sample. Blood was diluted in PBS-glucose (1:1 v/v) and distributed in tubes (1 mL containing  $1.92 \times 10^7$  parasites per  $\mu\text{l}$ ) to carry on *in vitro* tests (Da Silva et al., 2009). Treatments using diminazene aceturate, sodium selenite and vitamin E were performed

and compared to the control group (untreated). All tests were carried out in triplicate at concentrations of 0.25, 1.0 and 4.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . After 1, 3, 6 e 24 hours post-treatment, quantifications of alive trypanosomes were made in Neubauer chamber as described by Da Silva et al. (2009).

#### **2.4. Experimental animals**

A total of 72 adult outbreed females Wistar rats (mean age of 60 days) weighing  $\sim 206 \pm 17$  grams were kept in cages (8 animals each), in room with controlled temperature and humidity (25°C; 70%), fed with commercial ration and water *ad libitum*. All animals were submitted to 15 days of adaptation previously to the experiment. Procedure was approved by the Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), number 14/2010.

#### **2.5. Groups and *Trypanosoma* infection**

Rats were separated into 9 groups (A, B, C, D, E, F, G, H and I), 8 animals each. Group A served as uninfected group (negative control). Groups B to I were infected intraperitoneally with 0.2 mL of blood (Rat 2) containing  $10^6$  trypanosomes. Parasitemia was estimated daily by microscopic examination of blood smears. Each slide was mounted with blood collected from the tail vein, stained by the panoptic method, and visualized at a magnification of 1000x.

#### **2.6. Experimental delineation**

Group A was composed by healthy animals, while Group B was composed by untreated animals (positive control). Diminazene aceturate was administrated in a single dose on the third day PI. Sodium selenite and vitamin E were administered at the 3<sup>rd</sup> and 23<sup>rd</sup> day



PI, with 20 days of interval between administrations. After the third day PI rats were treated following the protocol detailed hereafter. Group C were treated with diminazene aceturate ( $7 \text{ mg kg}^{-1}$  intramuscular - IM); Group D treated with sodium selenite ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$  subcutaneous - SC); Group E was treated with vitamin E (2000 UI - IM); Group F received an association of diminazene aceturate ( $7 \text{ mg kg}^{-1}$  - IM) with sodium selenite ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$  - SC); Group G received an association of diminazene aceturate ( $7 \text{ mg kg}^{-1}$  - IM) with vitamin E (2000 UI - IM); Group H was treated with an association of diminazene aceturate ( $7 \text{ mg kg}^{-1}$  - IM), sodium selenite ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$  - SC) and vitamin E (2000 UI - IM); Group I received an association of sodium selenite ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$  - SC) with vitamin E (2000 UI - IM).

## 2.7. Sample collection

After 30 days of infection all survivor rats were anesthetized with isoflurane inside an anesthetic chamber to perform collection of blood samples (1.5 mL by intracardiac puncture). Approximately 10 minutes after the procedure all animals showed signs of recovery. A volume of 0.5 mL was used to carry out hematocrit and leucogram, and 1 mL was used to obtain serum to the measurement of TBARS levels. On the 60<sup>th</sup> day PI, all the survivor rats were anesthetized following the same procedures prior cited, and then, decapitated as recommended by the Ethics Committee. From the blood samples were evaluated hematocrit, leucogram and levels of TBARS, exactly the same procedure carried on 30<sup>th</sup> day PI. Whole brain was removed and placed into tubes filled with ethanol (70%) for conservation and further achievement of specific *T. evansi* polymerase chain reaction (PCR), in an attempt to verify the curative efficacy of the tested protocols.

## 2.8. Hematologic parameters

Hematocrit was measured using the standard microhematocrit method (Centimicro mod. 1-15-Sigma, Germany) according to Schalm et al. (1975). Total leukocytes count was determined using an electronic counter. Blood smears were stained with the panoptic method to perform differential leukocyte counting.

## 2.9. Lipid peroxidation

Serum lipid peroxidation was determined by measurement of TBARS level, according to Jentsch et al. (1996). Results were obtained by spectrophotometry at 535 nm and then expressed in nanomoles of malondialdehyde per milliliter of serum.

## 2.10. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Genomic DNA of brains was extracted using phenol-chlorophorm method (Sambrook et al., 1989) and submitted to agarose gel electrophoresis (1%) for determination of quality and quantity of samples. PCR was carried out with specific primers to *T. evansi* (Ventura et al., 2002). Te664a (5' AAA CCC GTC CTC TTG GAG G 3') and Te664b (5' ATC CAT CTA AGA GTT GT 3') in a concentration of 1µM each, 1.5U of Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) 1x, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 250 µM each dNTP and 1 µl of DNA. Reactions were submitted to initial denaturation at 95°C during 3 minutes, followed by 35 cycles composed of 3 steps: 95°C (1 minute), 56°C (1 minute) and 72°C during 1 minute. Finally, it was achieved a final extension (72°C/1 minute). Amplified samples were analyzed by agarose gel electrophoresis at 80V in one hour, stained with ethidium bromide and photographed in UV light. Purified DNA of *T. evansi* by DEAE-Cellulose chromatography was used as the positive control, and as the negative control it was used sterile ultra-pure water.

## 2.11 Statistic analysis

Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test to compare the means and date precision. P<0.05 was considered to represent a significant difference among the analyses.

### 3 Results

#### 3.1. *In vitro* tests

*In vitro* tests showed trypanocidal effect associated to the treatment with diminazene aceturate and sodium selenite against *T. evansi*, once it was obtained a significant reduction ( $P < 0.001$ ) of parasites number when compared to the control group and the group treated with vitamin E (Fig. 1). Reduction of flagellates was proportional to the concentration in both treatments (diminazene aceturate and sodium selenite). Tests with diminazene aceturate showed reduction of protozoa number in all the concentrations as compared to the control group one hour after treatment (Fig. 1A), as well as to the sodium selenite tests (Fig. 1B). After 6h, in aceturate tests were not found alive parasites for the three concentrations (Fig. 1A). Sodium selenite tests showed no trypanosomes alive after 6 hours, but only at 1.0 e 4.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 1B). It was not observed differences between tests on vitamin E and control group (Fig. 1C). After 24h of *in vitro* tests, it was even possible to observe alive parasites in the control group.

#### 3.2. *In vivo* tests

The prepatency period in *T. evansi* infected groups ranged from 1 to 1.4 days (Table 1). Therefore, all rodents were positives when the treatment was started. Rats from groups B, D, E and I showed an increasing parasitemia over time and longevity of 5.1, 7.6, 6.5 and 6.2 days post-infection (PI), respectively. Rodents from groups A, C, F, G and H showed longevity of 60, 53.3, 60, 47.8 and 60 days PI, respectively (Table 1). It was observed that the animals which were submitted to the association of diminazene aceturate and sodium selenite survived at least until the 60th day, as well as the negative control. Trypomastigotes were not observed in the blood smears of rats from groups F and H after treatments. Groups C (2 rats) and G (3) showed increased parasitemia and death during the experimental period (Table 1).

### 3.3. Hematological Parameters

Hematological parameters were evaluated only in groups A, C, F, G and H, since the animals of the other infected groups died a few days PI (Table 1). With 30 days of experiment were not observed differences between groups in hematocrit, total leucocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils (Fig. 2). Nevertheless, at 60 days PI it was verified a significative hematocrit reduction ( $P<0.05$ ) in group C and G, as compared to negative control group (Fig. 2A). Leucogram showed a significant decrease ( $P<0.05$ ) of the leucocytes number in the group C (Fig. 2B) compared to group A, as well as lymphocytes number. Significative increase of total leukocyte number occurred in group G and could be explained due an increase in the number of circulating lymphocytes (Fig. 2B).

### 3.4. Levels of TBARS in serum

As well as to the hematological parameters, levels of TBARS were evaluated only in groups A, C, F, G and H. The evaluation carried out on day 30 PI did not show differences among groups (Fig. 3). However, after 60 days PI in groups treated with diminazene aceturate and antioxidants (Groups F, G and H) it was observed a decrease ( $P<0.05$ ) of TBARS levels in serum, when compared to group A and C (Fig. 3).

### 3.5. Parasitological and molecular diagnostic

It was observed after 60 days PI, by blood smear and PCR, that group C presented three *T. evansi* positive animals; F one positive, G two positive and group H two positive animals. Therapeutic efficacy was calculated by the number of alive and negative for *T. evansi* front parasitological and molecular techniques at the end of experiment. Therefore, curative efficacy of treatments was 37.5, 87.7, 37.7 and 75% to groups C, F, G and H, respectively. PCR was negative to all rodents in group A and positive to all animals in group B.

## 4 Discussion

*In vitro* tests showed trypanocidal effects associated to the treatment with diminazene aceturate and sodium selenite against *T. evansi*. Tests performed with vitamin E obtained results similar with the control group. Diminazene aceturate, when compared to sodium selenite, was more effective at concentrations of 0.25 and 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , since at 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  it was observed the same results. These results might be related to the dose, probably due a toxic effect, since we did not find neither alive nor dead trypanosomes at microscopic evaluation at concentrations of 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Not much is known about the mechanism(s) of sodium selenite toxicity. However, at elevated concentrations, selenium is also extremely toxic and there is mounting evidence that it's toxicity in both prokaryotes and eukaryotes relates to its prooxidant capacity (Spallholz, 1994). For example, in the reduction of selenite by reduced glutathione and other thiols, superoxide (and, in some cases, hydrogen peroxide) can be generated (Seko et al., 1989; Ip et al., 1991; Spallholz, 1994) Thus, toxicity is thought to become manifested when the prooxidant conditions exceed cellular antioxidant defenses (Spallholz, 1994) and this might explain a possible mechanism of toxicity doses-dependent against *T. evansi in vitro*.

The *in vitro* tests showed a reduction in the trypanosomes number and a trypanocidal effect was supposed. However, all animals from groups which received a single treatment with sodium selenite or vitamin E died. Therefore, this effect was rejected and based on associations of treatments and results obtained *in vivo* a protective effect has been considered, since these tests demonstrated an increased longevity to the groups C, F, G and H. Increased longevity might be related to this protective effect through immune protection and selenium influences on both the innate, "nonadaptive" and the acquired, "adaptive" immune systems (Spallholz, 1990; Turner and Finch, 1991; Kiremidjian-Schumacher and Roy, 1998; McKenzie et al., 2001). The innate immune system includes barriers to infection and nonspecific effectors cells such as macrophages. Both the T and B lymphocytes form the major effectors cells of the acquired system that mature with exposure to immune challenges. Selenium-deficient lymphocytes are less able to proliferate in response to mitogen, and in macrophages, leukotriene B4 synthesis, which is essential for neutrophil chemotaxis, is impaired by this deficiency (Arthur et al., 2003). Humoral system is also affected by selenium deficiency; for example, IgM, IgG and IgA titers are decreased in rats deficient of selenium (Arthur et al., 2003). Vitamin E deficiencies have been implicated in some pathologic

conditions, such as cancer, coronary heart disease, and liver necrosis (Keaney et al., 1999; Ricciarelli et al., 2001) and are also accompanied by a loss of immunocompetence (Meydani and Beharka, 1998). There is also a complementary function carried out by vitamin E when sodium selenite became deficient (which results in a decrease in the capacity to reduce lipid hydroperoxides) suppressing the formation of lipid hydroperoxides, preventing lipid peroxidation (Saito et al., 2003). It is known that selenium and vitamin E show compensative effects and that a deficiency of both elements causes massive injury in some cases (Navarro et al., 1998; Beck et al., 2003). It was observed that all groups which received antioxidant components in the treatment did not show statistical difference when compared to negative control group, demonstrating the general maintenance of health status and, also, did not show recurrence of parasitemia after antioxidants treatment (Group F and H).

With 30 days of experiment were not observed differences among the groups in hematocrit, total leucocytes, neutrophils, lymphocytes number, monocytes and eosinophils, however it was found a significant hematocrit reduction in groups C and G at 60 days PI, which strengthens the importance and role of sodium selenite protection in trypanosome infection, since in these groups there was no utilization or treatment with this component. Anemia is often described and it is characterized by decreased values of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit. However, its causes are not completely understood (Silva et al., 1995; Marques et al., 2000; Aquino et al., 2002). The proposed mechanisms are erythrophagocytosis, destruction of the erythrocytes by the immune system, erythrocyte osmotic fragility, hemodilution and erythropoietic depression (Jenkins and Facer, 1985; Aquino et al., 2002). It is believed that antioxidant treatment might prevent the erythrocyte destruction, since selenocysteine in its amino acid form is a component of antioxidants enzymes, for example glutathione peroxidase and thioredoxin reductase (Arner and Holmgren, 2000; Brigelius-Flohe et al., 2000) and thus, increase the resistance against *T. evansi* infection. Animals which received treatment with vitamin E had an increase of the total leucocytes number, mainly due the increase of lymphocytes. This event may be explained since lower concentrations of vitamin E are related to destabilization of immune cells, generating a reduction of immune system activity and decreased production of immunoglobulin and interleucine-2 (Fernández et al., 2002), therefore decreasing the number of cells as well as its activity. In other hand, vitamin E supplementation improves, for example, some aspects of the age-related decline in immune function in laboratory animals, since increasing the amount of vitamin E in the diet of old mice from 30 to 500 ppm significantly increases delayed-type hypersensitivity (DTH) response, lymphocyte proliferation in response to mitogen, and production

of IL-2, enhancing the immunity (Meydani et al., 1986). However, this increase of circulating lymphocytes stimulated by vitamin E was not sufficient for the control of infection when vitamin E was associated with diminazene aceturate, differently of sodium selenite which did not change leucogram, but when associated with diminazene aceturate showed great curative efficacy on the treatment of trypanosomosis.

It is possible to establish a correlation between hematocrit reduction and TBARS levels. TBARS levels also did not present alterations on day 30 PI, but on day 60 PI, in the groups treated with diminazene aceturate and antioxidants (F, G and H), It was observed a decrease ( $P < 0.05$ ) of TBARS levels in serum when compared to group A and C which did not receive antioxidant treatment. This might represent an antioxidant protection against *T. evansi*, since it was observed hematological reduction in the same group that had the TBARS levels increased. Vitamin E showed good results on antioxidant protection helping to keep the TBARS levels low due the suppression of lipid hydroperoxides formation, preventing lipid peroxidation (Saito et al., 2003), but to the hematological parameters vitamin E did not show the same efficiency or protection, since group G presented hematocrit reduction. PCR was carried out at the 60 PI aiming confirm the success of therapy. It was confirmed representative of curative efficacy related to antioxidant treatment associated with drug therapy, especially to sodium selenite. Groups that received sodium selenite as complementary component in the treatment showed higher curative efficacy compared to the groups that did not receive.

Based on our results, we conclude that antioxidant treatment associated with drug therapy increase the longevity, prevent hematocrit reduction, increase the leucocytes and lymphocytes number and reduce lipid peroxidation. These results obtained might be associated to protective effects offered by sodium selenite, increasing the success of treatment when in association with diminazene aceturate and also reducing the parasitemia recurrence front to the treatment. Vitamin E did not show the same protective and trypanocidal effects observed in the treatment with sodium selenite, but showed satisfactory results when reducing TBARS levels in serum and, thus, acting as an immune system stimulant.

## References

- Aquino, L.P.C.T., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Santana, A.E., Castro, M.B., Marques, L.C., Malheiros, E.B., 2002. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 54, 8–18.
- Arner, E.S., and Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267, 6102–6109.
- Arita, M., Sato, Y., Arai, H., Inoue, K., 1998. Binding of alphotocopherylquinone, an oxidized form of alpha-tocopherol, to glutathione S-transferase in the liver cytosol. *FEBS Letters* 436, 424–426.
- Arthur, J.R., McKenziey, R.C., Beckett, G.J., 2003. Selenium in the Immune System. *The Journal of Nutrition* 133, 1457S–1459S.
- Beck, M.A., Williams-Toone, D., Levander, O.A., 2003. Coxsackievirus B3-resistant mice become susceptible in Se/Vitamin E. *Free Radical Biology and Medicine* 54, 1263–1270.
- Brigelius-Flohe, R., Maurer, S., Lotzer, K., Bol, G., Kallionpaa, H., Lehtolainen, P., Viita, H., and Yla-Herttuala, S., 2000. Overexpression of PHGPx inhibits hydroperoxide-induced oxidation, NFkappaB activation and apoptosis and affects oxLDL-mediated proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 152, 307–316.
- Chinoy, N.J., Memon, M.R., 2001. Beneficial effects of some vitamins and calcium on fluoride and aluminium toxicity on gastrocnemius muscle and liver of male mice. *Fluoride* 34, 21–33.
- Colpo, C.B., Monteiro, S.G., Stainki, D.R., 2005. Natural infection by *Trypanosoma evansi* in dogs. *Ciência Rural* 35, 717–719.



- Combs, G.F. Jr., 1999. Chemopreventive mechanisms of selenium. [Medizinische Klinik](#) 94, 18–24.
- Combs, G.F. Jr., and Gray, W.P., 1998. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacology & Therapeutics* 79, 179–192.
- Da Silva, A.S., Costa, M.M., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2008a. Alterações hematológicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi*. *Ciência Rural* 38, 538–542.
- Da Silva, A.S., Tochetto, C., Zanette, R.A., Pierezan, F., Rissi, D.R., Santurio, J.M., Monteiro, S.G., 2008b. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. *Ciência Rural* 38, 1357–1362.
- Da Silva, A.S., Botton, J., Wolkmer, P., Zanette, R.A., Lopes, S.T.L., Anjos; Alves, S.H., Monteiro, S.G., 2009. *Trypanosoma evansi* susceptibility to amphotericin B. *Ciência Rural* 9, 2550-2555.
- Dávila, A.M.R., Silva, R.A.M.S., 2000. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 199–212.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S., Baghdadi, H.H., 2004. Role of a-tocopherol and b-carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato-biochemical parameters, and semen quality of male rats. *Journal of Environmental Science and Health* 39, 443–59.
- Fernández, C.F., Febles, C.S., Bernabeu, A.S., Triana, B.E.G., 2002. Funciones de la vitamina E. Actualización. *Revista Cubana de Estomatología* 40, 28- 32.
- Forman, H.J., and Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine* 22, 189–216.

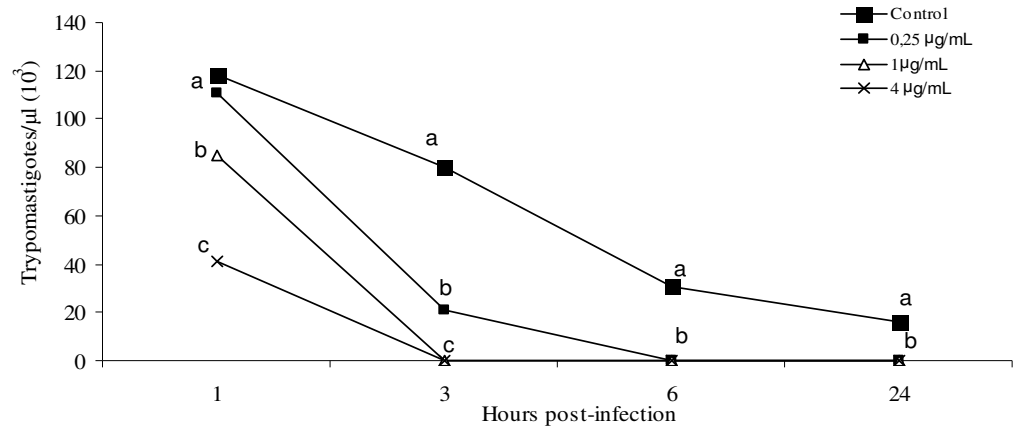
- Herrera, H.M., Davila, A.M., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., Andrea, O.S., Jansen, A.M., 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Veterinary Parasitology* 125, 263–275.
- Hoare, C.A., 1972. *The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph*. Blackwell, London.
- Ip, C., Hayes, C., Budnick, R. M., Ganther, H.E., 1991. Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Research* 51,595-600.
- Jenkins, G.C., Facer, C.A., 1985. Hematology of African trypanosomiasis. In: Tizard, I. (Ed.), *Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis*. CRC Press, Boca Raton, 231 pp. 13–44.
- Jentsch, A.M., Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, H.K., 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20, 251-256.
- Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Power, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., Dani, V.S., Bhargava, A., 2005. Human Trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73,491–495.
- Keaney, J.F., Simon, D.I., Freedman, J.E., 1999. Vitamin E and Vascular Homeostasis: Implications for Atherosclerosis, *FASEB Journal* 13, 965–976.
- Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M., 1998. Selenium and immune function. [Zeitschrift für Ernährungswissenschaft](#) 37, 50–56.
- Lun, Z.R., Desser, S.S., 1995. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? *Parasitology Today* 11,131–133.
- Marques, L.C., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Aquino, L.P.C.T., Pereira, G.T., 2000. Experimental infection with *Trypanosoma evansi* in horses: clinical and haematological observations. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 9, 11–15.

- Marsden, V.S., and Strasser, A., 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annual Review of Immunology* 21, 71–105.
- McKenzie, R. C., Rafferty, T. S., Arthur, J. R. & Beckett, G. J., 2001. Effects of selenium on immunity and ageing. In: *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health* (Hatfield, D. L., ed.), pp. 258–272. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Meydani, S.N., Meydani, M., Verdon, C.P., 1986. Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E2 synthesis and enhances the immune response of aged mice. *Mechanisms of Ageing and Development* 34, 191–201.
- Meydani, S.N., Beherka, A.A., 1998. Recent developments in vitamin E and immune response. *Nutrition Reviews* 56, S49.
- Navarro, F., Navas, P., Burgess, J. R., Bello, R. I., De Cabo, R., Arroyo, A., Villalba, J. M., 1998. Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane. *FASEB Journal* 12, 1665–1673.
- Peregrine, A.S., Mamman, M., 1993. Pharmacology of diminazine: a review. *Acta Tropica* 54, 185–203.
- Ricciarelli, R., Zingg, J.M., Azzi, A., 2000. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation* 102, 82 - 87.
- Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa, T., Takahashi, K., Niki, E., 2003. Cell Death Caused by Selenium Deficiency and Protective Effect of Antioxidants. *Journal Of Biological Chemistry* 278, 39428–39434.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York pp. 9.16–919.

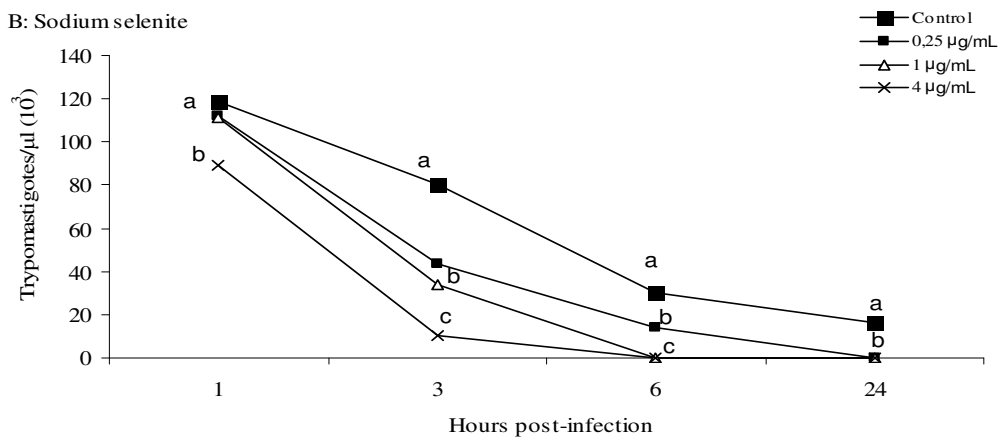
- Schalm, O.W., Jain, N.C., Carrol, E.J., 1975. Veterinary hematology. 3<sup>ed</sup>. Philadelphia: Lea & Febiger. p.122-143.
- Seko, Y., Saito, Y., Kitahara, J., Imura, N., 1989. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione *in vitro*, p. 70-73. In A. Wendel (ed.), Selenium in biology and medicine. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Silva, R.A.M.S., Herrera, M.M., Domingos, L.B.S., 1995. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects. *Ciência Rural* 25, 233–238.
- Spallholz, J. E., 1990. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 262, 145–158.
- Spallholz, J. E., 1994. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine* 17, 45-64.
- Sirivan, C., Pramoolsinsap, T., Pemayodhin, P., 1994. Effect of diminazeno aceturate and isometamidium chloride on the control of *Trypanosoma evansi* in naturally infected sow. *Thai Journal of Health Research* 8, 101–109.
- Tarello, W., 2005. *Trypanosoma evansi* infection in three cats. *Revue de Médecine Vétérinaire* 156, 133–134.
- Tuntasuvan, D., Jarabrum, W., Viseshakul, N., Mohkaew, K., Borisutsuwan, S., Theeraphan, A., Kongkanjana, N., 2003. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. *Veterinary Parasitology* 110, 227–233.
- Turner, R. J., and Finch, J. M., 1991. Selenium and the immune response. *Proceedings of the Nutrition Society* 50, 275–285.

Yousef, M.I., Abdallah, G.A., Kamel, K.I., 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science* 76, 99–111.

A: diminazene aceturate



B: Sodium selenite



C: Vitamin E

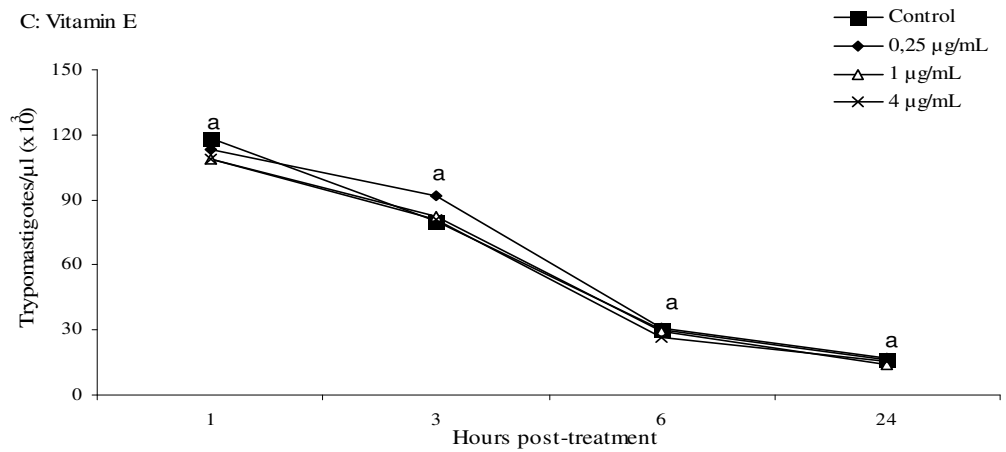


Figure 1 – Dose-response effect of diminazene acetate (A), sodium selenite (B) and vitamin E (C) on the viability of *Trypanosoma evansi* *in vitro* compared to the control. Means followed by same letters in the same column are not statistically different among themselves at 5% probability by Tukey test

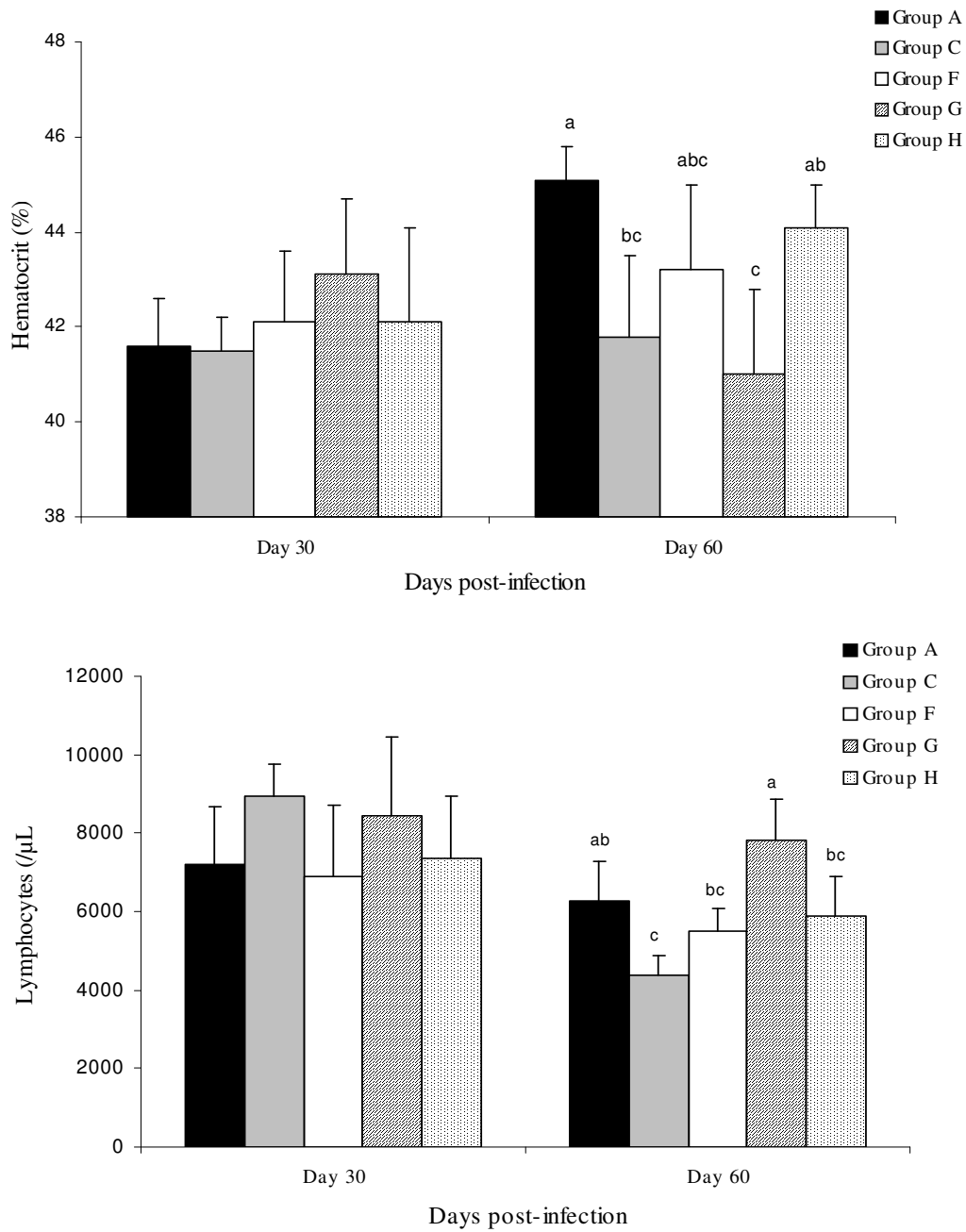


Figure 2 – Mean and standard deviation of hematocrit and lymphocytes from animals subjected to the infection by *T. evansi* and treatment with diminazene aceturate, sodium selenite, vitamin E and association between these drugs. Difference ( $P < 0.01$ ) between groups (identified by different letters) were observed only on day 60 post-infection.

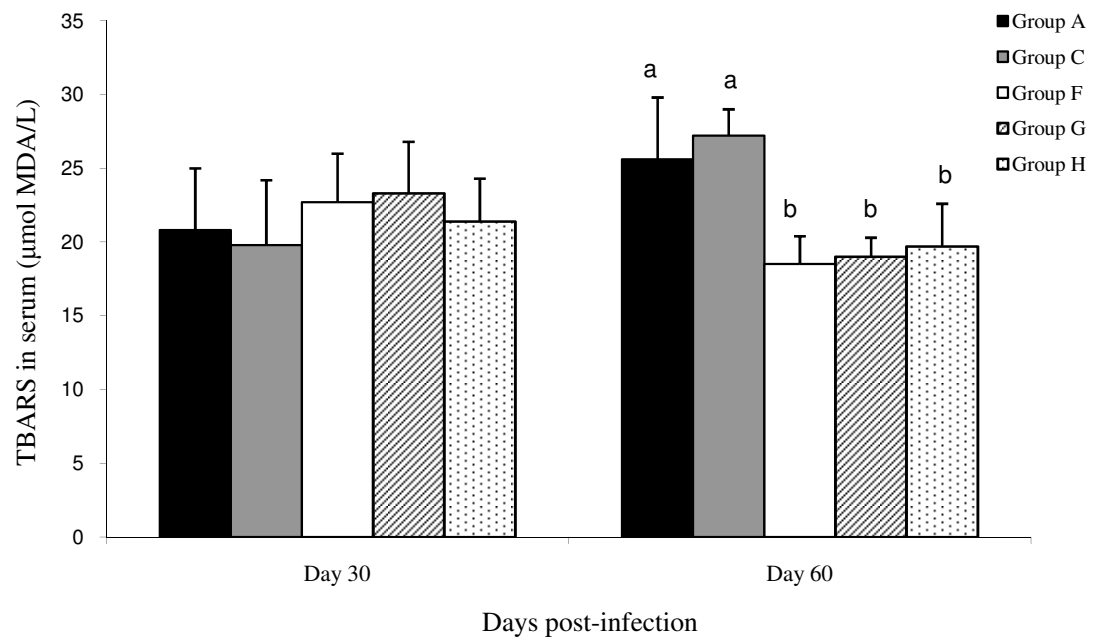


Figure 3 – Mean and standard deviation of lipid peroxidation (TBARS) of *T. evansi*-infected and treated rats compared to the controls at different periods post-inoculation. Same letters in the same column (60 days post-infection) for each drug concentration were not statistically different ( $P < 0.05$ ).



Table 1 – Mean and standard deviation of the pre-patent period, longevity, mortality and success of therapy using treatment with diminazene of aceturate, sodium selenite and vitamin E in rats experimentally infected with *T. evansi*.

| Grupos                              | Prepatency<br>period (Day) | Longevity<br>(Day)        | Mortality<br>(n) | *Positive<br>(n) | Therapeutic<br>success (%) |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| A - Negative control                | -                          | 60.0 <sup>a</sup> (±0.0)  | 0/8              | 0/8              | -                          |
| B - Positive control                | 1.1 <sup>a</sup> (±0.21)   | 5.1 <sup>b</sup> (±0.45)  | 8/8              | 8/8              | -                          |
| C - Diminazene aceturate (D.A)      | 1.0 <sup>a</sup> (±0.32)   | 53.3 <sup>a</sup> (±9.17) | 2/8              | 5/8              | 37.5                       |
| D - Sodium selenite (S.S)           | 1.3 <sup>a</sup> (±0.41)   | 7.6 <sup>b</sup> (±3.51)  | 8/8              | 8/8              | 0.0                        |
| E - Vitamin E (V.E.)                | 1.4 <sup>a</sup> (±0.53)   | 6.5 <sup>b</sup> (±2.33)  | 8/8              | 8/8              | 0.0                        |
| F – Association: D.A. + S.S.        | 1.3 <sup>a</sup> (±0.38)   | 60.0 <sup>a</sup> (±0.0)  | 0/8              | 1/8              | 87.5                       |
| G – Association: D.A. + V.E.        | 1.1 <sup>a</sup> (±0.33)   | 47.8 <sup>a</sup> (±13.4) | 3/8              | 5/8              | 37.5                       |
| H – Association: D.A. + S.S. + V.E. | 1.2 <sup>a</sup> (±0.23)   | 60.0 <sup>a</sup> (±0.0)  | 0/8              | 2/8              | 75.0                       |
| I – Association: S.S. + V.E.        | 1.4 <sup>a</sup> (±0.31)   | 6.2 <sup>b</sup> (±1.6)   | 8/8              | 8/8              | 0.0                        |

Note: Means followed by the same letters in the same column do not differ significantly in Tukey's test. \* Animals with blood smear and PCR positive for *T. evansi*.

## **4 CONCLUSÃO**

A associação dos antioxidantes selenito de sódio e vitamina E ao aceturato de diminazeno no tratamento da tripanosomose no modelo experimental testado, aumentou a longevidade, preveniu a redução do hematócrito, aumentou o número de leucócitos e linfócitos e reduziu a peroxidação lipídica. Os resultados obtidos podem estar associados a efeitos protetores oferecidos pelo selenito de sódio, podendo aumentar o sucesso no tratamento desta doença, quando em associação com o aceturato de diminazeno, também auxiliando na redução das recorrências de parasitemia comumente observadas neste protocolo de tratamento. A vitamina E não mostrou o mesmo efeito protectorio e tripanocida observado no tratamento com selenito de sódio, porém apresentou resultados satisfatórios quanto a redução dos níveis de TBARS no soro e, assim, agindo como um estimulante do sistema imunológico.

## REFERÊNCIAS

ADEREM, A. A. et al. Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 161, n. 3, p. 617–622, Mar. 1985.

AMER, S. et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Egypt, a pilot study. **Acta Tropica**, Basel, v. 117, n. 1, p. 39-46, Jan. 2011.

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

ARNÉR, E. S. J. Selenoproteins- What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? **Experimental Cell Research**, New York, v. 316, n. 8, p. 1296-1303, Mai. 2010.

ARTHUR, J. R. et al. Selenium in the immune system. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, n. 5, p. 1457-1459, Mai. 2003.

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

ARITA, M. et al. Binding of alphatocopherylquinone, an oxidized form of alpha-tocopherol, to glutathione S-transferase in the liver cytosol. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 436, n. 3, p. 424–426, Out. 1998.

ARNER, E.S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 267, n. 20, p. 6102–6109, Out. 2000.

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

BARAL, T. N. et al. Control of *Trypanosoma evansi* Infection Is IgM Mediated and Does Not Require a Type I Inflammatory Response. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.195, n.10, p.1513-20, Mai. 2007.

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

BENGALY, Z. et al. Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 96, n. 2, p.101–113, Mar. 2001.

BERLIN, D. et al. Longitudinal study of an outbreak of *Trypanosoma evansi* infection in equids and dromedary camels in Israel. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, p. 317-322, Set. 2010.

BERZELIUS, J. J. et al. Sur deux métaux nouveaux, **Annales des Chimie et des Physique**, Paris, v. 7, p. 199–202, 1818.

BORST, P.; FASE-FOWLER, F.; GIBSON, W. C. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 31-38, Fev. 1987.

BOYT, W. P. **A Field guide for diagnosis, treatment and prevention of African animal Trypanosomiasis**. [S.l.]: FAO, 1986. 139 p.

BRANDÃO, L. P. et al. Infecção Natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão – Relato de caso. **Clínica Veterinária**, São Paulo, Ano VII, n. 36, p. 23-26, Jan. - Fev. 2002.

BRIGELIUS-FLOHE, R. et al. Overexpression of PHGPx inhibits hydroperoxideinduced oxidation, NFkappaB activation and apoptosis and affects oxLDL mediated proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 152, n. 2, p. 307–316, Out. 2000.

BRUN, R. et al. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 95-107, Jan. 1998.

CARRINGTON, M. et al. Variant specific glycoprotein of *Trypanosoma brucei* consists of two domains each having an independently conserved pattern of cysteine residues. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 221, n. 3, p. 823–835, Out. 1991.

CHEN, J. Y. et al.  $\alpha$ -Tocopherol Content and Oxidative Stability of Egg Yolk as Related to Dietary  $\alpha$ -Tocopherol. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 5, p. 919-922, Set. 1998.

CHINOY, N.J.; MEMON, M.R. Beneficial effects of some vitamins and calcium on fluoride and aluminium toxicity on gastrocnemius muscle and liver of male mice. **Fluoride**, Lawrence, v. 34, n. 1, p. 21-33, Jan. 2001.

CHUN, J. et al. A differential assay of folic acid and total folate in foods containing enriched cereal-grain products to calculate mg dietary folate equivalents (mg DFE). **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 2-3, p. 182-187, Mar.-Mai., 2006.

CLAES, F. et al. Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. **Kinetoplastid Biology and Disease**, London, v. 3, n. 3, p. 3-9, Set. 2004.

COLPO, C.B. et al. Infecção Natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p.717-719, Mai. - Jun. 2005.

COMBS Jr, G.F.; GRAY, W.P. Chemopreventive agents: selenium. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 79, n. 3, p. 179-192, Set. 1998.

COMBS Jr, G.F. Chemopreventive mechanisms of selenium. **Medizinische Klinik**, Munich, v. 94, n. 3, p. 18-24, Out. 1999.

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

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

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

DA'DARA, A.A.; METT, H.; WALTER, R.D. MGBG analogues as potent inhibitors of S-adenosylmethionine decarboxylase of *Onchocerca volvulus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 97, n. 1-2, p. 13-19, Nov. 1998.

DA SILVA, A. S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 373-376, Jun. 2008.

DA SILVA et al. Clinical aspects of cats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 19, n. 1, p. 85-89, Ago. 2009.

DA SILVA, A. S. et al. Anemia in cats infected by *Trypanosoma evansi*. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 20, n. 4, p. 393-396, Mai. 2010.

DARGANTES, A. P. Estimating the impact of *Trypanosoma evansi* infection (Surra) on buffalo population dynamics in southern Philippines using data from cross-sectional surveys. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, n. 10, p.1109-1114, Ago. 2009.

DÁVILA, A. M.; SILVA, R. A. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 916, n. 1, p. 199-212, Jan. 2000.

DEAN, W. F. & G. F. COMBS. Influence of dietary selenium on performance, tissue selenium content, and plasma concentrations of selenium-dependent glutathione peroxidase, vitamin E, and ascorbic acid in ducklings. **Poultry Science**, College Station, v. 60, n. 12, p. 2655-2663, Dez. 1981.

DEGER, Y. et al. Lipid Peroxidation and Antioxidant Potential of Sheep Liver Infected Naturally with Distomatosis. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, Ankara, v. 32, n. 1, p. 23-26, Fev. 2008.

DELAFOSSÉ, A.; DOUTOUM, A. A. Prevalence of *Trypanosoma evansi* infection and associated risk factors in camels in eastern Chad. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam v. 119, n. 2-3, p. 155-164, Jan. 2004.

DESQUESNES, M. et al. The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 95, n. 1-2, p. 141-155, Jun. 2001.

DIA, M. L. et al. Some factors affecting the prevalence of *Trypanosoma evansi* in camels in Mauritania. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 111-120, Out. 1997.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan. 2002.

DUROCHER, J. R. et al. Role of sialic acids in erythrocyte survival. **Blood**, Washington, v. 45, n. 1, p. 11-20, Jan. 1975.

ELAMIN, E. A. et al. Prevalence and infection pattern of *Trypanosoma evansi* in camels in mid-eastern Sudan. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 30, n 2, p. 107-114, Abr. 1998.

EL-DEMERDASH, F.M. et al. Role of atocopherol and b-carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato-biochemical parameters, and semen quality of male rats. **Journal of Environmental Science and Health**, New York, v. 39, n. 3, p. 443-459, Mai. 2004.

FLOHÉ, L. et al. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 132-134, Mai. 1973.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 22, n. 4-5, p. 189-216, Ago.- Out. 2001.

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, Jan. - Fev. 2007.

GANDRA, P.G. et al. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 980-985, Nov-Dez, 2004.

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

GONZALEZ, V.M. et al. The formation of DNA interstrand cross-links by a novel bis-[Pt<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>(diminazene acetate)<sub>2</sub>]Cl<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O complex inhibits the B to Z transition. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 55, n. 4, p. 770-77, Abr. 1999.

GUTIERREZ, C. et al. Camel trypanosomosis in the Canary Islands: assessment of seroprevalence and infection rates using the card agglutination test (CATT/T. evansi) and parasite detection tests. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 130, p. 163-168, 2000.

HALLIWELL, B. et al. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? **Free Radical Research**, Yverdon, v.33, n.6, p.819-830. Dez. 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 6<sup>a</sup> ed. Oxford University, 2007.

HATFIEDL, D. L.; GLADYSHEV, V. N. How Selenium Has Altered Our Understanding of the Genetic Code. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 22, n. 11, p. 3565–3576, Jun. 2002.

HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 107, n. 5, p. 401-404, Mai. 1986.

HERRERA, H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, n. 3-4, p. 263-275, Nov. 2004.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, New York, v. 26, n. 4, p. 277-285, Out. 1989.

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

JAKTAR, P.R.; PUROHIT, M.S. Pathogenesis of anemia in *Trypanosoma evansi* infection. I Hematology. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 48, p. 239-244, Ago. 1971.

JL, L. L.; STRATMAN, F. W.; E LARDY, H. A. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle: influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 15, n. 263, p. 150-160, Mai. 1998.

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

KAMBLE, P. et al. Selenium intoxication with selenite broth resulting in acute renal failure and severe gastritis. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, Riyadh, v. 20, n. 1, p. 106-111, Jan. 2009.



- KAZURA, J.W.; MESNICK, S.R. Scavenger enzymes and resistance to oxygen-mediated damage in *Trichinella spirallis*. **Molecular Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 1-10, Jan. 1984.
- KUBIAK, G. V. L.; MOLFI, A. **Tripanosomíase equina (Mal das Cadeiras)**. Curitiba: Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná. Tip. João Haupt, 1954. 51 p. (Boletim n. 33).
- LAHA, R.; SASMAL, N. K. Endemic status of *Trypanosoma evansi* infection in a horse stable of eastern region of India - a field investigation. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 40, p. 357-361, Jun. 2008.
- LANHAM, S. M.; GODFREY, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE-cellulose. **Experimental Parasitology**, New York, v. 28, n. 3, p. 521-534, Dez. 1970.
- LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. 2nd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973, 406p.
- LIKOFF, R. O. et al. Vitamin E and aspirin depress prostaglandins in protection of chickens against *Escherichia coli*. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 34, n. 2, p. 245-251, Fev. 1981.
- LUCAS, S. Pathology of tropical infections. In: MCGEE, J. O. D. et al. **Oxford textbook of pathology**. New York: Oxford University Press, v. 2b, cap. 29, p. 2187-2265, 1992.
- LUN, Z. R. et al. Trypanosomiasis of domestic animals in China. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 41-45, Fev. 1993.
- MAGEZ, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated *Trypanosoma congolense* parasite killing. **Journal of Infection Disease**, Amsterdam, v. 196, n., p.954-962, 2007.
- MAHAM, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Krause: Alimentos, **Nutrição & Dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Editora Roca. 1998.
- MARKS, J. A Guide to the Vitamins: **Their role in Health and Disease MTP, Medical and Tech. Publishing Co. Ltd.** England. (1979).

MARSDEN, V.S.; STRASSER, A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 21, n. 6, p. 71-105, Dez. 2003.

MASIGA, D. K. et al. Sensitive detection of trypanosomes in tse-tse flies by DNA amplification. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 22, n. 7, p. 909-918, Nov. 1992.

MCDOWELL, L. R. **Vitamin in Animal Nutrition**; Academic Press, Inc. 1989.

MIJARES, A. et al. *Trypanosoma evansi*: Effect of experimental infection on the osmotic fragility, lipid peroxidation and calcium-ATPase activity of rat red blood cells. **Experimental Parasitology**, New York, v. 124, n. 3, p. 301-305, Mar. 2009.

MILNER, R.J., et al. The effect of diminazene aceturate on cholinesterase activity in dogs with canine babesiosis. **Journal of South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 68, n. 4, p. 111-113, Dez. 1997.

MORALES, I. et al. Ocular lesions associated with *Trypanosoma evansi* in experimentally infected goats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 3-4, p. 325-329, Nov. 2006.

MOREIRA, R. D.; MACHADO, R. Z. Identificação e isolamento do *Trypanosoma equinum* em um cão do município de Camapuã-MS. In: **Encontro de Pesquisas Veterinárias**, 10, 1985, Jaboticabal. Resumos, p. 66.

MOSER, D. R. et al. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Parasitology**, Cambridge v. 99, n. 1, p. 57-66, Ago. 1989.

MURALEEDHARAN, K.; SRINIVAS, P.M.A. Report on the observation of *Trypanosoma evansi* in the aborted foetus of a cow. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 62, p. 16-18, Jan. 1985.

MUSA, M. M. et al. Efficacy of Cymelarsan in the treatment of natural chronic *Trypanosoma evansi* infection in camels in the Sudan. **Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v. 47, n. 4, p. 397-400, Nov. 1994.

NGAIRA, J. M. et al. Evaluation of antigen and antibody rapid detection tests for *Trypanosoma evansi* infection in camels in Kenya. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 131-141, Mai. 2003.

NGAIRA, J. M. et al. The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 110, n. 1, p. 30–38, Mai. 2005.

NJIRU, Z. K. et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/T. *evansi* tests in Kenya. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 124, n. 3-4, p. 187-199, Out. 2004.

NORDBERGER, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, Dez. 2001.

OGWU, D. NURU, S. Transplacental transmission of trypanosomes in animals and man: a review. **Veterinary Bulletin**, Wallingford, v. 51, p. 381-384, 1981.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 95, n. 2, p. 351-358, Jun. 1979.

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

PAIM, F.C. et al. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 128, n. 4, p. 365-370, Ago. 2011.

PAPP, L. V. et al. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**, New York, v. 9, n. 7, p. 775-806, Jul. 2007.

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

PAYNE, R.C. et al. Efficacy of Cymelarsan in Friesian Holstein calves infected with *Trypanosoma evansi*. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 26, n. 4, p. 219-226, 1994.

PAYS, E. et al. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 7, p. 369-374, Ago. 2004.

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

PEREGRINE, A. S. Chemotherapy and Delivery Systems: Haemoparasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 54, n. 1-3, p. 223-248, Ago. 1994.

PHOLPARK, S. et al. Influence of *Trypanosoma evansi* infection on milk yield of dairy cattle in northeast Thailand. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 39-44, Set.1999.

PORTUGAL, J. Berenil acts as a poison of eukaryotic topoisomerase II. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 344, n. 2-3, p.136-138, Mai. 1994.

RAINA, A. K. et al. Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p.67-69, Jun. 1985.

RAMIREZ, L. E. et al. **La tripanosomiasis in los animales domesticos em Colombia**. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1979. 89p.

RAYNAUD, J.P. et al. A review of Cymelarsan - a new treatment proposed for animal trypanosomiasis due to *T. evansi* and other trypanosomes of the *T. brucei* group. **ISCTRC**, 20th Meeting, Mombasa, Kenya, Pub. No. 115. 1989.

REDDY, B.S.; SONDHI, S.M.; LOWN, J.W. Synthetic DNA minor groove-binding drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 84, n. 1, p.100-111, Out. 1999.

REID, S. A.; COPEMAN, D. B. Surveys in Papua New Guinea to detect the presence of *Trypanosoma evansi* infection. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 78, n. 12, p. 843-845, Dez. 2000.

REID, S. A et al. Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, n. 4, p. 291-297, Dez. 2001.

REILLY, C. Selenium in food and health. London: Blackie Academic and Professional, 1995. 338 p.

REINERT, K.E. DNA multimode interaction with berenil and pentamidine; double helix stiffening, unbending and bending. **Journal of Biomolecule Structure and Dynamics**, New York, v. 17, n. 2, p. 311-331, Out.1999.

RIEGEL, R.E. Radicais livres. **In:** Bioquímica. 3.ed. São Leopoldo: Unisinos, p. 507-536, 2002.

RODRIGUES, A. et al. Outbreaks of trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 239-249, Dez. 2005.

SANTOS, A. S. et al. Origin of the Pantaneiro horse in Brazil. **Archives of Zootechnia**, Córdoba, v. 41, n. 154, p. 371-381, Set.1992.

SARMAH, P.C. Transplacental transmission of *Trypanosoma evansi* in mice. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 68, n. 4, p. 344-345, Abr.1998.

SCHANAIDER, A. Radicais livres: vilões ainda em estudo. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 27, n. 158, p. 60-62, Mar. 2000.

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

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SEIDL, A. et al. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, n. 33, n. 1-4, p. 219-234, Jan. 1998.

SEN, G. C. Viruses and Interferons. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 255-281, Out. 2001.

SHEHU, S. A. et al. Role of erythrocyte surface sialic acid in inducing anaemia in Savannah Brown bucks experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinarski Arhiv**, Heinzelova, v. 76, n. 6, p. 521-530, Dez. 2006.

SHEPPARD, A. J.; PENNINGTON, J. A. T.; WEIHRAUCH J. L. Vitamin E in health and disease; Packer, L.; Fuchs, J., eds.; Marcel Dekker: New York, 1992, cap. 1.

SILVA, R. A. M. S. et al. Trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil: a preliminary approach on risk factors. **Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v. 4, n. 3, p. 315-319, Set. 1995.

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

SRIDHAR, R.; LAKSHMINARAYANA, G. Lipid classes, fatty acids, and tocopherols of leaves of six edible plant species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 1, p. 61-63, Jan. 1993

SUMBA, A. L. et al. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 417-422, Out. 1998.

THOMPSON, J. N.; M. L. SCOTT. Metabolic studies of [<sup>75</sup>Se]selenomethionine and [<sup>75</sup>Se]selenite in the ducks. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 100, p. 797, 1970.

TIWARY, A. K. et al. Comparative toxicosis of sodium selenite and selenomethionine in lambs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 18, n. 1, p. 61-70, Jan. 2006.

TUNTASUVAN, D. et al. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam n, v. 73, n. 4, p. 357-363, Abr. 1997.

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

TUNTASUVAN, D. et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by immunohistochemistry. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 87, n. 3, p. 223-230, Mar. 2000.

UCHE, U. E.; JONES, T. W. Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 106, n. 3, p. 299-309, Abr. 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 domestic and wild mammals. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 6, p. 1289-1298, Jun. 2000.

YANG, G. Q. et al. Endemic selenium intoxication of humans in China. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v. 37, n. 5, p. 872-881, Mai. 1983.

YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 99-111, Mar. 2003.

WERNERY, U. et al. Preliminary Evaluation of Diagnostic Tests Using Horses Experimentally Infected with *Trypanosoma evansi*. **The Veterinary Journal**, London, v. 161, n. 3, p. 287-300, Mai. 2001.

WHO. **Environmental Health Criteria 58: Selenium** Ginebra 1987.

WITOLA, W. H. RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in *Trypanosoma evansi* confers resistance to diminazene aceturate. **Experimental Parasitology**, New York, v. 107, n. 1-2, p. 47-57, Mai. 2004.

WOLKMER, P. et al. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 41-46, Out. 2009.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Acta Tropica**, Basel, v. 27, p. 384-386, 1970.

ZELEKE, M.; BEKELE, T. Effect of season on the productivity of camels (*Camelus dromedaries*) and the prevalence of their major parasites in eastern Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 33, n. 4, p. 321-329, Jul. 2001.

ZHANG, Z. Q. et al. *In vivo* and *in vitro* sensitivity of *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* to diminazene, suramin MeCy, quinapyramine and isomethamidium. **Acta Tropica**, Basel, v. 50, v. 2, p. 101-110, Jan. 1992.

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

## **ANEXO**



# ANEXO A – Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of *Trypanosoma evansi* infection in rats. experimental parasitology. 2011 jul;128(3):243-9.

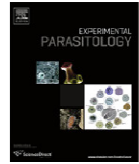
Experimental Parasitology 128 (2011) 243–249



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)



## Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of *Trypanosoma evansi* infection in rats

Alexandre A. Tonin<sup>a,\*</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>a</sup>, Marcio M. Costa<sup>a</sup>, Mateus A. Otto<sup>a</sup>, Gustavo R. Thomé<sup>a</sup>, Kaio S. Tavares<sup>b</sup>, Luiz C. Miletti<sup>b</sup>, Marta R. Leal<sup>a</sup>, Sonia T.A. Lopes<sup>a</sup>, Cinthia M. Mazzanti<sup>a</sup>, Silvia G. Monteiro<sup>a</sup>, Mario L. de La Rue<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup> Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 November 2010

Received in revised form 2 March 2011

Accepted 15 March 2011

Available online 21 March 2011

#### Keywords:

*Trypanosoma evansi*  
Diminazene aceturate  
Sodium selenite  
Vitamin E  
Rodents

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the utilization of a standard treatment with diminazene aceturate against the infection caused by *Trypanosoma evansi*, associated to sodium selenite and vitamin E. *In vitro* tests showed trypanocidal effect related to the treatment with diminazene aceturate and sodium selenite, but vitamin E had no harmful effect on the trypanosomes. *In vivo* experiments utilized a total of 72 adult outbred females rats, separated into 9 groups (A, B, C, D, E, F, G, H and I), 8 animals each. Group A was the uninfected group; groups B to I were infected with 0.2 mL of blood containing  $10^6$  trypanosomes. Parasitemia was estimated daily by microscopic examination of blood smears. Group B served as positive control; group C was treated with diminazene aceturate; group D with sodium selenite; group E with vitamin E; group F received an association of diminazene aceturate and sodium selenite; group G received an association of diminazene aceturate and vitamin E; group H received an association of diminazene aceturate, sodium selenite and vitamin E, and group I received an association of sodium selenite and vitamin E. Diminazene aceturate was administrated in a single dose on the 3rd day post infection (PI). Sodium selenite and vitamin E were administered at the 3rd and 23rd day PI. *In vivo* tests showed increase of longevity in groups treated with diminazene aceturate associated with sodium selenite (groups F and H). No difference was found between groups C and E, thus the vitamin E did not increase the efficacy of treatment against *T. evansi* when associated to diminazene aceturate. The curative efficacy of treatments was 37.5, 87.7, 37.7 and 75% to the groups C, F, G and H, respectively. Other treatments showed no efficacy. The sodium selenite when combined with chemotherapy may represent an alternative in the treatment of trypanosomosis.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Trypanosoma evansi* is a digenetic flagellate implicated in the infection of a large number of domestic and wild animals, such as equines, canines, felines, rabbits, capybaras, ring-tailed coatis, bovines, buffaloes, armadillos and humans (Dávila and Silva, 2000; Herrera et al., 2004; Tarello, 2005; Joshi et al., 2005; Da Silva et al., 2008a). This protozoan is the agent of trypanosomosis, a disease with broad distribution in Africa, Asia, and Latin America (Lun and Desser, 1995). The trypomastigotes present in blood vessels of vertebrate hosts are transmitted by blood-sucking insects during feeding. The insect vectors are most commonly tabanidae species (*Tabanus* sp., *Chrysops* sp. and *Hematopota* sp.) (Hoare, 1972).

Treatment of trypanosomosis relies on the use of diminazene aceturate which is effective for treatment in cattle, buffalo, sheep, pigs and camels (Peregrine and Mamman, 1993; Sirivan et al., 1994). However, single dose are not effective for horses, mules and dogs (Tuntasuvan et al., 2003; Colpo et al., 2005). Da Silva et al. (2008b) did not found a complete control of the infection using a single dose, resulting in recurrence of parasites. Thus, it is important to investigate alternatives to improve the success of treatment using new drugs, drugs associations and other components that could increase the curative efficacy. In this sense there is a growing interest in the utilization of antioxidants in the prevention and treatment of this disease.

Sodium selenite is a common dietary form of selenium, recognized as an essential nutrient for animal and human nutrition (Combs and Gray, 1998; Combs, 1999). In the form of the amino acid selenocysteine, it is a component of a number of antioxidant enzymes, e.g., glutathione peroxidase and thioredoxin reductase (Arner and Holmgren, 2000; Brigelius-Flohe et al., 2000). Among

\* Corresponding author. Address: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 20, Sala 4235, Santa Maria CEP 97105-970, RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8885.

E-mail address: [tonin\\_alexandre@yahoo.com.br](mailto:tonin_alexandre@yahoo.com.br) (A.A. Tonin).

the functions of the immune system are the induction of apoptosis and the production of reactive oxygen species (ROS) (Forman and Torres, 2001; Marsden and Strasser, 2003). Vitamin E (VE) ( $\alpha$ -tocopherol) is a naturally occurring antioxidant nutrient that plays an important role in animal health by inactivating harmful free radicals that are produced through normal cellular activity and from various stressors. The antioxidant function of this micro-nutrient could, at least in part, enhance immunity by maintaining the functional and structural integrity of important immune cells (Arita et al., 1998; Chinoy and Memon, 2001; Yousef et al., 2003; El-Demerdash et al., 2004).

Lipid peroxidation in the erythrocyte membrane has been identified as an important factor in the pathogenesis of anemia in parasitic infections, as seen in rats with acute trypanosomiasis induced by *T. brucei* and *T. evansi* (Igbokwe et al., 1994; Wolkmer et al., 2009). Additionally, it has been reported that infection with *T. evansi* in rats can cause oxidative stress and induce antioxidant enzyme production (Omer et al., 2007). Due the antioxidant role of some compounds, the objective of this study was to evaluate the utilization of a standard treatment with diminazene aceturate against the infection caused by *T. evansi*, associated with sodium selenite and vitamin E *in vitro* and *in vivo*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Compounds

Diminazene aceturate tested is a commercial product (Ganasceg® 7% – Novartis). Sodium selenite was acquired from Merck Brazil in powder and diluted in physiologic solution (0.9%) resulting in a final concentration of 1.67%. Vitamin E utilized is a commercial product (Monovin E® 10% – Bravet).

### 2.2. *T. evansi* isolated

*T. evansi* was originally isolated from a dog naturally infected (Colpo et al., 2005). Initially, two rats (rat 1 and rat 2) were infected intraperitoneally with blood (cryopreserved in liquid nitrogen) containing  $10^6$  parasites/animal. This procedure was performed to obtain a large amount parasites for posterior tests *in vitro* and *in vivo*.

### 2.3. *In vitro* tests

When rat 1 showed high parasitemia (85 trypanosomes per microscopic field at a magnification of 1000 $\times$ ), it was anesthetized with isoflurane inside an anesthetic chamber to further collect the blood sample. Blood was diluted in PBS-glucose (1:1 v/v) and distributed in tubes (1 mL containing  $1.92 \times 10^7$  parasites per  $\mu$ l) to carry on *in vitro* tests (Da Silva et al., 2009). Treatments using diminazene aceturate, sodium selenite and vitamin E were performed and compared to the control group (untreated). All tests were carried out in triplicate at concentrations of 0.25, 1.0 and 4 mg mL<sup>-1</sup> for each compound. After 1, 3, 6 and 24 h post-treatment, quantifications of alive trypanosomes were made in Neubauer chamber as described by Da Silva et al. (2009).

### 2.4. Experimental animals

A total of 72 adult outbreed females Wistar rats (mean age of 60 days) weighing  $\sim 206 \pm 17$  g were kept in cages (8 animals each), in room with controlled temperature and humidity (25 °C; 70%), fed with commercial ration and water *ad libitum*. All animals were submitted to 15 days of adaptation previously to the experi-

ment. Procedure was approved by the Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), No. 14/2010.

### 2.5. Groups and Trypanosoma infection

Rats were separated into 9 groups (A, B, C, D, E, F, G, H and I), 8 animals each. Group A served as uninfected group (negative control). Groups B to I were infected intraperitoneally with 0.2 mL of blood (rat 2) containing  $10^6$  trypanosomes. Parasitemia was estimated daily by microscopic examination of blood smears. Each slide was mounted with blood collected from the tail vein, stained by the panoptic method, and visualized at a magnification of 1000 $\times$ .

### 2.6. Experimental delineation

Group A was composed by healthy animals, while group B was composed by untreated animals (positive control). Diminazene aceturate was administrated in a single dose on the 3rd day post-infection (PI). Sodium selenite and vitamin E were administered at the 3rd and 23rd day PI, with 20 days of interval between administrations. On the 3rd day PI rats were treated following the protocol detailed hereafter. Group C were treated with diminazene aceturate (7 mg kg<sup>-1</sup> intramuscular – IM); group D treated with sodium selenite (1 mg kg<sup>-1</sup> subcutaneous – SC); group E was treated with vitamin E (2000 UI – IM); group F received an association of diminazene aceturate (7 mg kg<sup>-1</sup> – IM) with sodium selenite (1 mg kg<sup>-1</sup> – SC); group G received an association of diminazene aceturate (7 mg kg<sup>-1</sup> – IM) with vitamin E (2000 UI – IM); group H was treated with an association of diminazene aceturate (7 mg kg<sup>-1</sup> – IM), sodium selenite (1 mg kg<sup>-1</sup> – SC) and vitamin E (2000 UI – IM); group I received an association of sodium selenite (1 mg kg<sup>-1</sup> – SC) with vitamin E (2000 UI – IM). On the 23rd day PI rats of group F treated only with sodium selenite (1 mg kg<sup>-1</sup> – SC); group G received only vitamin E (2000 UI – IM); and rodents of group H was treated with an association of sodium selenite (1 mg kg<sup>-1</sup> – SC) and vitamin E (2000 UI – IM). Animals of groups D, E and I did not receive antioxidant treatment since they died before the 23 day PI.

### 2.7. Sample collection

After 30 days of infection all survivor rats were anesthetized with isoflurane inside an anesthetic chamber to perform collection of blood samples (1.5 mL by intracardiac puncture). Approximately 10 min after the procedure all animals showed signs of recovery. A volume of 0.5 mL was used to carry out hematocrit and leucogram, and 1 mL was used to obtain serum to the measurement of TBARS levels. On the 60th day PI, all the survivor rats were anesthetized following the same procedures prior cited, and then, decapitated as recommended by the Ethics Committee. From the blood samples were evaluated hematocrit, leucogram and levels of TBARS, exactly the same procedure carried on 30th day PI. Whole brain was removed and placed into tubes filled with ethanol (70%) for conservation and further achievement of specific *T. evansi* polymerase chain reaction (PCR), in an attempt to verify the curative efficacy of the tested protocols.

### 2.8. Hematologic parameters

Hematocrit was measured using the standard microhematocrit method (Centimicro mod. 1-15-Sigma, Germany) according to Schalm et al. (1975). Total leukocytes count was determined using an electronic counter (Vet Auto Hematology Analyzer®, model BC 2800). Blood smears were stained with the panoptic method to perform differential leukocyte counting.

### 2.9. Lipid peroxidation

Serum lipid peroxidation was determined by measurement of TBARS level, according to Jentzsch et al. (1996). Results were obtained by spectrophotometry at 535 nm and then expressed in nanomoles of malondialdehyde per milliliter of serum.

### 2.10. Polymerase chain reaction (PCR)

Genomic DNA of brains was extracted using phenol-chloroform method (Sambrook et al., 1989) and submitted to agarose gel electrophoresis (1%) for determination of quality and quantity of samples. PCR was carried out with specific primers to *T. evansi* (Ventura et al., 2002). Te664a (5' AAA CCC GTC CTC TTG GAG G 3') and Te664b (5' ATC CAT CTA AGA GTT GT 3') in a concentration of 1  $\mu$ M each, 1.5 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 1 $\times$ , 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M each dNTP and 1  $\mu$ l of DNA. Reactions were submitted to initial denaturation at 95 °C during 3 min, followed by 35 cycles composed of 3 steps: 95 °C (1 min), 56 °C (1 min) and 72 °C during 1 min. Finally, it was achieved a final extension (72 °C/1 min). Amplified samples were analyzed by agarose gel electrophoresis at 80 V in one hour, stained with ethidium bromide and photographed in UV light. Purified DNA of *T. evansi* by DEAE-Cellulose chromatography was used as the positive control, and as the negative control it was used sterile ultra-pure water.

### 2.11. Statistic analysis

Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test to compare the means and date precision.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference among the analyses.

## 3. Results

### 3.1. In vitro tests

*In vitro* tests showed trypanocidal effect associated to the treatment with diminazene aceturate and sodium selenite against *T. evansi*, once it was obtained a significant reduction ( $P < 0.001$ ) of parasites number when compared to the control group and the group treated with vitamin E (Fig. 1). Reduction of flagellates was proportional to the concentration in both treatments (diminazene aceturate and sodium selenite). Tests with diminazene aceturate showed reduction of protozoa number in concentrations of 1 and 4 mg mL<sup>-1</sup> when compared to the control group 1 h after treatment (Fig. 1A), as well as to the sodium selenite tests in concentrations of 4 mg mL<sup>-1</sup> (Fig. 1B). After 6 h, in acetate tests were not found alive parasites for the three concentrations (Fig. 1A). Sodium selenite tests showed no trypanosomes alive after 6 h, but only at 1.0 and 4.0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (Fig. 1B). It was not observed differences between tests on vitamin E and control group (Fig. 1C). After 24 h of *in vitro* tests, it was even possible to observe alive parasites in the control group.

### 3.2. In vivo tests

The prepatency period in *T. evansi* infected groups ranged from 1 to 1.4 days (Table 1). Therefore, all rodents were positives when the treatment was started. Rats from groups B, D, E and I showed an increasing parasitemia over time and longevity of 5.1, 7.6, 6.5 and 6.2 PI, respectively. Rodents from groups A, C, F, G and H showed longevity of 60, 53.3, 60, 47.8 and 60 days PI, respectively (Table 1). It was observed that the animals which were submitted

to the association of diminazene aceturate and sodium selenite survived at least until the 60th day, as well as the negative control. Trypomastigotes were not observed in the blood smears of rats from groups F and H after treatments. Groups C (2 rats) and G (3) showed increased parasitemia and death during the experimental period (Table 1).

### 3.3. Hematological parameters

Hematological parameters were evaluated only in groups A, C, F, G and H, since the animals of the other infected groups died a few days PI (Table 1). With 30 days of experiment were not observed differences between groups in hematocrit, lymphocytes, (Fig. 2) total leucocytes, neutrophils, monocytes and eosinophils (data not shown). Nevertheless, at 60 days PI it was verified a significant hematocrit reduction ( $P < 0.05$ ) in group C and G, as compared to negative control group (Fig. 2A). Leucogram showed a significant decrease ( $P < 0.05$ ) of the leucocytes number in the group C (4466  $\pm$  1612) when compared to group A (8122  $\pm$  3232), as well as lymphocytes number (Fig. 2B). Significant increase of total leukocyte number occurred in group G (11,680  $\pm$  2364) when compared to group A (8122  $\pm$  3232) and could be explained due an increase in the number of circulating lymphocytes (Fig. 2B).

### 3.4. Levels of TBARS in serum

As well as to the hematological parameters, levels of TBARS were evaluated only in groups A, C, F, G and H. The evaluation carried out on day 30 PI did not show differences among groups (Fig. 3). However, after 60 days PI in groups treated with diminazene aceturate and antioxidants (Groups F, G and H) it was observed a decrease ( $P < 0.05$ ) of TBARS levels in serum, when compared to groups A and C (Fig. 3).

### 3.5. Parasitological and molecular diagnostic

It was observed after 60 days PI, by blood smear and PCR, that group C presented three animals *T. evansi* positive; F one positive, G two positive and group H two positive animals (Table 1). Therapeutic efficacy was calculated by the number of alive and negative for *T. evansi* front parasitological and molecular techniques at the end of experiment. Therefore, curative efficacy of treatments was 37.5%, 87.7%, 37.7% and 75% to groups C, F, G and H, respectively. PCR was negative to all rodents in group A and positive to all animals in group B (Table 1).

## 4. Discussion

*In vitro* tests showed trypanocidal effects associated to the treatment with diminazene aceturate and sodium selenite against *T. evansi*. Not much is known about the mechanism(s) of sodium selenite toxicity. However, at elevated concentrations, selenium is also extremely toxic and there is mounting evidence that its toxicity in both prokaryotes and eukaryotes relates to its prooxidant capacity (Spallholz, 1994). For example, in the reduction of selenium by reduced glutathione and other thiols, superoxide (and, in some cases, hydrogen peroxide) can be generated (Seko et al., 1989; Ip et al., 1991; Spallholz, 1994). Thus, toxicity is thought to become manifested when the prooxidant conditions exceed cellular antioxidant defenses (Spallholz, 1994) and this might explain a possible mechanism of toxicity doses-dependent against *T. evansi in vitro*.

The *in vitro* tests showed a reduction in the trypanosomes number and a trypanocidal effect was supposed. However, all animals from groups which received a single treatment with sodium selenite or vitamin E died. Therefore, this effect was rejected and based

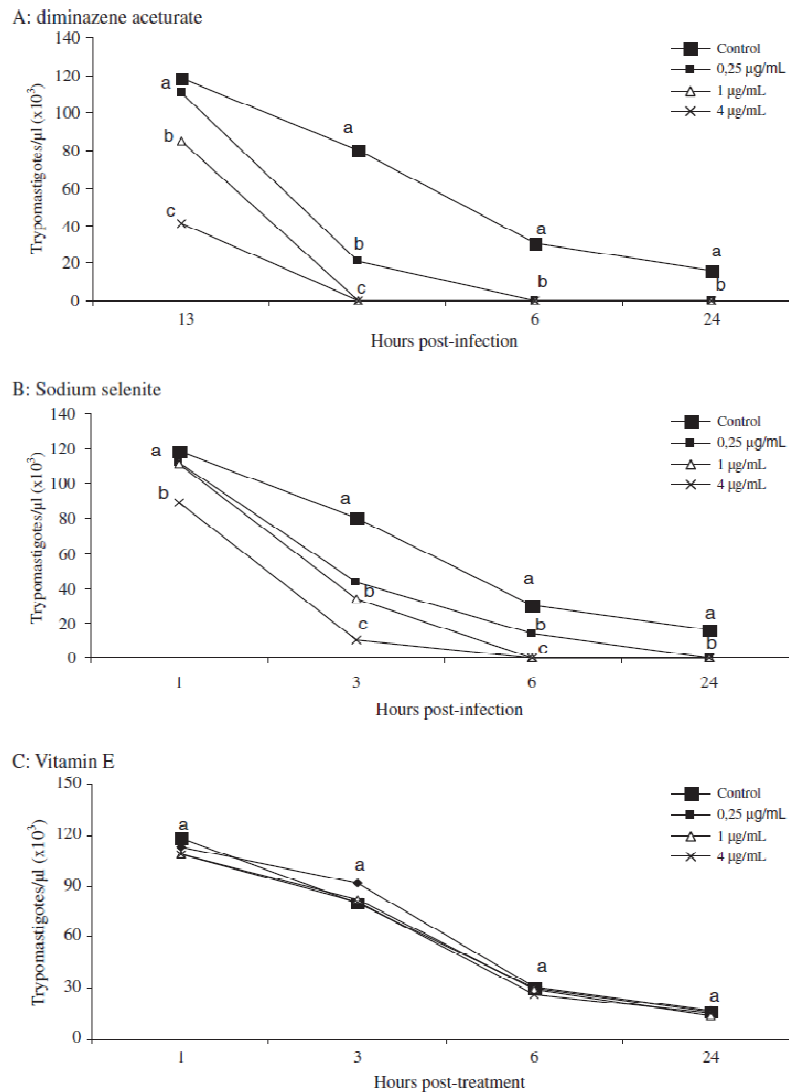


Fig. 1. Dose-response effect of diminazene aceturate (A), sodium selenite (B) and vitamin E (C) on the viability of *Trypanosoma evansi* *in vitro* compared to the control. Bars represent means in each treatment. Groups with different letters (60 days post-infection) are statistically different among themselves at 5% probability by Tukey test.

Table 1

Mean and standard deviation of the pre-patent period, longevity, mortality and success of therapy using treatment with diminazene of aceturate, sodium selenite and vitamin E in rats experimentally infected with *T. evansi*.

| Groups                        | Prepatency period (Day)  | Longevity (Day)           | Mortality (n) | Positive (n) | #Therapeutic success (%) |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|
| A – Negative control          | –                        | 60.0 <sup>a</sup> (±0.0)  | 0/8           | 0/8          | –                        |
| B – Positive control          | 1.1 <sup>a</sup> (±0.21) | 5.1 <sup>b</sup> (±0.45)  | 8/8           | –            | –                        |
| C – Diminazene aceturate (DA) | 1.0 <sup>a</sup> (±0.32) | 53.3 <sup>a</sup> (±9.17) | 2/8           | 3/6          | 37.5                     |
| D – Sodium selenite (SS)      | 1.3 <sup>a</sup> (±0.41) | 7.6 <sup>b</sup> (±3.51)  | 8/8           | –            | 0.0                      |
| E – Vitamin E (VE)            | 1.4 <sup>a</sup> (±0.53) | 6.5 <sup>b</sup> (±2.33)  | 8/8           | –            | 0.0                      |
| F – Association: DA + SS      | 1.3 <sup>a</sup> (±0.38) | 60.0 <sup>a</sup> (±0.0)  | 0/8           | 1/8          | 87.5                     |
| G – Association: DA + VE      | 1.1 <sup>a</sup> (±0.33) | 47.8 <sup>a</sup> (±13.4) | 3/8           | 2/5          | 37.5                     |
| H – Association: DA + SS + VE | 1.2 <sup>a</sup> (±0.23) | 60.0 <sup>a</sup> (±0.0)  | 0/8           | 2/8          | 75.0                     |
| I – Association: SS + VE      | 1.4 <sup>a</sup> (±0.31) | 6.2 <sup>b</sup> (±1.6)   | 8/8           | –            | 0.0                      |

Note: Means followed by the same letters in the same column do not differ significantly in Tukey test.

\* Rats dead during the study.

# Animals with blood smear and PCR positive for *T. evansi* in day 60 of experiment; dead animals were excluded.

# Animals cured in the end of experiment, presented PCR and blood smear negative.

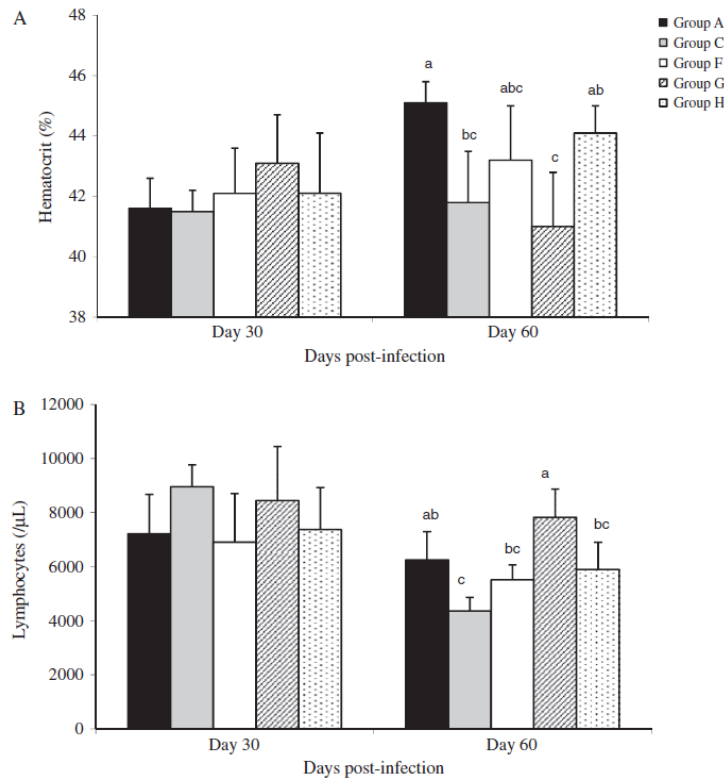


Fig. 2. Mean and standard deviation of hematocrit (A) and lymphocytes (B) from animals subjected to the infection by *T. evansi* and treatment with diminazene aceturate sodium selenite, vitamin E and association between these drugs. Difference ( $P < 0.01$ ) between groups (identified by different letters) were observed only on day 60 post-infection.

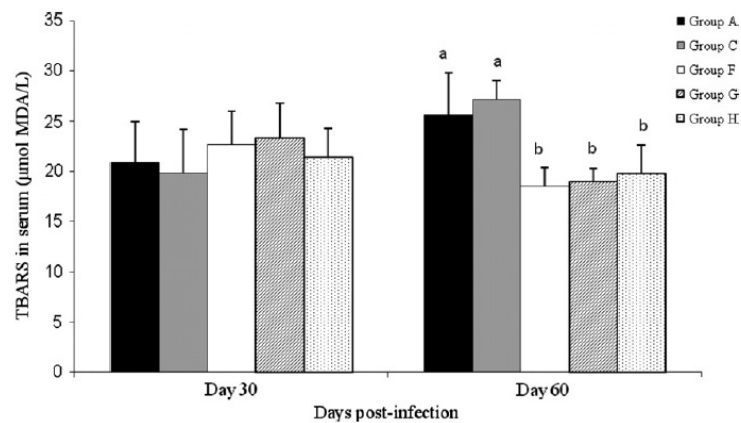


Fig. 3. Mean and standard deviation (SEM) of lipid peroxidation (TBARS) of *T. evansi*-infected and treated rats compared to the controls at different periods post-inoculation. Bars represent means  $\pm$  SEM. Groups with different letters (60 days post-infection) are statistically different among themselves at 5% probability by Tukey test.

on associations of treatments and results obtained *in vivo* a protective effect has been considered, since these tests demonstrated an increased longevity to the groups C, F, G and H. Increased longevity might be related to this protective effect through immune protection and selenium influences on both the innate, “nonadaptive” and the acquired, “adaptive” immune systems (Spallholz, 1990; Turner and Finch, 1991; Kiremidjian-Schumacher and Roy, 1998; McKenzie et al., 2001). The innate immune system includes barri-

ers to infection and nonspecific effectors cells such as macrophages. Both the T and B lymphocytes form the major effectors cells of the acquired system that mature with exposure to immune challenges. Selenium-deficient lymphocytes are less able to proliferate in response to mitogen, and in macrophages, leukotriene B4 synthesis, which is essential for neutrophil chemotaxis, is impaired by this deficiency (Arthur et al., 2003). Humoral system is also affected by selenium deficiency; for example, IgM, IgG and IgA titers

are decreased in rats deficient of selenium (Arthur et al., 2003). Vitamin E deficiencies have been implicated in some pathologic conditions, such as cancer, coronary heart disease, and liver necrosis (Keane et al., 1999; Ricciarelli et al., 2000) and are also accompanied by a loss of immunocompetence (Meydani and Beherka, 1998). There is also a complementary function carried out by vitamin E when sodium selenite became deficient (which results in a decrease in the capacity to reduce lipid hydroperoxides) suppressing the formation of lipid hydroperoxides, preventing lipid peroxidation (Saito et al., 2003). It is known that selenium and vitamin E show compensative effects and that a deficiency of both elements causes massive injury in some cases (Navarro et al., 1998; Beck et al., 2003). It was observed that all groups which received antioxidant components in the treatment did not show statistical difference when compared to negative control group, demonstrating the general maintenance of health status and, also, did not show recurrence of parasitemia after antioxidants treatment (groups F and H).

With 30 days of experiment were not observed differences among the groups in hematocrit, total leucocytes, neutrophils, lymphocytes number, monocytes and eosinophils (data not-shown), however it was found a significant hematocrit reduction in groups C and G at 60 days PI (Fig. 2A), which strengthens the importance and role of sodium selenite protection in trypanosome infection, since in these groups there was no utilization or treatment with this component. Anemia is often described and it is characterized by decreased values of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit. However, its causes are not completely understood (Silva et al., 1995; Marques et al., 2000; Aquino et al., 2002). The proposed mechanisms are erythrophagocytosis, destruction of the erythrocytes by the immune system, erythrocyte osmotic fragility, hemodilution and erythropoietic depression (Jenkins and Facer, 1985; Aquino et al., 2002). It is believed that antioxidant treatment might prevent the erythrocyte destruction, since selenocysteine in its amino acid form is a component of antioxidant enzymes, for example glutathione peroxidase and thioredoxin reductase (Arner and Holmgren, 2000; Brigelius-Flohe et al., 2000) and thus, increase the resistance against *T. evansi* infection. Animals which received treatment with vitamin E had an increase of the total leucocytes number, mainly due to the increase of lymphocytes. This event may be explained since lower concentrations of vitamin E are related to destabilization of immune cells, generating a reduction of immune system activity and decreased production of immunoglobulin and interleukin 2 (Fernández et al., 2002), therefore decreasing the number of cells as well as its activity. In other hand, vitamin E supplementation improves, for example, some aspects of the age-related decline in immune function in laboratory animals, since increasing the amount of vitamin E in the diet of old mice from 30 to 500 ppm significantly increases delayed-type hypersensitivity (DTH) response, lymphocyte proliferation in response to mitogen, and production of IL-2, enhancing the immunity (Meydani et al., 1986). However, this increase of circulating lymphocytes stimulated by vitamin E was not sufficient for the control of infection when vitamin E was associated with diminazene aceturate, differently of sodium selenite which did not change leucogram, but when associated with diminazene aceturate showed great curative efficacy on the treatment of trypanosomiasis.

It is possible to establish a correlation between hematocrit reduction and TBARS levels. TBARS levels also did not present alterations on day 30 PI, but on day 60 PI, in the groups treated with diminazene aceturate and antioxidants (F, G and H). It was observed a decrease ( $P < 0.05$ ) of TBARS levels in serum when compared to groups A and C which did not receive antioxidant treatment. This might represent an antioxidant protection against *T. evansi*, since it was observed hematological reduction in the same group that had the TBARS levels increased. Vitamin E showed

good results on antioxidant protection helping to keep the TBARS levels low due the suppression of lipid hydroperoxides formation, preventing lipid peroxidation (Saito et al., 2003), but to the hematological parameters vitamin E did not show the same efficiency or protection, since group G presented hematocrit reduction. PCR was carried out at the 60 PI aiming confirm the success of therapy. It was confirmed representative of curative efficacy related to antioxidant treatment associated with drug therapy, especially to sodium selenite. Groups that received sodium selenite as complementary component in the treatment showed higher curative efficacy compared to the groups that did not receive. Infection by *T. evansi* in rats induces oxidative stress with increase of antioxidant enzymes, such as catalase and superoxide dismutase (Omer et al., 2007), later our research group associated it with anemia in rats infected with *T. evansi* (Wolkmer et al., 2009). Thus, our results shown that treatment with antioxidants reduce the lipidic peroxidation and consequently keep hematological parameters normal.

Based on our results, we conclude that antioxidant treatment associated with drug therapy increase the longevity, prevent hematocrit reduction, increase the leucocytes and lymphocytes number and reduce lipid peroxidation. These results obtained might be associated to protective effects offered by sodium selenite, increasing the success of treatment when in association with diminazene aceturate and also reducing the parasitemia recurrence front to the treatment. Vitamin E did not show the same protective and trypanocidal effects observed in the treatment with sodium selenite, but showed satisfactory results when reducing TBARS levels in serum and, thus, acting as an immune system stimulant.

## References

- Aquino, L.P.C.T., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Santana, A.E., Castro, M.B., Marques, L.C., Malheiros, E.B., 2002. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 54, 8–18.
- Arner, E.S., Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267, 6102–6109.
- Arita, M., Sato, Y., Arai, H., Inoue, K., 1998. Binding of alphatocopherylquinone, an oxidized form of alpha-tocopherol, to glutathione S-transferase in the liver cytosol. *FEBS Letters* 436, 424–426.
- Arthur, J.R., McKenzie, R.C., Beckett, G.J., 2003. Selenium in the Immune System. *The Journal of Nutrition* 133, 1457S–1459S.
- Beck, M.A., Williams-Toone, D., Levander, O.A., 2003. Coxsackievirus B3-resistant mice become susceptible in Se/Vitamin E. *Free Radical Biology and Medicine* 54, 1263–1270.
- Brigelius-Flohe, R., Maurer, S., Lotzer, K., Bol, G., Kallionpää, H., Lehtolainen, P., Viita, H., Vla-Herttua, S., 2000. Overexpression of PHGPx inhibits hydroperoxide-induced oxidation, NF $\kappa$ B activation and apoptosis and affects oxLDL-mediated proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 152, 307–316.
- Chinoy, N.J., Memon, M.R., 2001. Beneficial effects of some vitamins and calcium on fluoride and aluminium toxicity on gastrocnemius muscle and liver of male mice. *Fluoride* 34, 21–33.
- Colpo, C.B., Monteiro, S.G., Stainki, D.R., 2005. Natural infection by *Trypanosoma evansi* in dogs. *Ciência Rural* 35, 717–719.
- Combs Jr., G.F., 1999. Chemopreventive mechanisms of selenium. *Medizinische Klinik* 94, 18–24.
- Combs Jr., G.F., Gray, W.P., 1998. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacology & Therapeutics* 79, 179–192.
- Da Silva, A.S., Costa, M.M., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2008a. Alterações hematológicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi*. *Ciência Rural* 38, 538–542.
- Da Silva, A.S., Tochetto, C., Zanette, R.A., Pierezan, F., Rissi, D.R., Santurio, J.M., Monteiro, S.G., 2008b. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. *Ciência Rural* 38, 1357–1362.
- Da Silva, A.S., Botton, J., Wolkmer, P., Zanette, R.A., Lopes, S.T.L., Anjos, D.L., Alves, S.H., Monteiro, S.G., 2009. *Trypanosoma evansi* susceptibility to amphotericin B. *Ciência Rural* 39, 2550–2555.
- Dávila, A.M.R., Silva, R.A.M.S., 2000. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 199–212.
- El-Deimerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S., Baghdadi, H.H., 2004. Role of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in

- oxidative stress, hemato-biochemical parameters, and semen quality of male rats. *Journal of Environmental Science and Health* 39, 443–459.
- Fernandéz, C.F., Febles, C.S., Bernabeu, A.S., Triana, B.E.G., 2002. Funciones de la vitamina E. Actualización. *Revista Cubana de Estomatología* 40, 28–32.
- Forman, H.J., Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine* 22, 189–216.
- Herrera, H.M., Davila, A.M., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., Andrea, O.S., Jansen, A.M., 2004. *Enzootiology of Trypanosoma evansi in Pantanal, Brazil*. *Veterinary Parasitology* 125, 263–275.
- Hoare, C.A., 1972. *The trypanosomes of mammals: a zoological monograph*. Blackwell, London.
- Igbokwe, I.O., Esievo, K.A., Saror, D.I., Obagaiye, O.K., 1994. Increased susceptibility of erythrocytes to *in vitro* peroxidation in acute *Trypanosoma brucei* infection of mice. *Veterinary Parasitology* 55, 279–286.
- Ip, C., Hayes, C., Budnick, R.M., Ganther, H.E., 1991. Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Research* 51, 595–600.
- Jenkins, G.C., Facer, C.A., 1985. Hematology of African trypanosomiasis. In: Tizard, I. (Ed.), *Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis*, vol. 231. CRC Press, Boca Raton, pp. 13–44.
- Jentsch, A.M., Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, H.K., 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 251–256.
- Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Power, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., Dani, V.S., Bhargava, A., 2005. Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 491–495.
- Keaney, J.F., Simon, D.J., Freedman, J.E., 1999. Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. *FASEB Journal* 13, 965–976.
- Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M., 1998. Selenium and immune function. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 37, 50–56.
- Lun, Z.R., Desser, S.S., 1995. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? *Parasitology Today* 11, 131–133.
- Marques, L.C., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Aquino, L.P.C.T., Pereira, G.T., 2000. Experimental infection with *Trypanosoma evansi* in horses: clinical and haematological observations. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 9, 11–15.
- Marsden, V.S., Strasser, A., 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annual Review of Immunology* 21, 71–105.
- McKenzie, R.C., Rafferty, T.S., Arthur, J.R., Beckett, G.J., 2001. Effects of selenium on immunity and ageing. In: Hatfield, D.L. (Ed.), *Selenium: Its Molecular Biology. Role in Human Health*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 258–272.
- Meydani, S.N., Meydani, M., Verdon, C.P., 1986. Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E2 synthesis and enhances the immune response of aged mice. *Mechanisms of Ageing and Development* 34, 191–201.
- Meydani, S.N., Beherka, A.A., 1998. Recent developments in vitamin E and immune response. *Nutrition Reviews* 56, S49.
- Navarro, F., Navas, P., Burgess, J.R., Bello, R.I., De Cabo, R., Arroyo, A., Villalba, J.M., 1998. Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane. *FASEB Journal* 12, 1665–1673.
- Omer, O.H., Mousa, H.M., Al-Wabel, N., 2007. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology* 145, 142–145.
- Peregrine, A.S., Mamman, M., 1993. Pharmacology of diminazine: a review. *Acta Tropica* 54, 185–203.
- Ricciarelli, R., Zingg, J.M., Azzi, A., 2000. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation* 102, 82–87.
- Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa, T., Takahashi, K., Niki, E., 2003. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *Journal of Biological Chemistry* 278, 39428–39434.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 916–919.
- Schalm, O.W., Jain, N.C., Carrol, E.J., 1975. *Veterinary Hematology*, third ed. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 122–143.
- Seko, Y., Saito, Y., Kitahara, J., Imura, N., 1989. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione *in vitro*. In: Wendel, A. (Ed.), *Selenium in Biology and Medicine*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 70–73.
- Silva, R.A.M.S., Herrera, M.M., Domingos, L.B.S., 1995. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects. *Ciência Rural* 25, 233–238.
- Spallholz, J.E., 1990. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 262, 145–158.
- Spallholz, J.E., 1994. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine* 17, 45–64.
- Sirivan, C., Pramoolsinsap, T., Pemyodhin, P., 1994. Effect of diminazeno aceturate and isometamidium chloride on the control of *Trypanosoma evansi* in naturally infected sow. *Thai Journal of Health Research* 8, 101–109.
- Tarello, W., 2005. *Trypanosoma evansi* infection in three cats. *Revue de Médecine Vétérinaire* 156, 133–134.
- Tuntasuvan, D., Jarabrum, W., Viseshakul, N., Mohkaew, K., Boritsuwana, S., Theeraphan, A., Kongkanjana, N., 2003. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazeno aceturate. *Veterinary Parasitology* 110, 227–233.
- Turner, K.J., Finch, J.M., 1991. Selenium and the immune response. *Proceedings of the Nutrition Society* 50, 275–285.
- Ventura, R.M., Takeda, G.F., Silva, R.A.M.S., Nunes, V.L.B., Buck, G.A., Teixeira, M.M.G., 2002. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. *International Journal for Parasitology* 32, 53–63.
- Wolkmer, P., Da Silva, A.S., Traesel, C.K., Paim, F.C., Cargnelutti, J.F., Pagnoncelli, M., Picada, M.E., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2009. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology* 165, 41–46.
- Yousef, M.I., Abdallah, G.A., Kamel, K.I., 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science* 76, 99–111.