

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

VALESCA ANSCHAU

ESTRESSE OXIDATIVO E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS
COMO BIOMARCADORES DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM
***Trypanosoma evansi* EM RATOS WISTAR.**

Lages - SC

2011

VALESCA ANSCHAU

**ESTRESSE OXIDATIVO E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS
COMO BIOMARCADORES DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM
Trypanosoma evansi EM RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr.º Luiz Claudio Miletto.

Coorientadora: Prof. Dr.ª Fabíola Iagher.

Lages, SC

2011

VALESCA ANSCHAU

**ESTRESSE OXIDATIVO E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS
COMO BIOMARCADORES DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM
Trypanosoma evansi EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Professor Dr. Luiz Cláudio Miletto
Universidade do Estado de Santa Catarina.

Professora Dr^a Mere Erika Saito
Universidade do Estado de Santa Catarina.

Professor Dr. Danilo Wilhelm Filho
Universidade Federal de Santa Catarina.

Lages, 09 de dezembro de 2011.

“There is no final experiment. Nature, like a miracle, constantly challenges our perception. Science, at best, is really an art part of partial truths”.

RAJENDRA RAGHOW

DEDICO

À minha mãe e minha irmã por todo amor, dedicação, incentivo e pelos valores que norteiam a minha vida, e ao André que viveu esta e outras tantas histórias, ao meu lado, me motivando sempre com seu amor, carinho e paciência.

OFEREÇO

A meu orientador, Prof. Luiz Cláudio Miletto, pela confiança depositada cegamente em mim, pelo exemplo, competência profissional, caráter e generosidade. Minha gratidão e todo o meu respeito.

AGRADECIMENTOS

À minha coorientadora, Dr^a. Fabíola Iagher, que, mesmo com todos os enjoos da gravidez, sempre se fez presente com seu zelo, paciência, carinho, incansável estímulo, pela ajuda essencial na realização desse trabalho, minha eterna gratidão.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Danilo Wilhelm Filho e Dr^a. Mere Erika Saito, por terem gentilmente aceitado analisar estes trabalhos e pelas grandes colaborações que fizeram.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, pela infraestrutura e facilidades proporcionadas, e ao Laboratório de Patologia Clínica que permitiu a utilização de diversos equipamentos do laboratório.

A todo Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores, o meu muito obrigado, em especial, minhas amigas Ana Paula Perin e Mayara Vieira Tizatto, pela grande ajuda na execução desse trabalho, pelas agradáveis companhias, pelo apoio, pelos momentos engraçados (ligar às 3 horas da manhã e avisar: “Venham que os ratos estão morrendo!”), e claro, por aquelas bem geladas.

A todos os mestrandos, estagiários, professores e funcionários que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, apesar de não citados nominalmente, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

RESUMO

ANSCHAU, Valesca. **Estresse oxidativo e parâmetros hematológicos como biomarcadores da infecção experimental com *Trypanosoma evansi* em ratos.** 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2011.

O *Trypanosoma evansi* é um hemoparasita flagelado conhecido por causar infecção em uma diversidade de mamíferos como camelos, bovinos, equinos, bubalinos, suínos, caninos e outras espécies animais em áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, *T. evansi* é considerado endêmico apenas no Pantanal, mas também já foi encontrada na região central do Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. Altos níveis de parasitemia com rápido desenvolvimento de anemia caracterizam a doença, contudo seus mecanismos de desenvolvimento ainda são desconhecidos. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do estresse oxidativo em eritrócitos e avaliar parâmetros hematológicos de ratos infectados experimentalmente com *T. evansi*. Para isso, sessenta ratos Wistar machos foram inoculados via intraperitônio com sangue contendo 10^3 tripanossomas e quinze foram usados como controle negativo. A parasitemia foi avaliada a cada 12 horas e os animais foram alocados em cinco grupos de acordo com a média de tripanossomas em 10 campos homogêneos focados aleatoriamente sendo: (A) grupo não infectado (controle); (B) ratos com 1-10 tripanossomas/campo; (C) 11-30 tripanossomas/campo; (D) 31 a 60 tripanossomas/campo; and (E) com mais de 61 tripanossomas/campo. Os animais que apresentaram o número de tripanossomas equivalente ao grupo, foram sacrificados e amostras de sangue coletadas para mensuração das atividades da glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona-S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), catalase (CAT), e glutatona (total e oxidada), tióis protéicos (PSH) e não protéicos (NPSH). Assim como ferro sérico, glicose plasmática, fragilidade osmótica, níveis de metahemoglobina, marcadores de estresse oxidativo como peróxidos totais e lipídicos e níveis de proteína carbonilada (PC) foram quantificados. Também foram analisados parâmetros hematológicos tais como contagem total eritrócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina, volume globular, volume globular médio, concentração hemoglobina corpuscular média, proteínas plasmáticas totais, plaquetas, reticulócitos, e contagem diferencial de leucócitos. Os grupos infectados com maior desenvolvimento da doença apresentaram anemia, com diminuição nos reticulócitos e plaquetas. Além disso, o aumento na fragilidade osmótica eritrocitária e nos

níveis de metahemoglobina nos grupos D e E foi observada. No grupo E foi observada uma redução significativa nos níveis de glicose plasmática quando comparado ao grupo controle (64%). O ferro sérico diminuiu 78% no grupo B, mas aumentou 78% no grupo E. A infecção aguda causou um aumento da atividade da GPx nos grupos C, D e E e um aumento da atividade da CAT nos grupos D e E respectivamente. Entretanto, ocorreu uma diminuição da atividade da GR no grupo E de aproximadamente 52%. Não foram encontradas diferenças significativas nas atividades da GST e G6PD nos grupos comparados com o controle. Infecção com *T. evansi* causou um consumo da GSH-t (48%) e uma redução nos níveis de PSH e NPSH, de aproximadamente 55%. Assim como, animais infectados mostraram um aumento nos níveis de peróxidos totais e lipídicos, na concentração de PC de mais de 90% comparado com o controle. Em resumo, *T. evansi* promoveu insulto oxidativo em ratos infectados através do aumento das atividades da GPx, CAT, depleção da GSH-t, PSH e NPSH, inibição da atividade da GR. Além disso, a infecção também aumentou os níveis de PC, peróxidos totais e lipídicos nos estágios de maior infecção causada pelo *T. evansi*. Diante disso, é possível afirmar que danos oxidativos em eritrócitos contribuem decisivamente para o desenvolvimento de anemia na infecção por *T. evansi* em ratos.

Palavras –chave: *T. evansi*, eritrócitos, estresse oxidativo, defesas antioxidantes.

ABSTRACT

ANSCHAU, Valesca. **Oxidative stress and hematological parameters as biomarkers of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in rats.** 2011. 94f. Dissertation (Master of Animal Science). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2011.

Trypanosoma evansi is a hemoflagellate parasite that had known to cause infection in a variety of mammals, such as camels, cattles, horses, buffaloes, pigs, dogs and other animal species in tropical and subtropical áreas. In Brazil, *T. evansi* is considered endemic only at Pantanal, but has been also found in the central region of Rio Grande do Sul and Santa Catarina also. High levels of parasitemia with rapid development of anemia characterize the disease, however the mechanisms of development are still unknown. In this study we aimed to investigate the effect of oxidative stress in erythrocytes and evaluate hematological parameters in rats experimentally infected with *T. evansi*. Due to, sixty male Wistar rats, were inoculated intraperitoneally with blood containing 10^3 trypanosomes and fifteen were negative control. The parasitemia was evaluated each 12 hours and the animals were allocated in five groups according to average parasitemia in 10 random homogeneous microscopic fields: (A) uninfected group (control); (B) rats with 1-10 trypanosomes/field; (C) 11-30 trypanosomes/field; (D) 31-60 trypanosomes/field; and (E) more than 61 trypanosomes/field. The animals that achieved the number of trypanosomes equivalent to the groups were sacrificed and blood samples collected to measurement the activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), catalase (CAT), and glutathione (total and oxidized), protein thiols (PSH) and non-protein (NPSH). As well as, serum iron, plasma glucose, osmotic fragility, methemoglobin levels, markers of oxidative stress as total and lipid peroxides levels and protein carbonyl concentration (PC) were quantified. Hematological parameters were also analyzed such as erythrocyte count, hematocrit, hemoglobin concentration, packed cell volume, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, total plasma proteins, platelets, reticulocytes and differential leukocytes count. The infected groups with greater development of the disease developed anemia, with low reticulocytes and platelets levels. Besides that, the increasing of erythrocyte osmotic fragility and methemoglobin levels was observed in groups D and E. In group E was observed a significant reduction of plasma glucose levels when compared with the control group (64%). The serum iron decreased to 58% in group B, but increased to 78% in group E. The acute infection caused an increase in

GPx activity in group C, D and E, and enhances CAT activity in group D and E respectively. However, decreased the GR activity in group E approximately 52%. There were no significant differences in the activities of GST and G6PD in the groups comparing to the control. Infection with *T. evansi* caused a consumption of GSH-t (48%) and a reduction of the levels of PSH and NPSH, around 55%. As well, infected animals showed an increase of the levels of total and lipid peroxides, more than 90% PC concentration compared with the control. Finally, *T. evansi* promoted oxidative damage in infected rats through increasing antioxidant activities of GPx, CAT, depletion of GSH-t, PSH and NPSH, and inhibition of GR activity. Moreover, the infection also increased the levels of PC, total and lipid peroxides in higher stages of infection caused by *T. evansi*. Therefore, we can state that oxidative damage in erythrocytes contributes decisively to the development of anemia in infection by *T. evansi* in rats.

Keywords: *T. evansi*, erythrocytes, oxidative stress, antioxidants defenses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da microscopia eletrônica do protozoário <i>T. evansi</i>	19
Figura 2: Foto de um esfregaço sanguíneo de um rato experimentalmente infectado com <i>T. evansi</i> , corado com Panótico Rápido®. Aumento de 1000x.....	20
Figura 3: Ciclo de vida do <i>T. evansi</i> que se reproduz por fissão binária no hospedeiro...	21
Figura 4: Casos de Surra notificados à OIE (World Organization for Animal Health) no período de janeiro a junho de 2011.....	23
Figura 5: Equino infectado pelo <i>T. evansi</i> , apresentando acentuada paralisia dos membros pélvicos.....	24
Figura 6: Representação da geração de EROs.....	26
Figura 7: Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo.....	28
Figura 8: Processo de lipoperoxidação.....	30
Figura 9: Vaso sanguíneo (corte longitudinal), onde aparecem os elementos figurados (plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos), suspensos no plasma sanguíneo....	32
Figura 10: Esquema representativo da membrana eritrocitária e seus constituintes.....	35
Figura 11: Mecanismo de lesão eritrocitária na sobrecarga de ferro. A hemólise poderá ocorrer se a capacidade de defesa antioxidante for superada pela capacidade oxidativa do agente.....	36
Figura 12: Estrutura da glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).....	37
Figura 13: Fragilidade osmótica eritrocitária de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	51
Figura 14: Porcentagem de Metahemoglobina (MetaHb) no sangue de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	52
Figura 15: Concentração de glicose plasmática de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	53

Figura 16: Concentração de ferro sérico de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	54
Figura 17: Atividade da GR no hemolisado de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	55
Figura 18: Atividade da GPx no hemolisado de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	56
Figura 19: Atividade da CAT no hemolisado de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	57
Figura 20: Atividade da GST no hemolisado de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	58
Figura 21: Atividade da G6PD no hemolisado de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	59
Figura 22: Níveis de GSH-t (a) e GSSG (b) no sangue total de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	60
Figura 23: Níveis de tióis protéicos (PSH) (a) e não-protéicos (NPSH) (b) e no plasma de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	61
Figura 24: Níveis de peroxidação lipídica (a) e de peróxidos totais (b) no sangue de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	62
Figura 25: Níveis de proteína carbonilada no plasma de ratos infectados com <i>T. evansi</i> em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61.....	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Contagem de eritrócitos, volume globular, (VG) concentração de hemoglobina (Hb), volume globular médio(VGM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas, proteínas plasmáticas totais (PPT) e reticulócitos (RET) obtidos de ratos experimentalmente infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61..... **50**
- Tabela 2: Contagem diferencial de leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos obtidos de ratos experimentalmente infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61..... **50**

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CuOOH	Peróxido de cumeno
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DNPH	2,4-dinitro fenil hidrazina
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
G6PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona (forma reduzida)
GSH-t	Glutathiona total
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona S-transferase
Hb	Hemoglobina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxil
KPi	Tampão fosfato de potássio
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPO	Lipoperoxidação
MetaHb	Metahemoglobina
MDA	Malondialdeído
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NPSH	Tióis não protéicos
¹ O ₂	Oxigênio singlete
[•] OH	Radical hidroxila
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido ou radical superóxido
Oxi-Hb	Hemoglobina oxigenada
PC	Proteína carbonilada
PCA	Ácido perclórico
PPT	Proteínas plasmáticas totais
PSH	Tióis protéicos
RET	Reticulócitos
ROO [•]	Radical peroxil
ROH [•]	Radical alcoxil
ROOH	Peróxido lipídico
SH	Grupamento tiol
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
t-BOOH	Terc-butil hidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético
VG	Volume globular
VGM	Volume globular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
<i>1.1 Trypanossoma evansi</i>	18
1.1.1 Aspectos gerais	18
1.1.2 Ciclo de vida e transmissão	20
1.1.3 Distribuição	22
1.1.4 Mal das Cadeiras ou Surra	23
1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	25
1.3 DANOS OXIDATIVOS	27
1.3.1 Dano ao DNA	28
1.3.2 Dano protéico	29
1.3.3 Dano lipídico	29
1.4 SANGUE E SEUS CONSTITUINTES	31
1.4.1 Eritrócito	32
1.4.2 Membrana eritrocitária	34
1.4.3 Sistema antioxidante do eritrócito	36
2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 LOCAL DA PESQUISA	40
3.2 AMOSTRA DE <i>T. evansi</i>	40
3.3 GRUPO EXPERIMENTAL	40
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	40
3.5 PREPARAÇÃO DO HEMOLISADO	42
4. ANÁLISES	42
4.1 EXAMES HEMATOLÓGICOS	42
4.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	42
4.2.1 Fragilidade osmótica eritrocitária	42
4.2.2 Metahemoglobina	43
4.2.3 Glicose plasmática e ferro sérico	43
4.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS	43

4.3.1 Glutationa redutase (GR)	43
4.3.2 Glutationa peroxidase total (GPx)	44
4.3.3 Glutationa S-Transferase (GST)	44
4.3.4 Glicose- 6-fosfato desidrogenase (G6PD)	44
4.3.5 Catalase (CAT).....	45
4.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS	45
4.4.1 Determinação dos níveis de glutathione total (GSH-t) e oxidada (GSSG)	45
4.4.2 Grupos tióis protéicos (PSH) e não-protéicos (NPSH)	46
4.5 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS	46
4.5.1 Peróxidos totais e lipídicos	46
4.5.2 Proteína carbonilada plasmática.....	47
4.6 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA	47
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
6. RESULTADOS	49
6.1 PARASITEMIA E CURSO DA INFECÇÃO	49
6.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	49
6.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	51
6.3.1 Fragilidade osmótica eritrocitária	51
6.3.2 Formação de metahemoglobina	52
6.3.3 Concentração de glicose plasmática	53
6.3.4 Concentração de ferro sérico	54
6.4 DETERMINAÇÕES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	55
6.4.1 Atividade da Glutationa Redutase	55
6.4.2 Atividade da Glutationa Peroxidase	56
6.4.3 Atividade da Catalase.....	57
6.4.4 Atividade da Glutationa-S-Transferase.....	58
6.4.5 Atividade da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.....	59
6.5 DETERMINAÇÕES DOS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS	60
6.5.1 Níveis de Glutationa total (GSH-t) e oxidada (GSSG)	60
6.5.2 Níveis dos grupos tióis protéicos (PSH) e não-protéicos (NPSH)	61
6.6 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DE DANO OXIDATIVO	62
6.6.1 Níveis de peróxidos totais e lipídicos	62
6.6.2 Concentração de proteína carbonilada	63

7. DISCUSSÃO.....	64
8. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXO	94
ANEXO A. Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma evansi*

1.1.1 Aspectos gerais

As doenças parasitárias têm atormentado o homem, animais domésticos e selvagens desde os tempos mais remotos. Hoje no mundo muitas nações têm sob controle essas doenças, porém os mesmos parasitas continuam causando doenças dentro de suas fronteiras e provocando mortes nos países menos desenvolvidos. Segundo Silva (2002), as tripanossomoses se encontram na lista das 20 doenças mais importantes de acordo com seu impacto em populações mais pobres.

O *Trypanosoma evansi* pertence ao gênero *Trypanosoma*, subgênero *Trypanozoon*. É um protozoário classificado como monomórfico, ou seja, não passa por complexas mudanças morfológicas e bioquímicas, permanecendo em sua forma infectante (tripomastigota) durante toda sua vida (BRUN et al., 1998). As formas encontradas na corrente sanguínea são basicamente lancetadas e o corpo é alongado e achatado. Um flagelo livre está sempre presente. Há uma membrana ondulante bem desenvolvida e a extremidade posterior pode ser arredondada ou afilada (Figura 1). Seu tamanho varia de 15-33 μm , com média de 24 μm (HOARE, 1972; SILVA et al., 1995a).

O *T. evansi* tem origem africana, e trabalhos indicam que surgiu a partir da perda parcial ou total do DNA mitocondrial ou cinetoplasto do *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono em humanos. O cinetoplasto, quando presente, é pequeno (0,6 μm), tem uma forma de bastonete e geralmente ocupa a porção subterminal ou marginal do corpo. A ausência de cinetoplasto é verificada em grande porcentagem nas cepas sul-americanas, sendo que nas amostras brasileiras de *T. evansi* é totalmente ausente, tanto nos isolados de animais domésticos quanto nos animais selvagens (VENTURA et al., 2000). Nesses casos o núcleo é localizado mais próximo da extremidade posterior (HOARE, 1972).

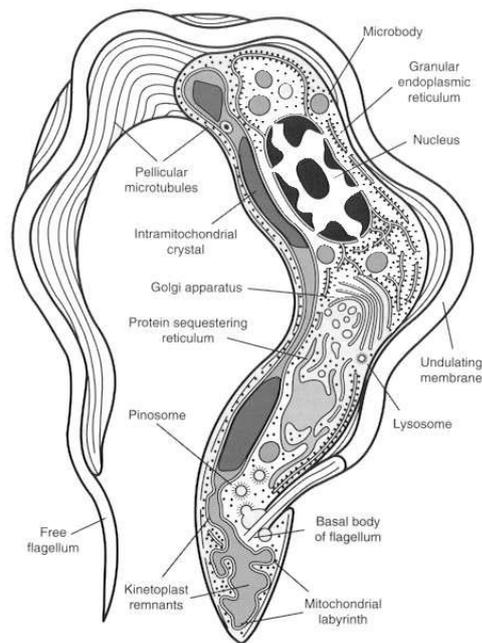


Figura 1: Esquema representativo da microscopia eletrônica do protozoário *T. evansi*. Fonte: VICKERMAN (1978).

Segundo Jensen (2008), essa perda do cinetoplasto tornou inviável a sobrevivência do parasito nas moscas tsé-tsé, pois as proteínas mitocondriais são essenciais para a sobrevivência no inseto. Desta forma, conferiu ao *T. evansi* a perda da dependência do vetor tsé-tsé para completar seu ciclo, e visto que as moscas do gênero *Glossina* possuem uma distribuição limitada a certas regiões da África, este protozoário pôde avançar para outras regiões através de transmissão exclusivamente mecânica (LUN & DESSER, 1995).

A primeira descrição associando tripanossomas com uma doença foi feita em 1880 por Griffith Evans, um médico veterinário do exército do Reino Unido que observou o protozoário (FALLIS, 1986) ao examinar ao microscópio lâminas com sangue de equinos acometidos na Índia (Figura 2), Evans acreditou que a fonte primária da infecção para os animais estivesse em águas poluídas. Mais tarde foi encontrado o mesmo agente no sangue de mulas (HOARE, 1972).

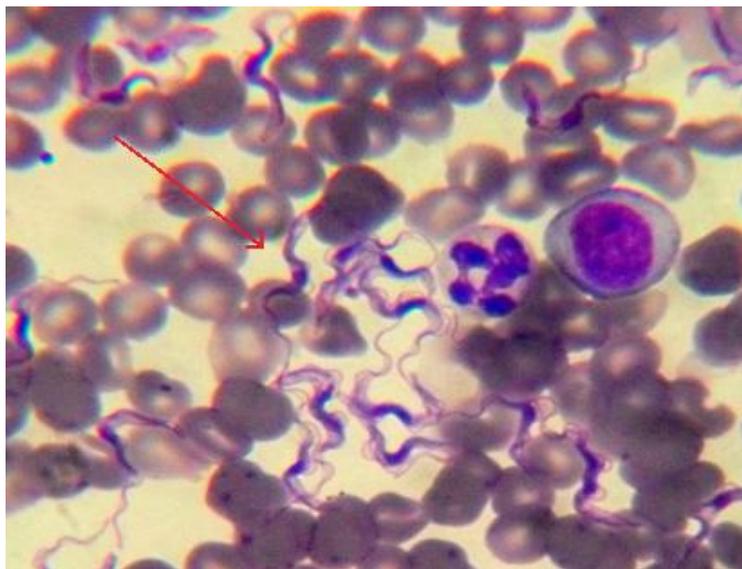


Figura 2: Foto de um esfregaço sanguíneo de um rato experimentalmente infectado com *T. evansi*, corado com corante hematológico rápido. Aumento de 1000x. Fonte: arquivo pessoal.

No Brasil, a doença foi inicialmente observada entre 1827 e 1830 na Ilha de Marajó, local onde iniciaram epizootias graves entre equinos da região. Da Ilha de Marajó a doença se espalhou pela América do Sul: Brasil, Guiana, Bolívia, Venezuela e Colômbia. A tripanossomose causada por *T. evansi* é comumente denominada “surra” (HOARE, 1972), “derrengadera” (LEVINE, 1973), “mal das cadeiras” (SILVA et al., 1995a) ou “peste quebrabunda”, dependendo do local do mundo onde ocorre. Outras denominações usadas anteriormente para *T. evansi* incluem *Spirochaete evansi*, *Trypanosoma soudanense*, *Trypanosoma venezuelense*, *Trypanosoma soudanense* Var. *berberum*, *Trypanosoma cameli*, *Trypanosoma marocanum*, *Trypanosoma ninae* Kohl yakmov, *Trypanosoma su-auru* (HOARE, 1972). Sabe-se que atualmente todas essas denominações referem-se à mesma espécie, *T. evansi*.

1.1.2 Ciclo de vida e transmissão

Este protozoário é transmitido mecanicamente por insetos hematófagos (por exemplo, moscas das famílias Tabanidae e Stomoxyidae), pela inoculação dos tripanossomas através da saliva dos vetores, e a sua divisão ocorre por fissão binária (Figura 3; HOARE, 1972). Aparentemente não ocorre o desenvolvimento cíclico no vetor, nos quais os tripanossomas permanecem na probóscide na forma tripomastigota. A transmissão mecânica dos

hemoflagelados depende diretamente da sobrevivência destes no aparelho bucal dos insetos vetores, sendo a infectividade maior nos primeiros minutos após a alimentação (LOSOS, 1980). Para que a transmissão seja realizada com sucesso, a alimentação do vetor no hospedeiro infectado deve ser interrompida, fazendo com que o inseto procure outro hospedeiro não infectado e inocule o parasita no mesmo. Segundo um modelo matemático de transmissão por tabanídeos proposto por Desquesnes et al. (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 três a cinco anos. Condições estressantes como alterações climáticas e alimentares podem iniciar os casos.

Os vetores usuais pertencem aos gêneros *Tabanus sp.*, porém insetos dos gêneros *Stomoxys sp.*, *Haematopota sp.* e *Lyperosia sp.* podem transmitir o parasita (SILVA, 2002). Os vetores podem ingerir mais de uma cepa de tripanossoma, existindo a possibilidade de troca genética entre as duas linhagens, podendo assim, aumentar a resistência do parasita (STERNBERG, 1989). A transmissão por via oral já foi comprovada experimentalmente em camundongos e cães (BAZZOLI et al., 2002). Foram relatados casos de transmissão do *T. evansi* através do leite ou durante o coito (BRUN, 1998).

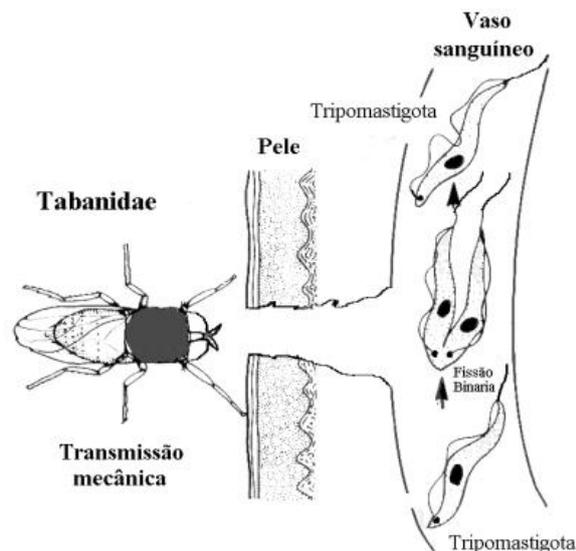


Figura 3: Ciclo de vida do *T. evansi* que se reproduz por fissão binária no hospedeiro. Fonte: Silva, 2002.

1.1.3 Distribuição

Segundo Losos (1980), *T. evansi* é o tripanossoma patogênico de maior distribuição mundial sendo encontrado na África, Índia, Malásia, Indonésia, China, Rússia, Filipinas, América Central e do Sul, e atualmente está na lista das doenças de declaração obrigatória da OIE (*World Organization for Animal Health*). Na Europa foram detectados casos na Espanha (TAMARIT et al., 2010) e na França (GUTIERREZ et al., 2010) associados com a importação de camelos dromedários das Ilhas Canárias (TAMARIT et al., 2010).

Os surtos epidêmicos de tripanossomose por *T. evansi* tendem a envolver diferentes hospedeiros animais em diferentes partes do mundo. Podem ocorrer em equinos (QUNIÑONES MATEU et al., 1994; DÁVILA et al., 1999; LEMOS, 2003), asininos (CADIOLI, 2001; TUNTASUVAN et al., 2003a), bovinos (FRANKE et al., 1994; TUNTASUVAN et al., 1997, TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998), búfalos (SUDARTO et al., 1990, DAMAYANTY et al., 1994), veados (TUNTASUVAN et al., 2000), cães (AQUINO et al., 1999; COLPO et al., 2005), capivaras (FRANKE et al., 1994), quatis (NUNES & OSHIRO, 1990), marsupiais, tatus (HERRERA et al., 2004), suínos (TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998; TUNTASUVAN et al., 2003b), camelos (DELAFOSSÉ & DOUTOUM, 2004) e elefantes (LEVINE, 1973). Recentemente, o primeiro caso de tripanossomose por *T. evansi* em seres humanos foi descrito em um homem indiano (JOSHI et al., 2005).

A doença é enzoótica no Pantanal mato-grossense, podendo ocorrer com morbidade alta em certas sub-regiões e estar ausentes em outras (DÁVILA et al., 1999). Embora os achados clínicos e laboratoriais indiquem que capivaras e os quatis são os principais reservatórios de *T. evansi*, bovinos e cães, devem ser também considerados como reservatórios eficientes pelo amplo contato com equinos. (FRANKE et al., 1994).

O Brasil não está entre os países em que a doença foi notificada à OIE recentemente (Figura 4). Surtos ou casos isolados desta tripanossomose têm sido relatados em diversas regiões brasileiras, como no Rio Grande do Sul (COLPO et al., 2005; CONRADO et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007), Mato Grosso do Sul (MOREIRA, 1985; BRANDÃO et al., 2002), Santa Catarina (DA SILVA et al., 2008), e no Pantanal, onde a doença é considerada endêmica.

Isso ocorre devido à grande concentração de animais em áreas de terra seca, presença de reservatórios silvestres (principalmente capivaras e quatis) e abundância de vetores (FRANKE et al. 1994; SILVA et al., 1995b; HERRERA et al., 2004). Até o momento

nenhum dos casos encontrados no Brasil foi relatado a OIE. Casos não reportados ou diagnosticados dificultam uma estimativa real da abrangência desta enfermidade no Brasil. É uma doença que causa grande impacto econômico nas regiões afetadas por dificultar o desenvolvimento rural e limitar a produção agrícola por sua perda de animais de tração como os equinos, que são frequentemente afetados pela doença (HERRERA, 2004).

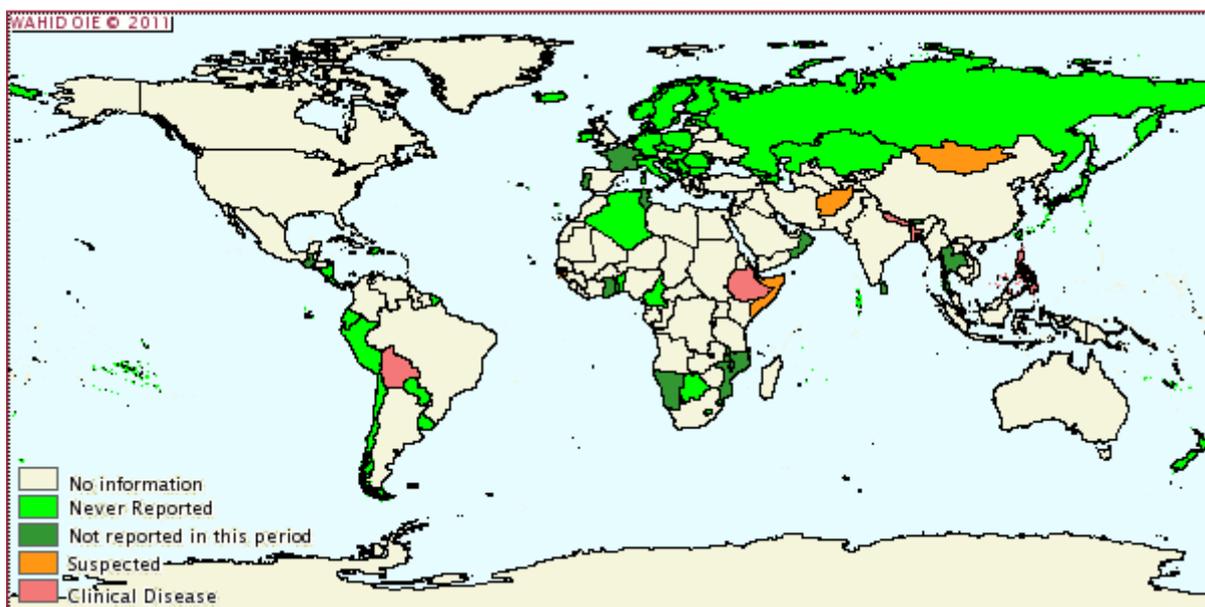


Figura 4: Casos de Surra notificados à OIE (World Organization for Animal Health) no período de janeiro a junho de 2011. Fonte: Disponível em www.oie.int

1.1.4 Mal das Cadeiras ou Surra

A infecção por tripanossoma é caracterizada por interferências graves no metabolismo do hospedeiro (KADIMA et al., 2000), porém o estudo das alterações metabólicas é restrito. Após a inoculação das formas tripomastigotas, os sinais clínicos aparecem depois de aproximadamente 04 a 15 dias. A patogenicidade dos tripanossomas no hospedeiro varia de acordo com a cepa do tripanossoma, a espécie do hospedeiro, e fatores não específicos que afetam o animal como outras infecções e condições epizootiológicas locais (HOARE, 1972).

Os tripanossomas multiplicam-se no local da picada, invadem a corrente sanguínea e o sistema linfático, causando ataques febris generalizados e induzindo uma resposta inflamatória (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). Os picos de parasitemia ocorrem devido a variações antigênicas nas proteínas de superfície de membrana do parasita. Conforme anticorpos são produzidos, ocorre a eliminação do clone corrente, mas sucessivos

novos padrões de antígenos de superfície são gerados para evadir a resposta imunológica do hospedeiro (LUCAS, 1992).

Um dos principais sinais clínicos descritos em infecções por *T. evansi* é a anemia (JATKAR, 1971; AQUINO et al., 2002; HERRERA et al., 2002; WOLKMER et al., 2009). Praticamente todas as espécies susceptíveis apresentam quadros anêmicos que variam de leves a graves: cães (MOREIRA, 1985; FRANCISCATO, 2007), caprinos (SHARMA et al., 2000), camelos (ATARHOUCHE et al., 2003), quatis (HERRERA et al., 2002), equinos (HERRERA et al., 2004) e gatos (DA SILVA, 2010), seguida por febre intermitente, anorexia, e em muitos casos, causando a morte do animal dentro de poucas semanas (BRUN et al., 1998; OMER, 2007).

Durante a fase crônica ocorre o agravamento dos sinais clínicos e a identificação de outros sinais como perda de pelos, fraqueza progressiva, perda de condição corporal, letargia, depressão, conjuntivite, tosse e abortos (SEILER et al., 1981; SILVA et al., 1995b; TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998; MARQUES et al., 2000). Sinais neurológicos têm sido descritos na fase terminal da doença, como relutância em se mover, ataxia, paralisia e incoordenação dos membros pélvicos (Figura 5; SEILER et al. 1981; MARQUES et al., 2000), principalmente em equinos, bovinos, cevêdeos e bubalinos infectados naturalmente (TUNTASUVAN et al. 1997; TUNTASUVAN; LUCKINS 1998; TUNTASUVAN et al. 2003a; RODRIGUES et al., 2006).



Figura 5: Equino infectado por *T. evansi*, apresentando acentuada paralisia dos membros pélvicos. Fonte: Rodrigues et al., 2009.

De acordo com Holwill (1965), o resultado da anemia não é devido à depressão da atividade da medula óssea, mas sim à destruição dos eritrócitos do sangue. A eritrofagocitose ocorre devido à ação traumática direta dos protozoários sobre os eritrócitos, aumentando a fragilidade celular. A patogênese da anemia na tripanossomose é bastante complexa e envolve uma série de mecanismos ainda não totalmente elucidados (ANOSA & KANEKO, 1983; JENKINS & FACER, 1985; RUE et al., 2000; AQUINO et al., 2002; SALEH, 2009).

Em ovinos experimentalmente infectados com *T. evansi*, Onah et al., (1996) verificaram anemia discreta, evidenciada pela redução no hematócrito e da contagem de eritrócitos, enquanto Audu et al., (1999) encontraram nesta mesma espécie animal, decréscimo tanto no hematócrito quanto nos teores de hemoglobina. Vários mecanismos foram propostos para explicar a origem das anemias nas tripanossomíases, entre eles podemos destacar a supressão da atividade eritropoiética, hemodiluição, hemólise resultantes de fatores imunológicos, ação direta dos parasitas ou produtos por eles liberados (ASSOKU, 1975; AUDU et al., 1999).

Infecções experimentais com este tripanossoma revelaram aumentos na contagem global de leucócitos. Durante o curso da infecção, a contagem diferencial dos mesmos pode variar, embora não haja um padrão definido (AQUINO, 1997). Vários fármacos têm sido utilizados no campo nos últimos anos como o aceturato de dimenazeno, quinapiramina, suramin e melarsomina. Os grandes problemas são a alta toxicidade destes fármacos 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 (BRUN et al., 1998).

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Ao mesmo tempo, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas a nível intracelular e extracelular, criando então o chamado “paradigma do oxigênio”, devido ao balanço existente entre suas vantagens e desvantagens. Essas espécies químicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas, e são comumente chamadas de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (OGA, 2003; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A maioria dessas EROs são radicais livres, que são átomos, moléculas ou íons que possuem um ou mais elétrons não-pareados em seus orbitais externos, o que as torna reativas, sendo capazes de se combinar inespecificamente com diversas moléculas integrantes das estruturas celulares e derivadas de cada uma delas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As EROs, em geral, são formadas por absorção de radiação, por reações redox ou por processos de catálise enzimática (SLATER, 1984). EROs é um termo frequentemente usado para incluir também espécies que não são radicais livres, por exemplo, algumas moléculas não derivadas do O_2 , que são capazes de gerar radicais livres como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Estas espécies químicas, formadas por elétrons livres ou não-pareados, têm uma instabilidade elétrica muito grande e, por essa razão, mesmo tendo uma meia vida curta, apresentam grande capacidade reativa (Figura 6). A fim de captar um elétron para sua estabilização, estes radicais podem reagir com qualquer composto como proteínas, lipídios, açúcares, DNA entre outros, provocando uma reação em cascata que pode culminar em lesão e morte celular (JORDÃO JUNIOR, et al., 1998, HALLIWELL, 2007).

A geração contínua das EROs é um processo fisiológico característico do ciclo respiratório celular (SIES, 1985). Os organismos obtêm o ATP da redução completa do O_2 na membrana mitocondrial, o qual é reduzido à água. Entretanto o O_2 pode não ser reduzido completamente, originando intermediários altamente reativos e danosos às células como radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio singlete (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FLOYD, 1984).

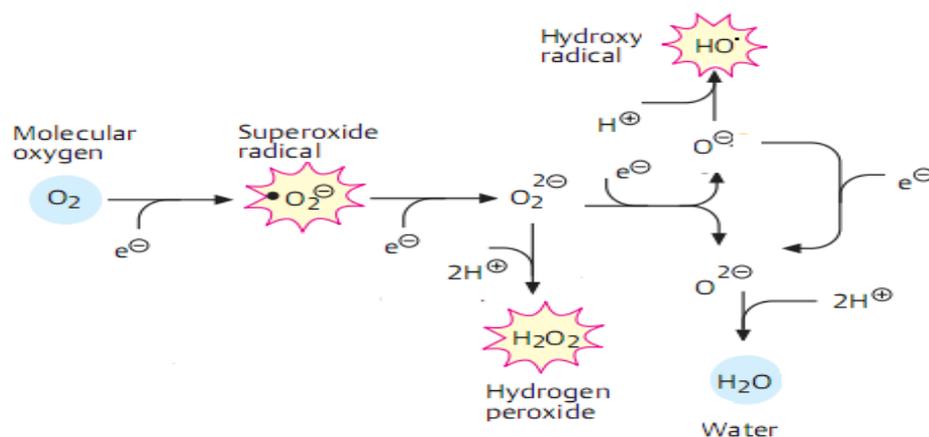


Figura 6: Representação da geração de EROs. Fonte: Adaptado de Koolman, 2005.

O radical $\cdot\text{OH}$ é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, e pode lesionar o DNA, proteínas, lipídios e carboidratos (NORDBERG & ARNÉR, 2001). A combinação extremamente rápida do $\cdot\text{OH}$ com metais ou outros radicais como ferro onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Eles podem inativar várias proteínas e enzimas e oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (S-S), além de reagir com os fosfolipídios presentes nas membranas celulares (VALKO, 2006).

O radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ é o mais comum e está em grandes quantidades nas células, é formado pela primeira redução do O_2 , principalmente na cadeia de transporte de elétrons, ou por ação das células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), produzindo grandes quantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$ devido à ativação da enzima NADPH oxidase, que está presente na membrana celular (DIAZ, et al., 1998). Entre as substâncias de interesse biológico que se auto-oxidam estão as catecolaminas, mioglobina, e principalmente a hemoglobina (Hb) (HALLIWELL, 2000). O radical HO_2^{\cdot} representa a forma protonada do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, ou seja possui um próton de hidrogênio. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o $\text{O}_2^{\cdot-}$, por sua facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não possuir elétrons desemparelhados e não ser considerado um radical livre, é um metabólito extremamente danoso por participar da reação que produz o radical $\cdot\text{OH}$. Tem meia vida-longa, sendo capaz de atravessar as camadas lipídicas e reagir com as membranas eritrocitárias devido à sua elevada difusibilidade e solubilidade em água, (VALKO, 2006; CIMEN, 2008), podendo ter sua toxicidade aumentada de 10 para 1000 vezes na presença de ferro (Reação de Fenton, gerando $\cdot\text{OH}$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Um alvo importante das ERO são as membranas fosfolipídicas que causam reações de oxidação em cadeia, aumentando a permeabilidade a íons, promovendo inativação de receptores de membrana e a produção de metabólitos tóxicos (MACNEE, 2001). O processo de peroxidação lipídica está ligado a uma série de processos patológicos envolvendo EROs, como a inflamação (MIDDLETON, et al., 2000; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

1.3 DANOS OXIDATIVOS

O desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e das defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos, provoca uma variedade de mudanças

fisiológicas chamadas coletivamente de estresse oxidativo (SIES, 1985; SCANDALIOS, 1997). A citotoxicidade do estresse oxidativo está relacionada ao potencial das EROs em exaltar a oxidação dos constituintes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA, os quais levam à deterioração da estrutura e função, até à morte celular (Figura 7; HALLIWELL, 2000; WEN et al., 2004; ZACKS et al., 2005; VALKO et al., 2006).

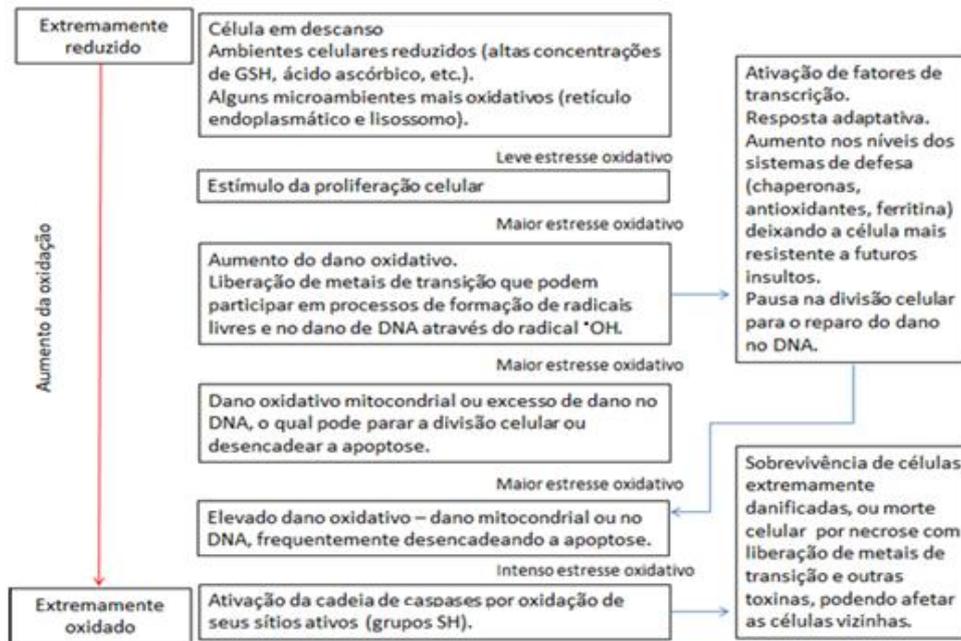


Figura 7: Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo (Adaptado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

1.3.1 Dano ao DNA

O radical $\cdot\text{OH}$ é conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA, atacando tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio, podendo ocasionar ligação cruzada de DNA com proteínas, bases modificadas, defeitos no processo de replicação, quase sempre levando à ruptura da cadeia de DNA (BARREIROS, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Devido à sua alta reatividade e inespecificidade, o radical $\cdot\text{OH}$ pode interagir com as bases nitrogenadas gerando diferentes produtos. Assim, o radical $\cdot\text{OH}$ pode se adicionar à 2' desoxiguanosina (8-oxodGuo), oxidando a 8-hidroxi-guanina gerando 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua). A adenina também pode sofrer adição de $\cdot\text{OH}$ nas

posições C4, C5 ou C8. A timina pode sofrer abstração de um átomo de hidrogênio do anel ou do grupo metil; os radicais resultantes são convertidos em diversos peróxidos de timina que podem quebrar, formando os glicóis de timina (5,6-dihidroxi-6-hidrotiminas). A oxidação da citosina também pode gerar vários produtos, como a citosina glicol e 5,6-dihidroxicitosina. A timina sofre a adição do radical à ligação dupla $\Delta^{5,6}$, formando os radicais livres na posição C-5 e C-6, gerando 5,6-dihidroxi-6-hidrotimina, como principais produtos (CADET et al., 1997; DIZDAROGLU, 2002; COOKE, 2003).

O radical $\cdot\text{OH}$ tem uma alta reatividade tornando-se um radical muito perigoso com uma meia-vida muito curta, de aproximadamente 10^{-9} segundos. Essa alteração feita por esse radical permanece no código genético e representa o primeiro passo envolvido na mutagênese e carcinogênese (VALKO et al., 2006).

1.3.2 Dano protéico

A oxidação de proteínas ocorre principalmente pelo ataque de radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\cdot\text{OH}$, e pode ocorrer por meio de mecanismos, como a oxidação do sítio catalítico, oxidação induzindo a quebra da cadeia polipeptídica, oxidação de aminoácidos, e conjugação de produtos de peroxidação lipídica. A principal consequência da oxidação protéica é a geração de proteína carbonilada (PC), podendo ocorrer reações com produtos da peroxidação lipídica, açúcares ou metabólitos oxidados, sendo que, a principal consequência, é que esse grupamento pode promover a ligação intra ou intermolecular e formar agregados protéicos. Esses agregados são incapazes de sofrer degradação via mecanismos proteolíticos, causando inibição desses processos e consequentemente, promover acúmulo de proteínas oxidadas com aumento de disfunção celular, afetando processos como sinalização celular, estrutura celular e processos enzimáticos. A determinação de proteína carbonilada é um marcador de estresse oxidativo protéico (BERLETT, 1997; CECARINI et al., 2007, VALKO et al., 2007).

1.3.3 Dano lipídico

O processo de oxidação de lipídios é denominado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), constituindo o maior evento consequente do estresse oxidativo de lipídios poliinsaturados em membranas celulares. Esse processo pode causar alterações na

fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática, alterações de transporte iônico e inibição de processos metabólicos (NIGAM, 2000). O processo geral da peroxidação lipídica consiste em três estágios: iniciação, propagação e terminação (Figura 8).

O começo desta reação geralmente ocorre através da abstração de átomo hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) pelo ataque de uma molécula reativa, como ERO, metais, ou outros radicais livres, formando um radical de carbono. Este, por sua vez, realizará um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, o qual pode reagir com moléculas de oxigênio, formando um radical peroxil (ROO^\bullet). A partir da formação deste radical ocorre a fase de propagação, devido à sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metilenos de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico). Estes sofrerão processos de rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e, posteriormente, ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo ROO^\bullet . Este novo ROO^\bullet reinicia o processo, gerando uma reação oxidativa em cadeia (MOSIALOU, 1993; CATALÁ, 2006; 2009).

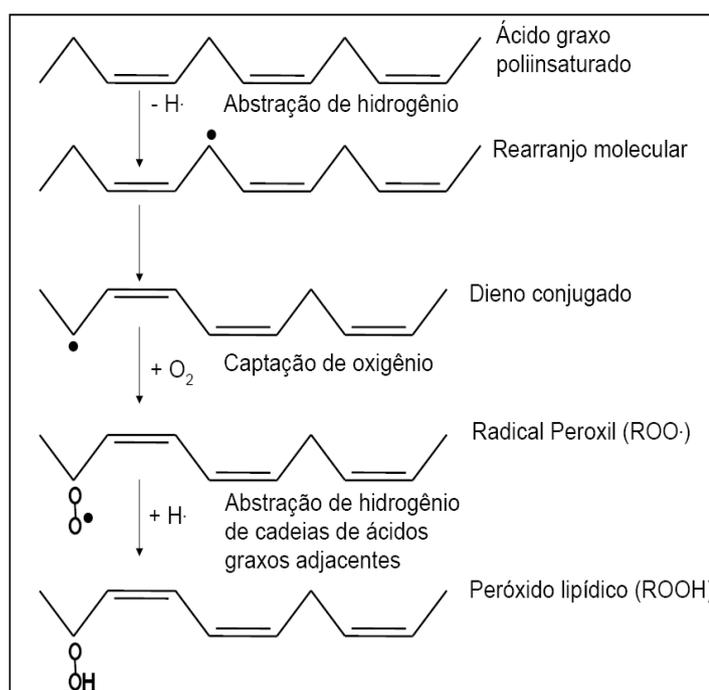
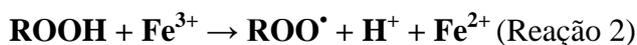


Figura 8: Processo de lipoperoxidação (HALLIWELL, 2007). A abstração de átomos de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (neste esquema representado por três ligações duplas) leva à formação de um dieno conjugado (ligações simples intercaladas por ligações duplas) por rearranjo molecular. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peroxil. Este radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação através da abstração de átomos de hidrogênio de cadeias poliinsaturadas próximas, transformando-se em um peróxido lipídico.

Ao mesmo tempo, quando o ROO^\bullet abstrai o átomo de hidrogênio das cadeias adjacentes, forma-se um peróxido lipídico (ROOH). Este peróxido é geralmente estável sob temperatura fisiológica, mas na presença de íons metálicos pode iniciar um novo tipo de reação em cadeia, quebrando a ligação $\text{O}-\text{O}$, formando um radical alcoxil (ROH^\bullet) (Reação 1) (VALKO, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



Este radical ROH^\bullet também podem abstrair átomos de hidrogênio, tanto de outros peróxidos como de grupos metilenos de ácidos graxos poliinsaturados, continuando as reações em cadeia. Outro grande problema destas reações é a formação de Fe^{3+} , o qual também pode reagir com peróxidos lipídicos gerando radicais peroxilas e Fe^{2+} , em um ciclo autossustentável (Reação 2) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



Vários fatores contribuem para o término deste processo cíclico de lipoperoxidação, tais como a neutralização desses inúmeros radicais por antioxidantes, formação de produtos não radicalares, dentre outros. Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, ocorre a liberação no meio de produtos da degradação de ácidos graxos, tais como o malondialdeído (MDA) (MARNETT, 1999). A quantificação do MDA tem sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo. Esta quantificação pode ser feita pela reação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (OHKAWA et al., 1979), a qual tem sido usada como uma medida de lipoperoxidação.

1.4 SANGUE E SEUS CONSTITUINTES

O sangue é constituído por plasma e células sanguíneas. O plasma é o componente líquido do sangue, e contém água, proteínas, nutrientes, hormônios, sais minerais e resíduos

do metabolismo. As células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos ou glóbulos brancos e plaquetas) circulam suspensas no plasma (KOOLMAN, 2005) (Figura 9).

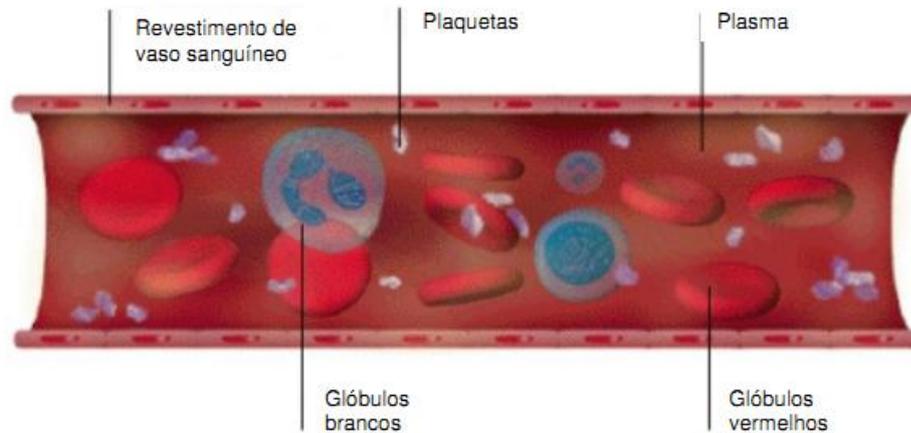


Figura 9: Vaso sanguíneo (corte longitudinal), onde aparecem os elementos figurados (plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos), suspensos no plasma sanguíneo. Fonte: <http://www.webciencia.com/11_20composicao.htm> Acesso em setembro de 2011.

As células do sangue diferem umas das outras nas funções biológicas e nas características metabólicas. Os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos B, linfócitos T e monócitos) constituem a primeira linha de defesa do sistema imune. Dessa forma, o sangue circula no corpo inteiro, está em constante estado de renovação, e provê uma barreira protetora entre os ambientes externos e internos (LIEW et al., 2006).

As plaquetas são de fundamental importância, pois quando ocorre lesão do endotélio de um vaso sanguíneo, elas são ativadas, aderem ao local da lesão e aglutinam-se umas às outras, promovendo a interrupção da perda sanguínea (processo de hemostasia) e participam de processos inflamatórios e atuam na cascata da coagulação do sangue, liberando várias proteínas e lipoproteínas que ativam determinados fatores da coagulação (SOUZA, 1996).

1.4.1 Eritrócito

O eritrócito é a unidade morfológica da série vermelha do sangue circulante, derivado de células pluripotentes (*stem cells*) na medula óssea por um processo de maturação chamado eritropoiese. O eritrócito maduro humano é uma célula simples, que vive aproximadamente 120 dias na circulação periférica, são discos bicôncavos com aproximadamente 7.2 μm de diâmetro, 1.5 a 2.5 μm de espessura, com um volume médio de 90 fL, (SCHWABBAUER,

1998) e possui flexibilidade fisiológica notável (DACIE & LEWIS, 1995). Desprovidos de núcleo, mitocôndrias e ribossomos, são incapazes de biossintetizar proteínas e por isso dependem principalmente da glicólise anaeróbica para suprir as suas necessidades energéticas (BURTIS e ASHWOOD, 1998).

Os eritrócitos possuem funções vitais de transporte de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2), e tamponamento de íons hidrogênio (H^+) (HARVEY, 1997). A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular, com estrutura quaternária, formada por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo α e duas do tipo β . A cada uma dessas cadeias está coordenado um grupo heme, com um átomo de ferro em estado ferroso (Fe^{2+}). O transporte de O_2 nos eritrócitos é realizado pela Hb e depende da presença do ferro nesta molécula. O ferro está presente em várias proteínas e enzimas, sendo essencial para a síntese do ácido desoxirribonucléico, transporte de elétrons na respiração celular e várias outras reações metabólicas (ALENCAR et al., 2002; ATANASIU et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007; DUNN et al., 2007).

O metabolismo eritrocitário é inteiramente dependente do catabolismo da glicose. A entrada dessa molécula para o meio intracelular ocorre por intermédio de transportadores de membrana tipo GLUT1, independentes de insulina (CIMEN, 2008). Mais de 95% da glicose consumida pelo eritrócito é metabolizada através da via de Embden-Meyerhof ou glicólise anaeróbica, gerando adenosina-5'-trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e lactato, a partir da glucose-6-fosfato.

O ATP é necessário para a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e da morfologia eritrocitária. A energia liberada por esse composto é utilizada indiretamente para a regeneração de compostos vitais para o eritrócito, tais como glutathiona reduzida (GSH), NADH, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e adenosina-5'-monofosfato (AMP) (BEUTLER, 1994). O eritrócito é um excelente modelo experimental, dada a facilidade de sua obtenção e preservação, bem como o interesse pelos processos fisiopatológicos que nele ocorrem. A exposição de eritrócitos aos radicais livres pode levar a várias mudanças na membrana, tais como, peroxidação lipídica e oxidação da GSH celular (ROHN, 1993; EL-MISSIRY & ABOU-SEIF, 2000; DEVASENA, 2001), mudanças na morfologia celular (PRASANTHI, 2005; SICIŃSKA, 2006), e ainda os torna suscetíveis à hemólise (ZAVODNIK, 2002).

Devido à sua suscetibilidade à peroxidação, os eritrócitos estão sendo usados como um modelo para investigar a lesão oxidativa em biomembranas (ZOU, 2001; DOMANSKI, 2005). Inúmeras evidências experimentais que ligam a etiologia e/ou progressão da doença

com a liberação de hemolisinas e enzimas pelos tripanossomas que irão induzir lesões diretamente às membranas dos eritrócitos promovendo oxidação do eritrócito, formação de metahemoglobina (metaHb), fragilidade osmótica e da patologia da anemia mostrado em diversos estudos (SALEH, 2009; WOLKMER, 2009; MIJARES, 2010; RANJITHKUMAR, 2011).

1.4.2 Membrana eritrocitária

A membrana do eritrócito de mamífero é o modelo primário para estudo de membrana plasmática celular animal, pelo fato de ser desprovida de núcleo e organelas. As membranas plasmáticas de um modo geral apresentam-se como barreiras seletivas que asseguram a composição interna constante das células, por meio do controle da transferência ativa e passiva de inúmeras moléculas (MURADOR E DEFFUNE, 2007). Estas membranas têm um sistema estrutural complexo, citoesqueleto que determina a forma da célula, sua mobilidade, deformabilidade e o transporte de macromoléculas. Entre os diferentes constituintes da membrana apresentam-se receptores envolvidos em funções complexas que permitem a comunicação entre as células, reconhecimento imunológico e fenômenos de adesão celular.

A membrana eritrocitária é essencialmente constituída de lipídios e proteínas. Esta membrana consiste em uma bicamada fosfolipídica, que representa aproximadamente 50% de sua massa total, e forma a barreira entre dois compartimentos líquidos, intra e extracelular (COOPER, 1997). As trocas entre estes compartimentos são feitas através de bombas, canais de trocas de íons e transporte molecular (WAJCMAN et al., 1984). A membrana dos eritrócitos sendo rica em ácidos graxos poliinsaturados, um alvo primário para reações envolvendo os radicais livres, pode permitir que os eritrócitos fiquem vulneráveis a danos oxidativos (MAY et al., 1998; Figura 10).

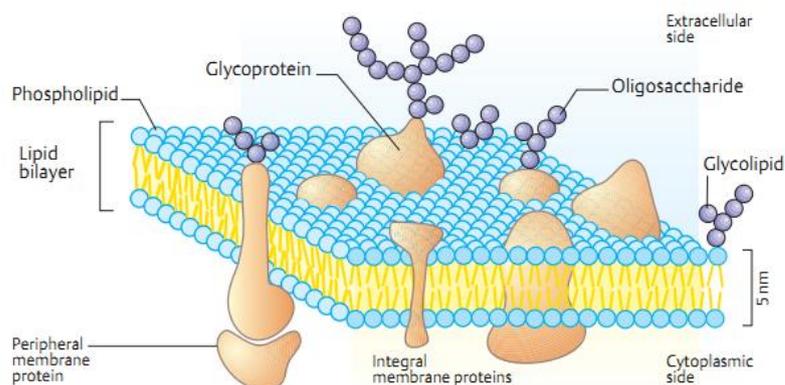


Figura 10: Esquema representativo da membrana eritrocitária e seus constituintes. Fonte: Koolman, 2005.

Os lipídios e as proteínas que constituem a membrana eritrocitária podem sofrer com a ação dos radicais livres ocorrendo oxidação de grupos sulfidrila das proteínas de membrana, formação de ligações ou aglomerados entre proteínas oxidadas, além de inibição de enzimas e sistemas de transporte de membrana, alteração da morfologia da célula (CIMEN, 2008) e também hemólise (ZOU et al., 2001). A oxidação dos lipídios tem importância particular por ser uma reação em cadeia devido à formação dos peróxidos lipídicos, com poder de oxidar outros lipídios e propagar a reação (GUTTERIDGE, 1995). Ao contrário da maioria das células, os eritrócitos de mamífero não têm capacidade de sintetizar novos lipídios e proteínas para substituir os que foram oxidados e a manutenção de níveis adequados de antioxidantes é extremamente importante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001).

A molécula de hemoglobina é uma proteína tetramérica que contém quatro grupos prostético heme, cada um associado a uma cadeia polipeptídica. A molécula de Hb contém a maior concentração de ferro do organismo um importante metal de transição, atuando como poderoso catalisador nos eritrócitos, tornando-os altamente suscetíveis a danos peroxidativos (COMPORTI, 2002). A suscetibilidade da hemoglobina oxigenada (Oxi-Hb) em se auto-oxidar está relacionada à capacidade de um elétron do ferro ligado ao grupo heme tornar-se desemparelhado. A molécula da Hb, em especial a região não polar que contém o grupo heme, necessita que o ferro esteja no estado ferroso (Fe^{2+}) para que o mesmo exerça o transporte reversível do oxigênio.

Qualquer alteração neste complexo químico que protege o grupo heme pode permitir o acesso de pequenos íons ou moléculas de água, com deslocamento de elétrons do grupo heme e, conseqüentemente, dar origem à formação de radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) desencadeando o processo de oxidação da Hb e a formação da metahemoglobina (metaHb). A liberação de

ferro é acompanhada por peroxidação lipídica, oxidação das proteínas de membrana e hemólise (COMPORTI, 2002; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; Figura 11). Eritrócitos dispõem ainda de aparelhagem metabólica necessária para transferir equivalentes redutores através de sua membrana para o meio extracelular. A atividade de oxirredutase transmembrana está relacionada à manutenção do estado redox de proteínas, e neutralização de agentes oxidantes externos (MAY, 1998).

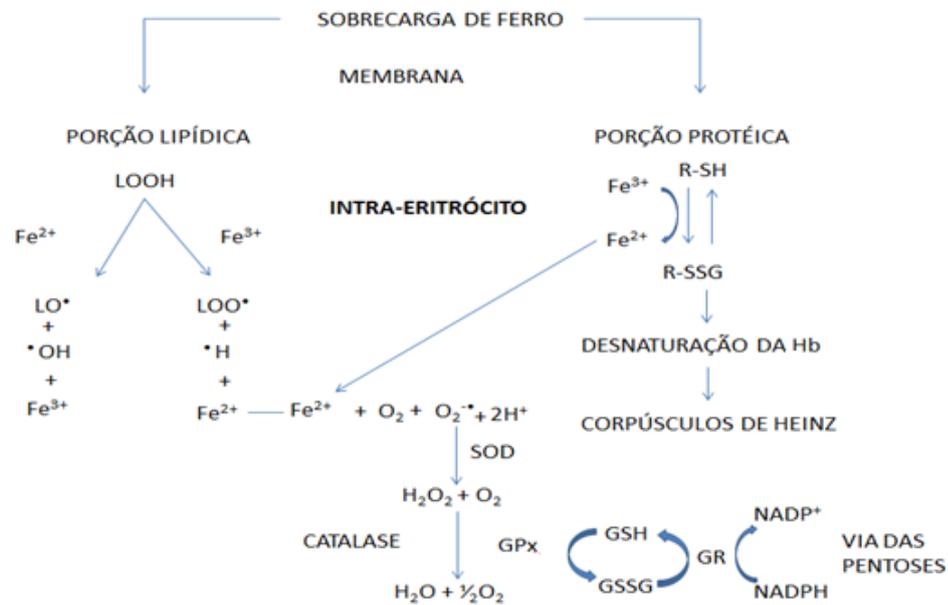


Figura 11: Mecanismo de lesão e proteção eritrocitária na sobrecarga de ferro. A hemólise poderá ocorrer se a capacidade de defesa antioxidante for superada pela capacidade oxidativa do agente. Adaptado de Winterbourn, 1990.

1.4.3 Sistema antioxidante do eritrócito

O eritrócito dispõe de aparelhagens metabólicas e estruturais especializadas para manter a hemoglobina no seu estado funcional. Desta forma, transporta grande quantidade de oxigênio de forma relativamente segura para a sua integridade, graças a um complexo sistema de detoxificação, que previne o acúmulo de radicais livres e de outras espécies altamente reativas.

O principal tampão redox do eritrócito é a glutatona (GSH), um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína, sendo esse último aminoácido portador do grupo sulfidril (SH), grupo empregado nas reações de óxidorredução nas quais a molécula participa

(STRYER,1996; LEHNINGER et al.,2002). A função da GSH é manter componentes diversos da célula em estado reduzido, especialmente proteínas e íons Fe^{2+} de grupos heme. O mecanismo redox de remoção de peróxidos e de outros derivados reativos do O_2 envolve a oxidação da GSH, gerando o dímero denominado glutatona oxidada (GSSG).

A GSH é o antioxidante não enzimático mais importante envolvido na defesa celular eritrocitária, apresentando altas concentrações intracelulares em todos os organismos aeróbicos (0,1 a 10mM) (WILHELM FILHO et al., 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001). A relação GSH/GSSG é um determinante crítico para as células, sendo a GSH um indicador sensível de função e viabilidade celular (Figura 12). Além de atuar diretamente contra espécies químicas reativas, também é o substrato de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase e glutatona-s-transferase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; PASTORE et al., 2003).

A glutatona peroxidase (GPx) atua na remoção de hidroperóxidos (ROOH) formando água e glutatona oxidada (GSSG). Esta enzima é específica quanto ao doador de hidrogênio (GSH), mas pode reduzir vários hidroperóxidos orgânicos, inclusive hidroperóxidos lipídicos (TAN et al., 1986; NIKI, 2004). São bastante particulares no que se refere à sua constituição, pois incorporam um resíduo de selenocisteína no seu sítio ativo. A GPx opera em conjunto com a glutatona redutase (GR) que é a enzima responsável pela regeneração da glutatona reduzida (GSH) de sua forma oxidada (GSSG), utilizando NADPH como fonte de elétrons, e desta forma, promove a manutenção das concentrações ideais desse tripeptídeo mantendo o status redox celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; PASTORE et al., 2003). O NADPH é gerado em uma via alternativa do metabolismo da glicose, o ciclo das pentoses fosfato ou via das hexoses monofosfato.

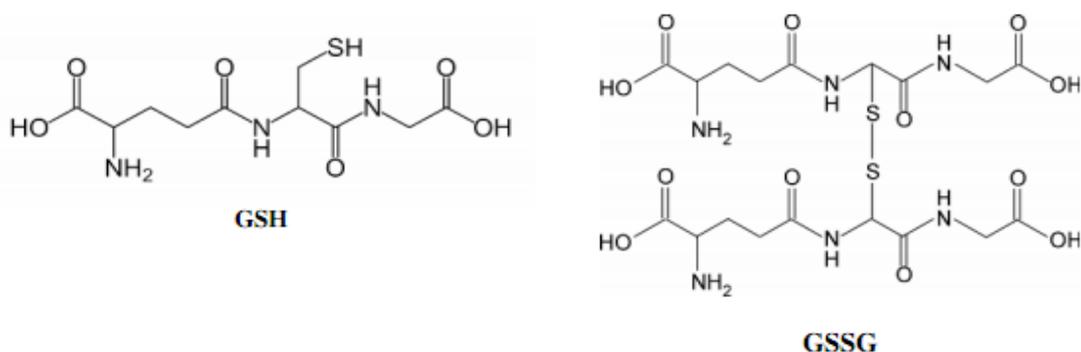


Figura 12: Estruturas da glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Fonte: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/image:glutathione-skeletal.png>> Acesso em novembro de 2011.

A glutathione transferase (GST), também conhecida historicamente como glutathione-S-transferase, faz parte de uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico. A enzima GST metaboliza hidroperóxidos orgânicos, pois participa da biotransformação de xenobióticos, conjugando a GSH a esses compostos, conferindo menor reatividade e maior solubilidade para sua excreção renal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; CIMEN, 2008).

A enzima superóxido dismutase (SOD), é específica na remoção do radical $O_2^{\cdot-}$, catalisa a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 que por sua vez é degradado pela ação da enzima catalase, que coopera com a GPx na remoção de hidroperóxidos. A catalase (CAT) apresenta quatro subunidades, cada uma contendo um grupamento Fe^{3+} – protoporfirina, ligado ao seu sítio ativo (WIEACKER et al., 1980), localiza-se principalmente nos peroxissomas da célula e é responsável pela detoxificação específica do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, o qual resulta da dismutação do ânion radical superóxido ou é gerado por enzimas oxidases (STOCKER & KEANEY-Jr, 2004; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) desempenha um papel de fundamental importância no metabolismo eritrocitário, tanto na obtenção de energia a partir da glicose, quanto na sua proteção contra agentes oxidantes. A G6PD catalisa a primeira reação da via da hexose monofosfato na qual a glicose-6-fosfato é oxidada a 6-fosfogluconolactona com a redução concomitante de NADP a NADPH. Portanto, é essencial na proteção do eritrócito contra a ação de oxidantes por manter a glutathione no estado reduzido (BEUTLER, 1994).

O dano oxidativo, no entanto, pode acentuar-se quando o potencial antioxidante é diminuído e/ou quando o estresse oxidativo é elevado. A infecção por um tripanossomatídeo provoca elevação do estresse oxidativo, o que contribui para o dano celular (JAHANGIRI, 2006). Devido à sua capacidade de alterar funções fisiológicas em seus hospedeiros, e interferir em diversas funções celulares, bem como aos prejuízos financeiros atrelados à tripanossomose causada por *T. evansi*, a doença merece ser mais profundamente estudada e seus mecanismos de agressão completamente elucidados, já que no Brasil há casos de tripanossomose por *T. evansi* em vários estados, inclusive em Santa Catarina, podendo existir casos não identificados em outros estados, uma vez que a patologia apresentada tem sinais clínicos às vezes desconhecidos pelos profissionais de saúde. Desta forma será possível o desenvolvimento de novas estratégias para melhorar o diagnóstico, o tratamento e a prevenção da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o estresse oxidativo e parâmetros hematológicos *in vivo* de ratos infectados experimentalmente com *T. evansi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o hemograma, contagem de reticulócitos (RET) e plaquetas, analisar os níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT), contagem total e diferencial de leucócitos em animais infectados e não infectados pelo *T. evansi*.

- Mensurar os níveis de metahemoglobina, ferro sérico e glicose plasmática em animais infectados e não infectados pelo *T. evansi*.

- Determinar as atividades das enzimas antioxidantes intraeritrocitárias, como glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), glutatona-S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e catalase (CAT), nos animais infectados e não infectados por *T. evansi*.

- Quantificar os níveis de glutatona (total e oxidada), grupos tióis protéicos (PSH) e não-protéicos (NPSH), presentes respectivamente, no sangue e no plasma, desses animais.

- Avaliar indicadores de estresse oxidativo como proteínas carboniladas, peróxidos totais e hidroperóxidos lipídicos em animais infectados e não infectados pelo *T. evansi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA PESQUISA

Este estudo envolvendo animais foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado de Santa Catarina, de acordo com a Lei No. 11.794 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, com aprovação pelo protocolo nº 1.42.10 (Anexo A). O experimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores, no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV/UEDESC/Lages – SC), com o apoio do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, localizado no Hospital de Clínica Veterinária Prof. Lauro Ribas Zimmer.

3.2 AMOSTRA DE *T. evansi*

A amostra de *T. evansi* usada no experimento foi cedida gentilmente pela Profª Dra. Silvia Gonzalez Monteiro, da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Essa amostra foi inoculada em um rato Wistar macho, visando a replicação do agente utilizado na infecção dos animais do experimento.

3.3 GRUPO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 75 ratos Wistar machos, com aproximadamente ± 220 g, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Agroveterinárias, CAV- UEDESC. Os ratos foram mantidos no biotério, em gaiolas coletivas em número de 5 animais/caixa, em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 h. Os animais foram aclimatados durante um período de 48 h. Todos os animais receberam água e ração à vontade durante o período de experimentação.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A amostra de sangue contendo 1×10^3 tripomastigotas foram inoculados nos ratos por via intraperitoneal no dia 1. O controle da parasitemia foi realizado por meio da análise de esfregaços sanguíneos diários, coletados da cauda do animal. A contagem dos parasitas foi avaliada a cada 12h após a inoculação, através da pesquisa microscópica do esfregaço de

sangue periférico. As lâminas foram coradas com corante hematológico rápido e observadas em microscópio óptico de luz no aumento de 1.000 vezes, estipulando a média de tripanossomas em dez campos homogêneos (considerando a distribuição dos eritrócitos).

Foram constituídos 05 grupos de 15 animais por grupo, sendo assim denominados:

Grupo A - ratos não infectados com o parasita *T. evansi* (grupo controle) inoculados com solução salina.

Grupo B - ratos infectados que apresentavam um grau de parasitemia entre 1-10 tripanossomas/campo.

Grupo C - ratos com 11-30 tripanossomas/campo.

Grupo D - ratos com 31-60 tripanossomas/campo.

Grupo E - ratos com mais de 61 tripanossomas/campo.

Quando os animais apresentaram o número de protozoários por campo equivalente ao grupo, foram anestesiados com xilazina 2% de quetamina 50mg/mL, 0,25ml de cada anestésico aplicados via intramuscular. Após perda de consciência dos animais, e ausência de reflexo a estímulos (pinçamento interdigital e caudal) foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue do ventrículo direito de cada animal de todos os grupos, sendo 2 mL com ácido-etilenodiaminotetracético dissódico a 10% (EDTA) para realização de exames hematológicos, 2 mL com ácido-etilenodiaminotetracético fluoreto de sódio (EDTA-fluoreto) para a dosagem da glicose plasmática, 4 mL com heparina para mensuração das atividades enzimáticas, e 2mL sem anticoagulante para separação do soro e realização dos exames bioquímicos.

A preparação das amostras para análise da fragilidade osmótica, metaHb, níveis de GSH e GSSG, conteúdo de Hb e TBARS foi realizada imediatamente após a coleta, enquanto que para os demais parâmetros, as amostras foram congeladas a -80 °C para análise posterior. Para a determinação dos tióis protéicos e não-protéicos, aproximadamente 300 uL de plasma foram homogeneizados com ácido tricloroacético 10% (1:1), centrifugados a 15.000 x g por 2 minutos (4°C), e o extrato ácido foi utilizado para as determinações. No caso da GSSG, aproximadamente 300 uL de sangue foram homogeneizados em 0,8 mL N-etilmaleimida (NEM) 6,25 mM, centrifugados a 15.000 x g por 2 minutos (4°C), neutralizados para pH 6 a 7 com KOH-MOPS e adicionados 5 mL de diclorometano para a remoção de NEM, que poderia interferir no ensaio enzimático. A quantificação de GSSG foi realizada a partir da fase aquosa.

3.5 PREPARAÇÃO DO HEMOLISADO

Amostras de sangue foram centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos a 4°C. O plasma e o *buffy coat* foram removidos por aspiração. O pellet contendo as células vermelhas foi lavado três vezes com tampão fosfato salino (4°C), e em seguida, foi realizada nova centrifugação e remoção do sobrenadante, como previamente descrito por Backwell (1965).

4. ANÁLISES

4.1 EXAMES HEMATOLÓGICOS

As contagens totais de células (eritrócitos e leucócitos) foram realizadas pelo método manual de contagem em hemocítmetro. Volume globular (VG) corresponde à porcentagem de hemácias presentes no sangue e sua determinação foi realizada através da técnica de microhematócrito. Para a dosagem de Hb, utilizou-se a absorvidade em 540 nm da forma ciano-metHb ($\epsilon = 44.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e os valores foram expressos em g/dl. Também foram analisados os índices eritrocimétricos absolutos: volume globular médio (VGM), e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados usando a fórmula padrão (SCHALM et al, 1975). A contagem de plaquetas foi feita em esfregaços sanguíneos corados usando-se o corante de Romanowsky, contando 10 campos. Proteínas plasmáticas totais (PPT) foram mensuradas por meio de refratometria e expressos em g/dL. O valor de reticulócitos (RET) foi obtido pela observação de um esfregaço sanguíneo realizado após 15 minutos de incubação em banho-maria 37°C, de uma amostra contendo 100 μL de sangue e 100 μL de azul de metileno. O valor de reticulócitos foi expresso em % de eritrócitos. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos contando 100 células em microscopia óptica de luz.

4.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

4.2.1 Fragilidade osmótica eritrocitária

A avaliação da fragilidade osmótica eritrocitária foi determinada em concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl) pH 7,4, determinando-se a porcentagem de hemólise em cada concentração segundo Jain (1986). O resultado deste teste expressa a concentração de

NaCl correspondente a 50% de hemólise (FOE_{50%}), calculado a partir da curva dos percentuais de hemólise nas concentrações, ajustada por um modelo linear generalizado para as proporções com função de ligação probito (McCULLOCH & SEARLE, 2001).

4.2.2 Metahemoglobina

A concentração de metaHb foi determinada de acordo com Evelyn e Malloy (1938). Foram adicionados 25 µL de sangue total heparinizado em tampão fosfato 16 mM pH 6,6, e a absorbância foi mensurada em 630 nm. Em seguida adicionou-se 10 µL de uma solução de cianeto neutralizado e realizou-se a segunda leitura. O lisado foi então diluído em tampão fosfato 66 mM e adicionado 10 µL de ferrocianeto de potássio e cianeto de sódio. A absorbância foi medida em 540nm. A concentração de metahemoglobina foi expressa em porcentagem do total de Hb.

4.2.3 Glicose plasmática e ferro sérico

Para a determinação dos níveis de glicose plasmática e ferro sérico, foram utilizados kits comerciais da marca (Labtest, Minas Gerais, Brasil), e mensurado conforme recomendações do fabricante.

4.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

Os ensaios enzimáticos foram realizados em volume final de 500 µL de hemolisado, com exceção da atividade da catalase, cujo volume final foi de 1 mL. Utilizou-se 5-100 µL de amostra, dependendo do parâmetro necessário.

4.3.1 Glutaciona redutase (GR)

Ao utilizar o substrato GSSG, a enzima GR leva ao consumo de NADPH, o qual foi acompanhado em 340nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (CARLBERG & MANNERVIK, 1985). Desta velocidade foi descontada a reação basal de consumo de NAPDH obtida pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (GSSG). O ensaio enzimático de 5

minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH. Como substrato iniciador foi utilizado 1 mM GSSG.

4.3.2 Glutaciona peroxidase total (GPx)

Foi acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH. A enzima GPx, ao utilizar GSH para degradar um peróxido orgânico, como o peróxido de t-butil (t-BOOH) ou de cumeno, gera glutaciona oxidada (GSSG) que, por sua vez, é reduzida pela glutaciona redutase, adicionada ao meio de reação, com o consumo de NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Este consumo de NADPH foi acompanhado espectrofotometricamente em 340nm (WENDEL, 1981). Desta velocidade de consumo foi descontado o consumo basal de NADPH obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (peróxido). O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em hemolisado com tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 que continha 0,2 mM de NADPH, 1 mM GSH e 0,2 U/mL de GR purificada de levedura. Foram necessários 5-10 minutos de incubação com os reagentes (exceto substrato iniciador) para a ativação da enzima. Como substrato iniciador foi utilizado 1 mM de CuOOH.

4.3.3 Glutaciona-S-transferase (GST)

A conjugação de GSH com o substrato clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (HABIG & JAKOBY, 1981). Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em hemolisado com tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 1 mM GSH. Como substrato iniciador utilizou-se 1 mM de CDNB. A absorvância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra.

4.3.4 Glicose- 6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase, o NADPH é formado a partir de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP^+) e, desta forma, o aumento da

absorbância foi medida em 340nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (GLOCK & MC, 1953). Foi descontada da reação a atividade basal obtida pela formação de NADPH pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão TRIS/HCL 50 mM, pH 7,4 contendo 0,127 mM de NADP^+ e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2). Como substrato iniciador foi utilizado 1,5 mM de glicose-6-fosfato (G6P). A absorbância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência de G6P.

4.3.5 Catalase (CAT)

A alta velocidade de reação desta enzima, associada a uma baixa afinidade, permite a determinação de sua atividade com concentrações elevadas de H_2O_2 (10 mM). A atividade da enzima catalase foi determinada pela velocidade de consumo da H_2O_2 no primeiro minuto da reação, 240nm ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (AEBI, 1984). Foi descontado o desaparecimento do peróxido de hidrogênio sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 60 segundos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,012% de Triton X-100. Como substrato iniciador foi utilizado 10 mM de H_2O_2 . A absorbância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra.

4.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS

4.4.1 Glutathiona total (GSH-t) e oxidada (GSSG).

Para determinar a glutathiona total (GSH-t) o método enzimático de Tietze, modificado por Akerboom e Sies (1981) foi empregado. Para a determinação de glutathiona oxidada (GSSG) é necessário evitar a oxidação de GSH durante o processamento das amostras, o que pode levar a uma produção artefactual de GSSG. Para isso foi empregado NEM para bloquear a GSH, evitando, assim, sua oxidação e interferências nos valores de GSSG. O ensaio enzimático de 2 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0, contendo 0,2 mM de NADPH e 0,1 mM de DTNB. Como iniciador da reação foi utilizado GR 0,25 U/ml. A absorbância basal foi descontada a partir da leitura do consumo basal de NADPH do ensaio na ausência de amostra. As quantificações dos níveis de GSH-t e

GSSG foram baseadas a partir de uma curva padrão com GSSG realizada no momento da leitura.

4.4.2 Grupos tióis protéicos (PSH) e não-protéicos (NPSH) plasmáticos

Para a análise dos níveis de NPSH, 100 μL do extrato ácido foi adicionado a 400 μL de tampão na concentração final TRIS/HCl 0,5 M, DNTB 0,2mM, pH 8,0. Para o PSH, a fração particulada da amostra foi acidificada com PCA 0,5 M e diluída em 1 mL de TRIS/HCl 0,5 M, pH 8,0, SDS 1%. Uma alíquota da amostra foi adicionada ao meio de reação contendo 500 μL de TRIS/HCl 0,5 M, pH 8,0, SDS 1% e DTNB 0,2 mM. Tanto para NPSH quanto para PSH do plasma, o desenvolvimento de cor ocorreu pela reação dos grupos tióis com DTNB, e conseqüentemente, liberação de TNB, a qual pôde ser medida fotometricamente em 412 nm ($\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (ELLMAN, 1959). Paralelamente, as amostras também foram preparadas na ausência de DTNB, para descontar a absorbância basal da amostra.

4.5 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

4.5.1 Peróxidos totais e lipídicos

A quantificação dos níveis de peróxidos totais no hemolisado de ratos infectados com *T. evansi* foi realizada a partir do método de PCA-FOX (GAY & GEBICKI, 2002). A presença de peróxidos leva à redução do íon Fe^{2+} a Fe^{3+} , o qual reage com o sal *xylenol orange*, gerando uma cor característica (laranja/marrom), a qual pode ser medida fotometricamente em 560 nm. O ensaio é realizado em ácido perclórico (PCA) 110 mM, contendo *xylenol orange* 0,25 mM e sulfato ferroso amoniacal 0,25 mM. A quantificação dos níveis de peróxidos foi realizada a partir da comparação com uma curva-padrão de peróxido de cumeno.

Os produtos finais da peroxidação lipídica foram estimados pelo método de TBARS, como um índice de peroxidação lipídica (DRAPER et al., 1990), com algumas modificações. Para avaliar o MDA formado após a indução da lipoperoxidação, uma alíquota (100 μL) de papa de eritrócitos foi adicionada em 800 μL de PBS e 100 μL de terc-butil hidroperóxido (10 mM), incubados a 37 °C por 60 min. Em ambos, foi mensurada a concentração de Hb, antes da incubação para o MDA estimulado. Em seguida, 1 mL de ácido tricloroacético a 28 % foi

adicionado a cada tubo de ambos os testes, agitou-se e centrifugou-se a 1000 x g por 15 min. Do sobrenadante obtido, retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi acrescida de 100 µL de hidroxitolueno butilado (BHT), 500 µL de TBA a 1 % em solução de NaOH 0,05 M e 500 µL de HCl a 25 % e incubados a 95 °C por 15 min. O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção do branco e do padrão, porém nestes, a amostra foi substituída por água deionizada e 1 µM de MDA, respectivamente. Após resfriamento em banho de gelo adicionaram-se 2 mL de n-butanol, agitou-se e centrifugou-se a 1000 g por 15 min. A reação de MDA com TBA produz um cromóforo que pode ser medido fotometricamente a 532 nm, sendo o resultado expresso em nmol MDA/gHb.

4.5.2 Proteína carbonilada plasmática

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado pelo método descrito por Levine et al., (1994). Inicialmente foram adicionados 100 µL do plasma em 600 µL de DNPH (2,4-dinitro fenil hidrazina), seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, protegido da luz, com agitação a cada 15 min. Em seguida, foi adicionado 600 µL de TCA 20 %, com agitação e banho de gelo durante 10 min, seguido de centrifugação (5 min a 800 x g). O *pellet* foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 800 x g), com 600 µL de etanol-acetato de etila. Finalmente, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados de 500 µL de guanidina, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C por 60 min, para posteriormente proceder à leitura a 360 nm ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol/mg⁻¹.

4.6 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA

As proteínas das amostras foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976). Este método baseia-se na ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue /G-250) com moléculas de proteínas da amostra, formando um complexo de cor azul. A concentração de proteína nas amostras foi determinada com base em curva de calibração obtida de concentrações conhecidas de BSA (soroalbumina bovina), e em leitura espectrofotométrica a 595nm.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m), e apresentadas como as médias aritméticas acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança (IC) em nível mínimo de 0,05%. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer, quando indicado. Teste *t* de Student não-pareado foi empregado quando necessário. Valores de *p* menores que 5% foram considerados indicativos de significância. A análise estatística foi realizada através do software Graph Pad Prism® versão 5.00.

6. RESULTADOS

6.1 PARASITEMIA E CURSO DA INFECÇÃO

O *T. evansi* foi detectado no sangue periférico 3 dias após a inoculação intraperitoneal do parasita. O grau de parasitemia aumentou progressivamente, e em 15 dias após a inoculação, todos os grupos já haviam sido constituídos. Sinais clínicos como tremores e paralisia dos membros posteriores foram observados em alguns ratos do grupo E (mais de 60 tripanossomas/campo). Um animal do grupo D morreu durante o período experimental. O grupo A (controle) manteve-se clinicamente saudável durante o período experimental.

6.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A média dos valores dos parâmetros hematológicos do grupo controle e dos grupos infectados está presente na Tabela 1. Houve uma significativa redução ($p < 0,05$) na contagem dos eritrócitos do grupo E em relação ao grupo controle (grupo A). O VG observado nos grupos D e E foi significativamente reduzido quando comparado ao grupo A ($p < 0,001$). Também ocorreu diminuição na concentração de Hb e CHCM nos grupos C, D e E ($p < 0,05$). Entretanto, não houve alteração significativa no VGM. Na contagem de reticulócitos houve um aumento nos grupos B e C ($p < 0,05$) em relação ao grupo A. No entanto, houve uma diminuição no grupo E ($p < 0,05$), respectivamente. Na contagem de plaquetas foi observada uma queda significativa ($p < 0,001$) em todos os grupos infectados, quando comparada com o grupo A, caracterizando uma trombocitopenia. O nível de plaquetas manteve-se baixo durante todo o estágio evolutivo da doença. Em relação às proteínas plasmáticas totais (PPT), não foram encontradas diferenças significativas, quando comparadas com o grupo A.

Tabela 1: Contagem de eritrócitos, volume globular, (VG) dosagem de hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas, proteínas plasmáticas totais (PPT) e reticulócitos (RET) obtidos de ratos experimentalmente infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por $^*(p<0,05)$, $^{**}(p<0,01)$ e $^{***}(p<0,001)$, em comparação ao grupo controle (A).

Parâmetros	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μl)	7,13±0,36	7,02±0,36	7,35±0,35	6,18±0,44	5,90±0,27 [*]
VG (%)	44,40±1,62	44,13±1,82	42,82±1,34	37,13±1,21 ^{**}	37,42±0,85 ^{**}
Hb (g/dl)	13,35±0,55	10,47±1,53	8,65±0,99 [*]	8,40±0,66 [*]	5,87±0,25 [*]
VGM (fL)	62,76±2,83	66,91±2,21	66,90±3,75	61,78±3,10	64,06±2,82
CHCM (%)	30,16±1,03	24,34±2,34	20,04±1,93 [*]	22,29±1,91 [*]	15,66±0,43 [*]
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	844,10±58,01	718±106,40 ^{***}	366±53,65 ^{***}	158±46,60 ^{***}	145,40±21,24 ^{***}
PPT (g/dL)	6,56±0,25	6,57±0,12	6,88±0,12	6,40±0,09	6,65±0,20
RET (/μl)	289,0±44,32	458,10±64,42 [*]	476,90±66,56 [*]	204,90±50,49	105,50±18,52 [*]

Na contagem diferencial de leucócitos mostrada na Tabela 2, não foi observada diferença significativa nos valores médios em nenhum dos grupos infectados com *T. evansi*, quando comparada ao controle.

Tabela 2: Contagem diferencial de leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos obtidos de ratos experimentalmente infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por $^*(p<0,05)$, $^{**}(p<0,01)$ e $^{***}(p<0,001)$, em comparação ao grupo controle (A).

Parâmetros	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Leucócitos (x 10 ³ /μl)	7,525±0,75	7,213±0,99	7,491±1,20	8,600±1,43	8,850±0,85
Bastonetes (/μl)	12,70±8,46	0,00±0,00	22,00±11,48	0,00±0,00	8,90±8,90
Segmentados (/μl)	1,866±0,22	1,726±0,33	1,207±0,15	1,333±0,19	1,948±0,28
Linfócitos (/μl)	4,918±0,41	5,113±0,93	5,669±1,04	6,629±1,12	6,021±0,57
Eosinófilos (/μl)	39,70±18,14	34,63±15,33	32,64±17,74	21,00±14,66	61,25±34,52
Basófilos (/μl)	23,50±12,39	14,50±14,50	27,73±15,07	67,00±34,98	54,75±29,62
Monócitos (/μl)	370,70±49,20	324,60±99,30	442,50±99,61	560,00±99,30	757,30±43,6

6.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

6.3.1 Fragilidade osmótica eritrocitária

A fragilidade osmótica eritrocitária do grupo controle e grupos infectados com *T. evansi* são apresentados na Figura 13. A concentração de NaCl observada em FOE_{50%} de hemólise foi significativamente aumentada nos grupos D (48,19±0,73) e E (49,86±0,73), quando comparada ao grupo A (44,25±0,51).

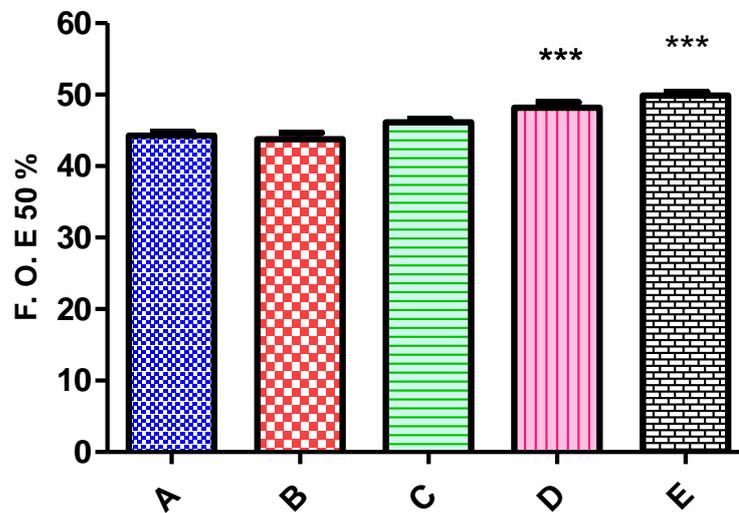


Figura 13: Fragilidade osmótica eritrocitária de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média ± e.p.m ($n=15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por *** ($p<0,001$), em comparação ao grupo controle (A).

6.3.2 Formação de metahemoglobina

A figura 14 apresenta a formação de metaHb (%) em eritrócitos. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo D ($85,87 \pm 11,45$) e grupo E ($97,29 \pm 9,99$) quando comparada aos valores do grupo A ($25,94 \pm 5,37$).

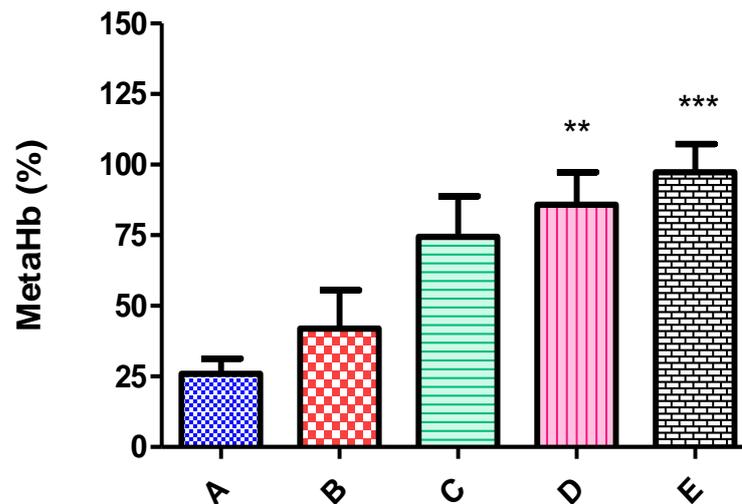


Figura 14: Porcentagem de Metahemoglobina (MetaHb) no sangue de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$), em comparação ao grupo controle (A).

6.3.3 Concentração de glicose plasmática

A concentração de glicose plasmática foi significativamente menor no grupo E ($61,49 \pm 18,43$), quando comparada ao do grupo A ($170,90 \pm 7,17$).

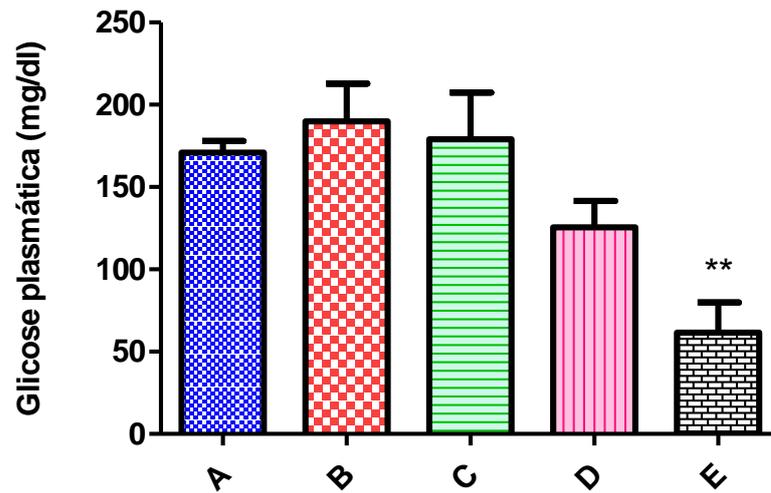


Figura 15: Concentração de glicose plasmática de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por ** ($p<0,01$), em comparação ao grupo controle (A).

6.3.4 Concentração de ferro sérico

A concentração de ferro sérico foi significativamente menor no grupo B ($114,40 \pm 10,83$), e em contraste houve um aumento significativo no grupo E ($487,20 \pm 43,40$) quando comparada ao grupo A ($274,20 \pm 19,10$).

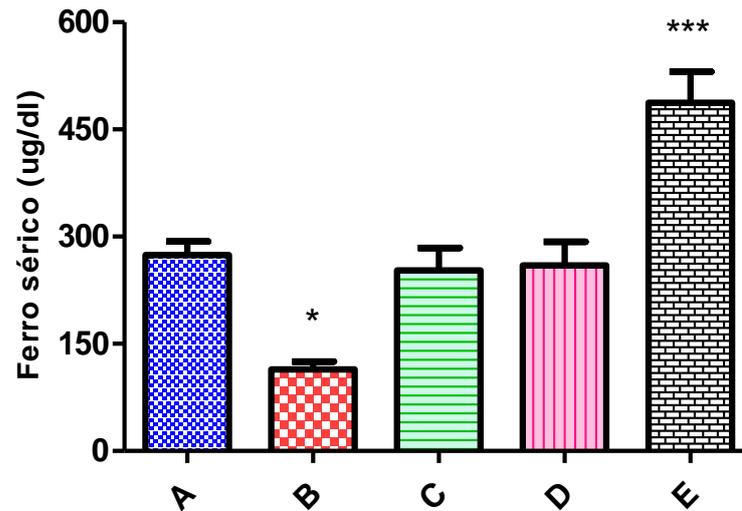


Figura 16: Concentração de ferro sérico de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n=15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$), em comparação ao grupo controle (A).

6.4 DETERMINAÇÕES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

6.4.1 Atividade da Glutathiona Redutase

A atividade da GR (Figura 17) foi diminuída após a infecção no grupo E ($37,79 \pm 5,68$), quando comparada a do grupo A ($79,48 \pm 6,30$).

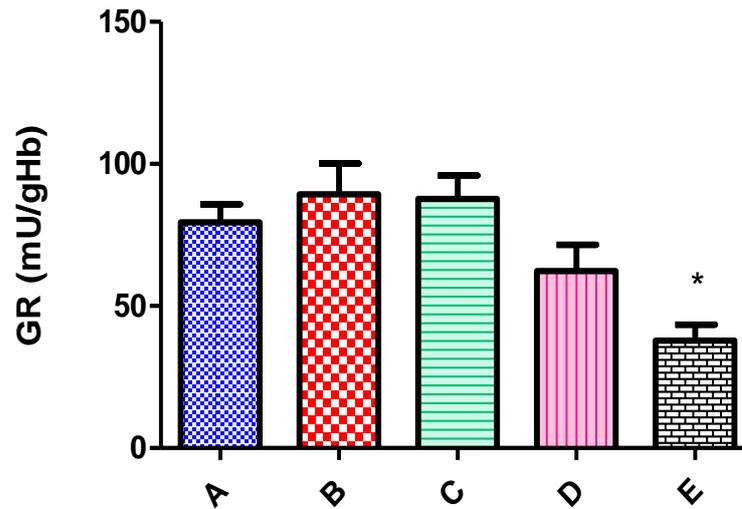


Figura 17: Atividade da GR no hemolisado de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por * ($p<0,05$), em comparação ao grupo controle (A).

6.4.2 Atividade da Glutathiona Peroxidase

Conforme esperado, a atividade da GPx (Figura 18) foi aumentada após a infecção nos grupos C ($837,50 \pm 131,20$), D ($1291,00 \pm 249,80$), e também no E ($1294,00 \pm 140,30$), em relação ao nível de atividade do grupo A ($244,90 \pm 41,64$).

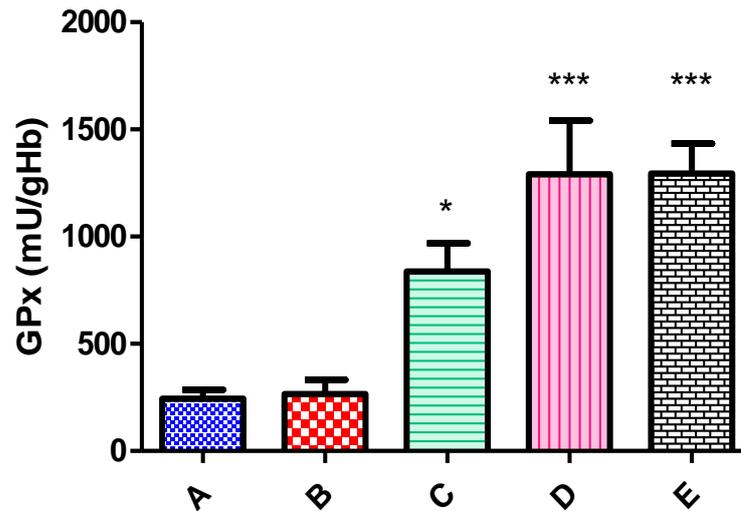


Figura 18: Atividade da GPx no hemolisado de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por * ($p<0,05$) e *** ($p<0,001$) em comparação ao grupo controle (A).

6.4.3 Atividade da Catalase

A atividade da CAT eritrocitária (Figura 19) em ratos infectados pelo *T. evansi*, utilizando o teste *t* de Student não pareado, mostrou um aumento significativo no grupo D ($61,94 \pm 7,02$), e E ($62,83 \pm 6,50$), em relação ao nível de atividade do grupo A ($37,31 \pm 1,93$).

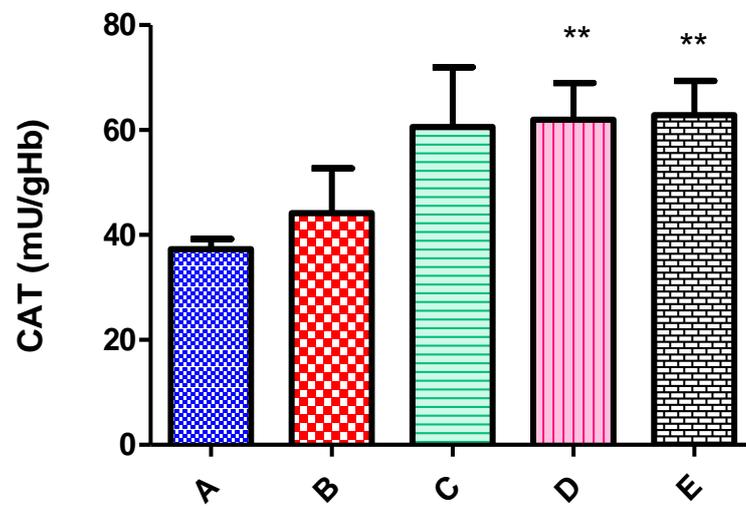


Figura 19: Atividade da CAT no hemolisado de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). O emprego do teste *t* de Student não-pareado foi realizado e a diferença estatística foi simbolizada por **($p<0,01$), em comparação ao grupo controle (A).

6.4.4 Atividade da Glutathiona-S-Transferase

A atividade da GST (Figura 20) não foi significativamente diferente após a infecção com *T. evansi* em nenhum dos grupos, em relação ao grupo A.

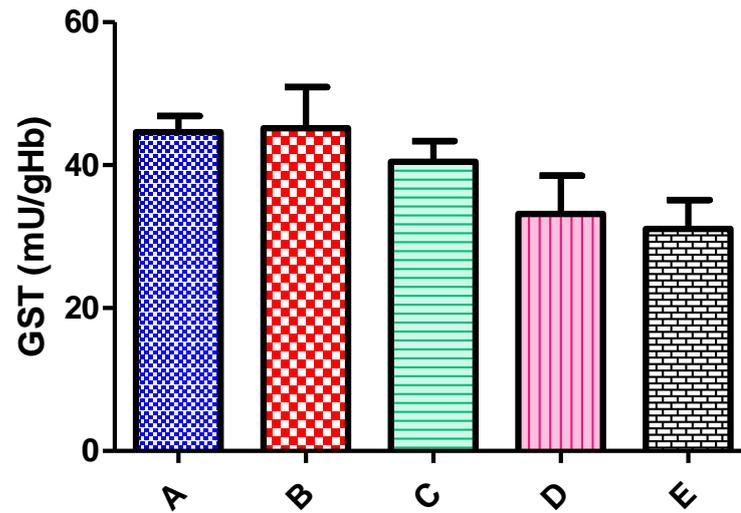


Figura 20: Atividade da GST no hemolisado de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos).

6.4.5 Atividade da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

Não foram encontradas diferenças significativas na atividade da G6PD (Figura 21), em nenhum dos grupos infectados, quando comparada ao grupo A.

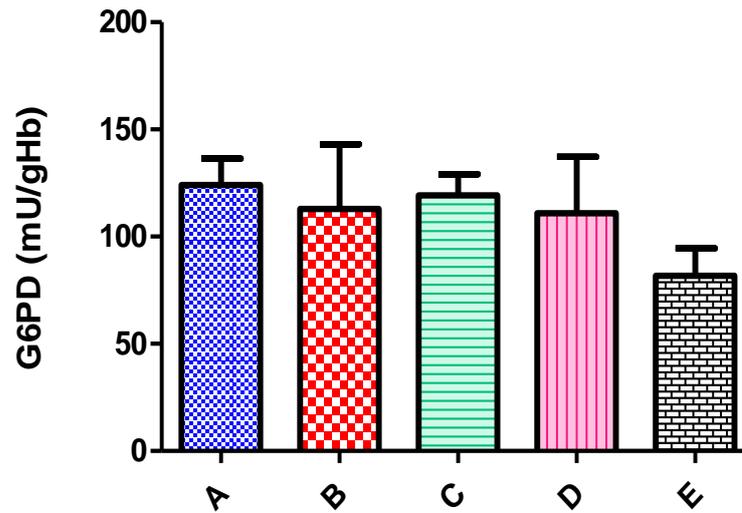


Figura 21: Atividade da G6PD no hemolisado de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n=15$ ratos).

6.5 DETERMINAÇÕES DOS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

6.5.1 Níveis de Glutathiona total (GSH-t) e oxidada (GSSG).

A infecção aguda ocasionada pelo *T. evansi* causou depleção dos níveis de GSH-t eritrocitária (Figura 22a) em animais infectados do grupo E ($4,29 \pm 0,79$) em comparação com o grupo A ($8,24 \pm 0,24$). Não foi observada diferença significativa na GSSG entre os grupos infectados em relação ao grupo A (Figura 22b).

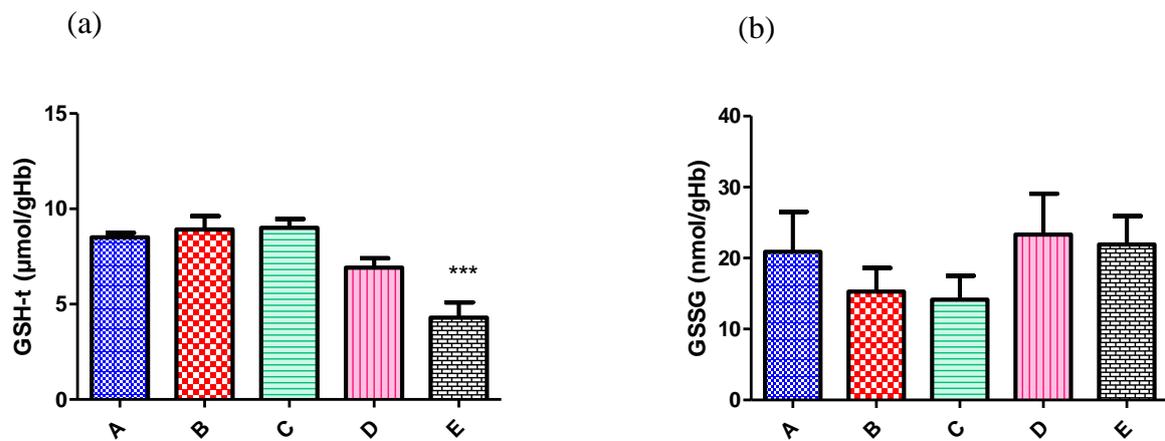


Figura 22: Níveis de GSH-t (a) e GSSG (b) no sangue total de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n=15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por *** ($p < 0,001$), em comparação ao grupo controle (A).

6.5.2 Níveis dos grupos tióis protéicos (PSH) não-protéicos (NPSH)

Os níveis de PSH foram reduzidos em todos os grupos infectados com *T. evansi*, em comparação com o grupo A ($0,07 \pm 0,01$) (Figura 23a). Com relação aos níveis de NPSH, foi observada diminuição significativa no grupo E ($0,16 \pm 0,02$), comparada com o grupo A ($0,40 \pm 0,05$) (Figura 23b).

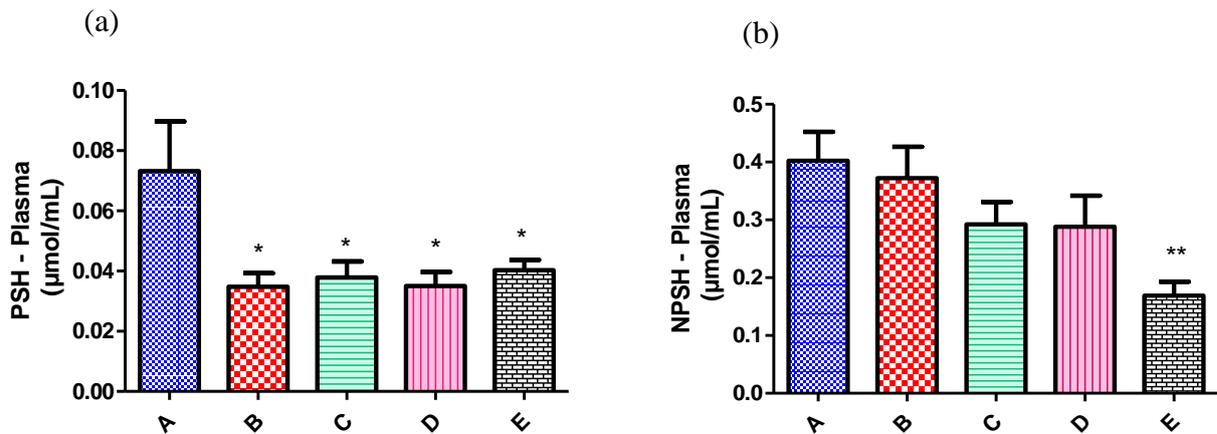


Figura 23: Níveis de tióis protéicos (PSH) (a) e não-protéicos (NPSH) (b) no plasma de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$), em comparação ao grupo controle (A).

6.6 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DE DANO OXIDATIVO

6.6.1 Níveis de peróxidos totais e lipídicos

A fim de quantificar o dano celular causado pelo *T. evansi*, analisou-se os níveis totais de peróxidos, determinados pelo método PCA-FOX, enquanto a lipoperoxidação foi medida através do método de MDA. Os níveis de peroxidação lipídica aumentaram nos grupos D e E após infecção em relação ao grupo A (Figura 24a). Os resultados demonstram que os níveis de peróxidos totais aumentaram nos grupos C, D e E após infecção (Figura 24b), de modo similar ao observado na Figura 24a.

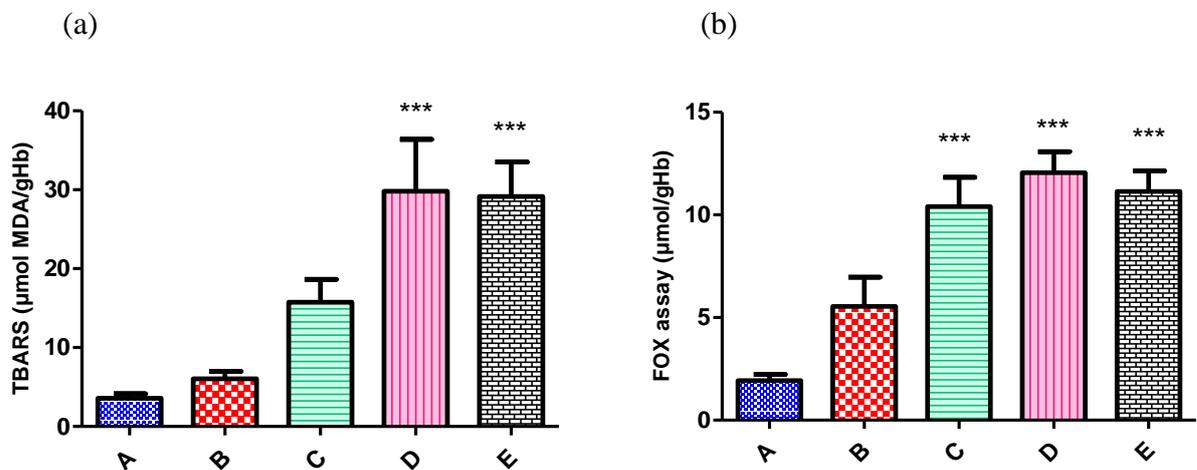


Figura 24: Níveis de peroxidação lipídica (a) e de peróxidos totais (b) no sangue de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por *** ($p<0,001$), em comparação ao grupo controle (A).

6.6.2 Concentração de proteína carbonilada

Os níveis de dano protéico promovido pela infecção pelo *T. evansi* foram aumentados significativamente nos grupos D ($37,26 \pm 7,35$) e E ($36,16 \pm 2,23$) quando comparados com os obtidos no grupo A ($18,98 \pm 2,94$).

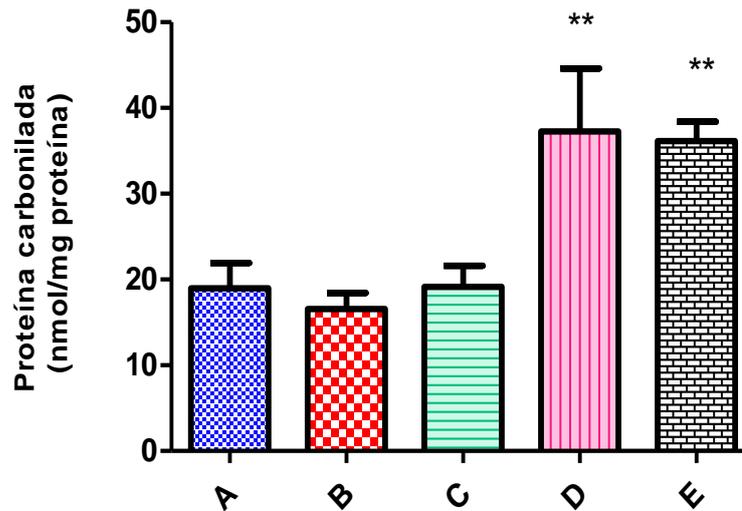


Figura 25: Níveis de proteína carbonilada no plasma de ratos infectados com *T. evansi* em diferentes estágios evolutivos de infecção. Grupo controle (A); B: 1-10 tripanossomas/campo; C: 11-30 tripanossomas/campo; D: 31-60 tripanossomas/campo; E: mais de 61. Valores representados como média \pm e.p.m ($n= 15$ ratos). A diferença estatística foi simbolizada por **($p<0.01$) em comparação ao grupo controle (A).

7. DISCUSSÃO

A cepa de *T. evansi* empregada causou infecção aguda nos animais. A detecção precoce da parasitemia em ratos (72h) foi mais curta que a reportada anteriormente em infecções com ratos experimentais (AL-MOHAMMED, 2006; OMER, 2007). Todavia, Wolkmer (2009) relatou que 24h após a infecção todos os ratos albergaram o parasita. É importante destacar que essa diferença pode ser atribuída ao padrão de virulência da cepa, diferenças entre animais, metodologia e duração do experimento.

No curso ondulante de parasitemia frequentemente é observado em animais infectados. O parasita multiplica-se no sangue periférico na fase aguda, podendo desaparecer do sangue circulante em algumas fases da doença (MARQUES, 1996; CADIOLI, 2001). Segundo Boero (1974), durante a fase de defesa do organismo, o tripomastigota localiza-se no líquido cefalorraquidiano (LCR), retornando à circulação sanguínea com alterações antigênicas que possibilitam novas fases de multiplicação. Ocultando-se no LCR, acredita-se que *T. evansi* torna-se inatingível pelo sistema imunológico (TUNTASUVAN et al., 1997). No presente estudo não foi observado essa ondulação da parasitemia, devido ao curto período de sobrevivência dos animais infectados, embora Queiroz et al. (2000), descrevesse que *R. novergicus* seja considerado um modelo adequado de estudo da onda parasitêmica causada pelo *T. evansi*.

As alterações ocorridas no quadro hematológico de animais infectados já foram objeto de estudo de outras pesquisas. Nestes trabalhos (OMER, 2007, WOLKMER, 2009), índices hematológicos dos ratos infectados diminuía ao mesmo tempo em que o grau de parasitemia aumentava, e o mesmo padrão de resposta foi observado no presente estudo. Foi observado na contagem de eritrócitos que a média dos valores foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) nos ratos do grupo E comparado com os controles (A) (Tabela 1). Também houve uma redução nas médias da concentração de Hb, no CHCM a partir de 11-30 tripanossomas/campo ($p < 0,05$) e redução do VG ($p < 0,01$) a partir de 31-60 tripanossomas/campo. No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas no VGM, caracterizando a anemia como normocítica hipocrômica em ratos infectados por *T. evansi*.

A anemia é um achado frequente na maioria das espécies acometidas por essa tripanossomose, e já foi descrita em ratos do tipo macrocítica hipocrômica e normocítica normocrômica (OMER, 2007; WOLKMER, 2009). Também já foi relatada anemia do tipo macrocítica hipocrômica em outros animais como camelos (SALEH, 2009), em cães como

microcítica hipocrômica (FRANCISCATO, 2007), e em cavalos como normocítica hipocrômica (RANJITHKUMAR, 2011).

Inúmeras hipóteses foram levantadas para explicar a origem da anemia. Segundo Audu (1999), a formação de complexos antígeno/anticorpo na superfície dos eritrócitos induz o seu sequestro e destruição no sistema reticuloendotelial. Outra hipótese afirma que o desenvolvimento da anemia pode acontecer devido à hemólise intravascular resultante da eritrofagocitose imunomediada (HERRERA, 1998). O aumento da fragilidade nos eritrócitos devido ao aumento da temperatura pode também contribuir para a anemia. E ainda, a ação direta dos parasitas ou a liberação de seus produtos e fatores imunológicos podem resultar na destruição de eritrócitos (KATUNGUKA-RWAKISHAYA et al., 1992; AQUINO, 1997; RUE et al., 2000; CONNOR, 2004; DARGANTES et al., 2005, SHEHU, et al., 2006).

Recentemente a anemia foi atribuída em parte devido à ação de uma enzima liberada pelo parasita que está ligada à membrana por uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI), chamada sialidase. Essa enzima cliva o ácido siálico presente na membrana eritrocitária expondo resíduos de galactose. Esses resíduos são reconhecidos e provocam uma expansão da atividade do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, levando à eritrofagocitose massiva, e posteriormente à anemia (ADAMU et al, 2008; SALLAU et al., 2008).

A contagem de reticulócitos (RET) é um bom indicativo da atividade efetiva da eritropoiese medular. Os resultados apresentam um aumento no índice de produção de RET no grupo B (1-10 tripanossomas/campo) e no grupo C (11-30 tripanossomas/campo), em relação ao grupo controle, indicando a ocorrência de uma resposta medular à anemia. Além disso, foi evidenciada anisocitose e policromasia discreta em quase todos os animais infectados. Contudo no grupo E que apresentava um número maior de tripanossomas/campo foi observada uma diminuição na contagem de RET, sugerindo desordens na medula óssea, uma produção eritróide insuficiente que pode estar associada aos metabólitos oriundos do parasita, inibindo a formação de eritrócitos. Em relação à concentração de PPT, não foram encontradas diferenças significativas, quando comparados os grupos infectados com o grupo controle. Esses resultados condizem com os encontrados por Oliveira (1990) e Monzón et al., (1990), analisados em cobaias, porcos e cavalos infectados pelo *T. evansi*.

A queda significativa no número de plaquetas circulantes observada em todos os animais infectados pode estar associada à expectativa de vida reduzida de plaquetas, disfunção na medula óssea e trombocitopenia imunomediada (MURRAY, 1988). Durante a infecção causada pelo *T. evansi*, as proteínas de superfície do parasita aderem às células sanguíneas tornando-as mais susceptíveis à fagocitose, em órgãos como o baço e fígado

(STEPHEN, 1986; JAIN, 1993; MAUDLIN, 2004). A esplenomegalia, observada durante o experimento (dados não mostrados), é uma alteração frequentemente relatada em cavalos infectados pelo *T. evansi* (RODRIGUES et al., 2005) e recentemente foi relatada em ratos (KIPPER, 2010).

No presente estudo, um padrão alterado de resposta leucocitária não foi evidenciado nos ratos inoculados pelo *T. evansi*. Na contagem diferencial de leucócitos sugerida por Monzón et al. (1990), Katunguka-Rwakishaya et al. (1992) e Omer (2007), foi verificado leucocitose e linfocitose em equinos, ovinos e ratos, respectivamente. Já Silva et al. (1995a) e Pochini (2000), observaram neutropenia com linfocitose em equinos e bovinos infectados com o parasita. *T. evansi* parece ser o principal mecanismo de evasão da resposta imunológica dos hospedeiros (MAUDLIN, 2004), ou a lesões elevadas aos tecidos e órgãos pelas reações imunes, levando a uma necessidade aumentada de fagocitose (BUSH, 2004).

Pelo exposto, as evidências indicam que o padrão de resposta leucocitária em animais infectados com *T. evansi* é bastante variável, inferindo-se que estes exames têm relativa importância no estabelecimento do diagnóstico e patogenicidade desta hemoparasitose. Na contagem de basófilos, eosinófilos e monócitos não foram observadas alterações ao longo de todo o experimento.

Considerando que alterações hematológicas induzidas pela infecção por *T. evansi* poderiam ser resultado do aumento de lise nos eritrócitos, optou-se por avaliar o efeito da fragilidade osmótica eritrocitária em ratos em diversos estágios de infecção. De fato, foi constatado um aumento ($p < 0.001$) na fragilidade osmótica nos grupos D e E, que continham um maior número de tripanossomas/campo em relação ao grupo controle. A fragilidade osmótica expressa a habilidade das membranas de manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, 2006). A fragilidade osmótica é influenciada por fatores como a forma, o volume e o tamanho do eritrócito, quantidade de Hb, diferenças na viscoelasticidade das membranas e na composição química e estrutural das mesmas.

Com a elevação da fragilidade osmótica aumenta a destruição dos eritrócitos, podendo levar os animais a graves condições de anemia, como observado em ratos, camelos e cavalos infectados com *T. evansi* (SALEH, 2009, MIJARES, 2010, RANJITHKUMAR, 2011). Os dados citados acima corroboram com observações em infecções por outros tripanossomatídeos como a *Leishmania* (OLIVEIRA e CECCHINI, 2000), *T. cruzi* (MARCONDES, 2000) e *T. brucei* (ERAH, 2003). Além disso, qualquer alteração da

membrana eritrócitária, seja em sua composição ou estabilidade, serve de ferramenta diagnóstica para uma série de doenças e para estudos de comportamentos celulares.

A hipoglicemia também é apontada como um importante achado clínico-laboratorial, podendo estar associada à gravidade da doença (MOREIRA, 1985; SINGH & JOSHI, 1991; KATUNGUKA-RWAKISHAVA et al., 1992). *T. evansi* necessita de quantidades adequadas de glicose para manutenção de seu metabolismo, e é considerado o maior consumidor de glicose dentre os membros desse gênero (WOO, 1977). A glicose utilizada pelo parasita é degradada por meio de etapas de oxidação controladas para fornecer energia química na forma de ATP e de NADH pelo processo de glicólise (VOET, et al., 2000). O piruvato é o produto final da glicólise no metabolismo do *T. evansi*. Embora o piruvato seja utilizado pelos tecidos dos hospedeiros, em concentrações altas poderia levar ao esgotamento das reservas alcalinas, acidose e uma afinidade reduzida da Hb pelo O₂ (MILLER, 1995).

Houve uma redução dos teores de glicose plasmática frente à infecção por *T. evansi* de aproximadamente 64% no grupo E quando comparado com o grupo A. Essa alteração pode ser procedente da depleção da glicose e de nutrientes sanguíneos provocados pelo parasita (SEED & HALL, 1985; OPPERDOES et al., 1987). Esta observação está de acordo com a hipótese sugerida por Seed & Hall (1985) e Opperdoes et al. (1987), de que os teores de glicose plasmática possuem correlação negativa com a parasitemia. Frente a processos inflamatórios ocasionados pelo parasita, o hospedeiro responde com diversas alterações fisiológicas, dentre elas a resposta de fase aguda da inflamação (GRUYS et al., 1994). Esta fase aguda é uma resposta inicial provocada por injúrias, invasão parasitêmica, inflamação localizada e sistêmica, acompanhada de febre, liberação de glicocorticóides e ativação do complemento (BAUMANN & GAULDIE, 1994). Na hipertermia causada pelo tripanossoma, o estímulo das funções glandulares aumentando a mobilização das reservas de glicogênio, pode provocar a redução dos teores de glicose (SINGH & JOSHI, 1991; PRUDHVI REDDY & HAFEEZ, 1996).

A membrana do eritrócito contém grande número de grupos-SH, e os agentes oxidantes podem oxidar o ferro, converter estes grupos tióis (R-SH) em componentes dissulfeto (R-SSG), e levar à desnaturação das proteínas da membrana (GILBERT, 1990). Neste processo, pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da Hb e aumento da MetaHb. A MetaHb difere da Hb pelo fato de que o ferro dos grupos heme está oxidada a Fe³⁺, o qual não pode se ligar ao O₂, ou seja, a MetaHb é a forma não funcional da Hb (HARVEY, 1997). Houve um aumento na porcentagem de Hb oxidada (MetaHb) em ratos infectados comparado com o controle. Este aumento da MetaHb em eritrócitos só foi significativo em ratos dos

grupos D e E, fornecendo evidência adicional de oxidação eritrocitária possivelmente devido ao aumento da parasitemia e a geração de estresse oxidativo provocado pelo parasita. Relatos anteriores também mostraram um aumento da MetaHb em camelos infectados com *T. evansi* (SALEH, 2009) e outros parasitas como *T. cruzi* (MALVEZI et al., 2004), *Babesia bovis* (COMMINS et al., 1988), *Theileria sergenti* (SHIONO et al., 2001) e *Babesia bigemina* (SALEH, 2009).

A geração de EROs está intimamente ligada à participação de metais na capacidade de oxidação de biomoléculas na reação de Fenton. O ferro é o mais importante e essencial metal de transição presente nas reações bioquímicas. A liberação de ferro representa uma fonte catalítica para o estresse oxidativo nos processos patogênicos. Devido à abundância de O₂ no meio aquoso, a auto-oxidação do ferro pode ser uma importante via para iniciar a formação de EROs (CIMEN, 2008). Os eritrócitos são altamente susceptíveis a danos peroxidativos por possuírem altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados, e a exposição contínua a altas concentrações de O₂ e a presença de ferro, eleva as concentrações de lipoperoxidação deixando os eritrócitos mais frágeis e propensos à lise (VALKO, 2007).

Tripanossomatídeos desenvolvem-se na corrente sanguínea de diversos mamíferos, utilizando nutrientes necessários para sua replicação. Nos hemoparasitas, o ferro desempenha um papel fundamental para a síntese de DNA (DORMEYER et al., 1997), geração de energia (CLARKSON et al., 1989), e no estresse oxidativo (LE TRANT et al., 1983). Nos mamíferos é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (WIJAYANTI & KATZ, 2004). Como mostrado aqui, a depleção da concentração de ferro sérico no grupo B foi entre 57-58% comparada com o controle, sugerindo que o *T. evansi* necessita de quantidades desse mineral para o seu crescimento e multiplicação.

Breidbach (2002) sugeriu que um quelante de ferro poderia ser uma estratégia interessante no desenvolvimento de drogas antiparasitárias contra *T. brucei*. A incubação dos parasitas com um quelante de ferro resultou na inibição do crescimento, redução na taxa de síntese de DNA e diminuição do consumo de O₂ do parasita. A inibição no crescimento por quelantes de ferro, também foi reportada em outros protozoários como *Plasmodium falciparum* (RAVENTOS-SUAREZ et al., 1982) *Leishmania* (SOTERIADOU et al., 1995) e *T. cruzi* (LOO, 1984). Entretanto, no grupo E em que a concentração de tripanossomas era mais elevada, foi observado uma concentração de ferro sérico de aproximadamente 78% acima dos níveis do grupo controle. Realizando uma comparação com o grupo B, a concentração foi mais de 90%. Esses resultados são contraditórios com os encontrados em

gatos infectados por *T. evansi* (DA SILVA, 2009) e em ratos Wistar infectados por *T. cruzi* (MATOUSEK DE ABEL DE LA CRUZ et al., 1993).

O que poderia explicar essa alteração seria que mesmo o parasita adquirindo a quantidade necessária de ferro para seu desenvolvimento e replicação, ainda há uma grande liberação Fe^{2+} intracelular, ampliando o risco de produção das EROs (VALKO, 2006). O Fe^{2+} livre devido à hemólise possui atividade óxidorredutora, podendo promover a formação de radicais livres pelas reações de Fenton, promovendo o acúmulo das EROs, dentre elas o $\cdot\text{OH}$. O excesso de Fe^{3+} e, conseqüentemente, de $\cdot\text{OH}$ estimula a lipoperoxidação de membranas eritrocitárias contribuindo para a lise celular. Este é o primeiro estudo a mostrar uma correlação entre o estresse oxidativo e liberação de ferro causada pela ação do parasita ao eritrócito de ratos infectado por *T. evansi*.

O conceito clássico de estresse oxidativo é um desequilíbrio no balanço entre oxidantes e antioxidantes, em favor do primeiro (SIES, 1998). A importância do sistema oxirredutor eritrocitário reside no fato de que, tanto a glutatona no seu estado reduzido, quanto o ferro no estado Fe^{2+} , são fatores determinantes na manutenção da integridade funcional do eritrócito, incluindo sua capacidade de deformabilidade e de ligação reversível do O_2 . O tripeptídeo glutatona desempenha importante papel na homeostase redox, mas outros tióis também atuam na sinalização redox (JACOB et al., 2003). Esses outros tióis que compõem diferentes pares redox, são enzimas que contêm cisteínas reativas (Ex.: tiorredoxinas, glutarredoxinas e peroxirredoxinas) e são amplamente distribuídas entre os seres vivos. A infecção por *T. evansi* causou diversas alterações no sistema antioxidante dos ratos infectados. O metabolismo da glutatona foi afetado, com baixos níveis de tióis (PSH, NPSH) principalmente nos grupos com maior parasitemia.

A GSH é o principal tampão redox intracelular e desempenha uma função essencial na proteção celular contra o dano oxidativo (FANG et al., 2002). Além disso, mantém os grupos tióis das proteínas em estado reduzido e impede a inativação de proteínas funcionais e enzimas, protegendo esses grupos contra oxidação (AMANVERMEZ AND CELIK, 2004). A GSH é um marcador da viabilidade celular e sua diminuição é indicativa de lesão oxidante. A concentração de GSH sob condições fisiológicas normais é de 10 a 100 vezes mais alta que a concentração na forma oxidada, e a taxa de GSH para glutatona oxidada (GSSG) é crítica para o balanço redox celular (WILHELM FILHO et al., 2001; DALLE-DONNE, et al., 2007; NETTO, 2007).

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de óxidorredução está íntegro, haverá recuperação da GSH.

Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que também caracteriza o estresse oxidativo. A diminuição do nível de glutathiona no presente estudo pode estar associada com estresse oxidativo causado pelo parasita, resultando na depleção da glutathiona. O consumo de glutathiona pela infecção do *T. evansi*, também foi observado em outros animais como camelos (SALEH, 2009), em cavalos (RANJITHKUMAR, 2011). Excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (PSH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções.

A glutathiona redutase (GR) é uma importante enzima celular, responsável pela reciclagem da GSSG, mantendo a maior parte na sua forma reduzida (GSH). A inibição da atividade da GR causada pela infecção pelo *T. evansi* em ratos ainda não foi descrita. Ela pode causar desequilíbrio nas defesas celulares, ou mesmo comprometer a própria célula. Baixos níveis de GSH e da atividade da GR pode ser perigoso para a célula, uma vez que estas estão relacionadas com a capacidade redutora do citosol, protegendo a célula contra processos oxidativos patológicos. (WALTHER et al., 2008). Os resultados aqui apresentados mostram um consumo dos tióis, após a infecção, os níveis de NPSH e GSH-t não foram restabelecidos aos níveis basais, enquanto os níveis de PSH foram menores em todo grau de infecção que aqueles do grupo controle (Figura 23a). Essa não restauração dos níveis tióis das proteínas pode estar relacionada com a depleção da GSH (CORTESE et al., 2008), mostrando que a infecção pelo *T. evansi* é inversamente proporcional aos níveis celulares de GSH. Isto sugere que a disfunção do metabolismo da glutathiona pode afetar a homeostase celular, podendo levar a morte da célula.

O aumento da atividade da GPx pode conferir ao eritrócito uma maior proteção contra o estresse oxidativo. Os peróxidos são formados normalmente pelo metabolismo celular, sendo produzidos em maior escala quando os organismos são expostos a insultos oxidativos, e representam uma medida geral de dano celular. No presente estudo, houve um aumento da atividade da GPx nos grupos C, D e E em relação ao grupo controle. O aumento da atividade dessa enzima provavelmente reflete uma compensação à elevada produção de H₂O₂, e outros hidroperóxidos, pois em eritrócitos a GPx a maioria é responsável pela detoxificação de H₂O₂ enquanto que o aumento da atividade da CAT só ocorreria quando altas concentrações de H₂O₂ são produzidas sistemicamente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001).

A catalase (CAT) é uma enzima capaz de diminuir especificamente os níveis primários de H₂O₂, possui metais em seus centros catalisadores que reagem com o H₂O₂ através de uma

reação de dismutação, desempenhando um importante papel no sistema de defesa antioxidante (BELOZERSKAYA & GESSLER, 2007). Em nosso estudo, a infecção causada pelo *T. evansi* promoveu um aumento significativo na atividade da CAT, principalmente nos estágios mais avançados da doença (grupo D e E). Adicionalmente, um estudo mostrou um aumento na atividade da CAT em camelos infectados pelo *T. evansi* (SALEH, 2009). Contrariamente, Ranjithkumar (2011) observou uma diminuição da CAT em cavalos infectados, indicando que estas variações podem existir devido à patogenicidade da cepa, bem como um desequilíbrio no sistema oxidante/antioxidante dos hospedeiros.

A G6PD é essencial para proteger os eritrócitos contra o dano oxidativo, e é a primeira enzima das vias das pentoses-fosfato. No eritrócito, a via das pentoses-fosfato fornece o NADPH necessário para a regeneração da GSSG à GSH, pela reação catalisada pela GR. GSH é doador de elétron para a redução de peróxidos na reação da GPx. Nesse estudo, não foram encontradas diferenças significativas na atividade enzimática da G6PD em ratos infectados pelo hemoparasita. Todavia, foi observada uma redução de aproximadamente 34% no grupo E comparado ao controle. Pode-se sugerir que num período de infecção mais prolongado, essa deficiência na atividade da G6PD poderia ser mais acentuada.

Estudos anteriores mostraram um aumento da atividade da G6PD durante a infecção pelo *T. evansi* em ratos, ou seja, os eritrócitos produzem EROs que aumentam a peroxidação lipídica e a ativação da hexose monofosfato na célula hospedeira (OMER, 2007). Os resultados aqui obtidos não concordam com a hipótese sobre o aumento da atividade enzimática da G6PD em animais infectados pelo *T. evansi*. Eritrócitos deficientes da atividade da G6PD são incapazes de reduzir o NADP^+ a NADPH em velocidade normal, apresentando assim, um baixo potencial redutor, comprometimento funcional da GR elevação do conteúdo intracelular de EROs, podendo resultar em grave hemólise (TIAN, 1998).

Enzimas de detoxificação e excreção celular são importantes para a manutenção da homeostase celular. A produção excessiva de EROs em sistemas biológicos está intimamente ligada com outros efeitos deletérios, incluindo dano de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular, peroxidação lipídica e danos ao DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Deste modo, substâncias antioxidantes que reduzam a quantidade de EROs nos sistemas biológicos, podem contribuir para o bom funcionamento do organismo.

A GST pode exercer atividade peroxidase com lipídios e DNA, além de realizar a detoxificação de xenobióticos. Após a infecção com *T. evansi* não foram observadas diferenças significativas comparadas com o grupo controle. É importante lembrar que esse mecanismo de defesa mediado pela GST depende de outros sistemas auxiliares: por um lado,

o fornecimento constante de glutathione deve ser mantido para a biotransformação destes compostos; por outro lado, os metabólitos originados devem ser excretados através de proteínas transmembrana transportadoras dependentes de ATP (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A fim de quantificar o dano celular, foi investigado os níveis totais de peróxidos determinados pelo método PCA-FOX. Os peróxidos são formados normalmente pelo metabolismo celular, sendo produzidos em maior escala quando os organismos são expostos a insultos oxidativos, e representam uma medida geral de dano celular. No presente estudo, foram observadas alterações nos níveis totais de peróxidos nos grupos C, D e E comparados com o grupo A (controle). A lipoperoxidação é um dos índices mais investigados para avaliar danos celulares induzidos por EROs, pela presença de fosfolipídios de membranas nos sítios próximos à formação das mesmas. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são um índice de peroxidação lipídica baseado principalmente na reação do malondialdeído (MDA, produto majoritário da lipoperoxidação) com o ácido tiobarbitúrico (TBA), permitindo medida espectrofotométrica da degradação oxidativa dos lipídios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O acúmulo de MDA nos tecidos ou fluídos biológicos é um indicativo da extensão da geração das EROs, estresse oxidativo e dano tecidual (GUTTERIDGE, 1995).

Os dados mostram que o estresse oxidativo evidenciado pelo aumento do MDA eritrocitário, foi substancialmente elevado em ratos com um estágio evolutivo mais avançado da doença. Estes resultados podem ser devido à oxidação de ácidos graxos poliinsaturados contidos na membrana eritrocitária, um sistema antioxidante ineficiente, salientando também que a obtenção de níveis severos de peroxidação lipídica é dependente do nível de infecção do animal. Esta noção é apoiada pela observação encontrada em infecções causadas pelo *T. evansi* em ratos (WOLKMER, 2009), camelos (SALEH, 2009), cavalos (RANJITHKUMAR, 2011) e por outros tripanossomatídeos como o *T. vivax* (IGBOKWE, 1996) e *T. cruzi* (WEN, 2006). A peroxidação lipídica modifica severamente a fluidez das membranas, aumentando a permeabilidade não-específica para íons (por exemplo, Ca^{2+}), podendo também ocasionar alterações no DNA celular (KIKUGAWA et al., 2003; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Chevion (2000) coloca que produtos da peroxidação lipídica, como o MDA, também podem atuar ativamente no ataque oxidativo às proteínas. Evidências consideráveis indicam que a manutenção do estado redox das proteínas é de fundamental importância para a função celular. As EROs formadas durante o metabolismo normal e também em condições

patológicas podem causar danos celulares, oxidando resíduos de aminoácidos nas proteínas, formando proteínas carboniladas.

Desta forma, a ação das EROs em conjunto com os produtos de peroxidação lipídica poderia ter potencializado o acúmulo de grupamentos carbonila no plasma após infecção aguda causada pelo parasita. Com o aumento da proteína carbonilada (PC) nos grupos D e E, de aproximadamente 96%, comparado com o grupo A. Este biomarcador estaria refletindo o aumento da oxidação protéica produzida pela infecção do *T. evansi* no hospedeiro. A elevação dos níveis de PC no plasma ainda não tinha sido descrita em animais infectados pelo *T. evansi*. Alteração oxidativa nas proteínas de membranas eritrocitárias é considerada muito significativa tendo em vista seu importante papel no transporte, na atividade enzimática e na fluidez das membranas (DALLE-DONNE, 2003). Este mostrou que a carbonilação de proteínas aumentou gradativamente com a infecção causada pelo *T. evansi*, e a introdução de grupos carbonilas dentro de resíduos de aminoácidos é uma característica de modificação oxidativa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Este estudo mostrou que as atividades das enzimas antioxidantes GPx e CAT sofreram aumento diretamente proporcional aos níveis elevados de estresse oxidativo. Fortes evidências da regulação redox de ratos infectados pelo *T. evansi* em situações de desafios oxidativos, propõem interessantes modelos de estudo *in vivo* para avaliar os efeitos do sistema antioxidante nestes animais. Novos trabalhos ainda são necessários para complementar esse cenário relacionado às diferentes vias de sinalização ativadas/reprimadas nestas situações, e assim esclarecer todos os efeitos desestabilizadores do estresse oxidativo às estruturas biológicas causadas na patogenia desse tripanossomatídeo.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho utilizando ratos infectados pelo *T. evansi* em diversos graus de infecção indicam que:

- A infecção com *T. evansi* causou alterações hematológicas, aumento da fragilidade osmótica eritrocitária, elevação na concentração de metahemoglobina, depleção da glicose e aumento do ferro sérico, notoriamente nos grupos mais infectados.
- A infecção com *T. evansi* promoveu um dano oxidativo evidenciado pelo aumento das concentrações de PC, além da depleção dos níveis de GSH, PSH e NPSH e na atividade da GR. Ocorreu também um aumento das atividades da GPx e da CAT refletindo possivelmente numa compensação à elevada produção de H₂O₂ e hidroperóxidos, respectivamente. Os valores das análises dos marcadores de ataque oxidativo indicaram que as principais alterações em lipídios (TBARS), peróxidos totais e níveis de PC ocorreram nos grupos com estágios mais avançados de parasitemia.
- A infecção aguda causada pelo *T. evansi* em ratos foi considerada satisfatória na indução de alterações severas nas estruturas eritrocitárias, sendo a metodologia empregada sensível na detecção dos níveis de estresse oxidativo gerados. Os resultados sugerem fortemente que a infecção aguda causada pelo *T. evansi* em ratos está associada com o estresse oxidativo sistêmico e é proporcional ao nível de infecção.

REFERÊNCIAS

- ADAMU, S. et al. Sialyl transferase activity probably counteracts that of sialidase as one of the possible mechanisms of natural recovery of stabilization of erythrocyte mass in Trypanosome-infected animals-A perspective. **Afri. J. Biotechnol.**, n. 7, p. 4992–5001, 2008.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol.**, v. 77, p. 373-382, 1981.
- ALDRICH, K.; SAUNDERS, D. K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **J. Therm. Biol.**, n. 26, p. 179-182, 2006.
- ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K. C. H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Rev. Educ. Contin.**, CRMV/SP, v. 5, p. 192-205, 2002.
- AI-MOHAMMED, H. I. Parasitological and immunological response of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in rats. **J. Egypt Soc. Parasitol.**, v. 36, p. 363–371, 2006.
- ALMEIDA, R. F. et al. Metabolismo do ferro em suínos recebendo dietas contendo fitase, níveis reduzidos de fósforo inorgânico e sem suplemento micromineral e vitamínico. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1097-1103, 2007.
- AMANVERMEZ, R., CELIK, C. Superoxide dismutase, glutathione, vitamin C, total antioxidant and total thiol levels in hydatid cysts. **Turk. Clin. J. Med. Sci.**, n. 24, p. 213–218, 2004.
- ANOSA, V. O.; KANEKO, J. J. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): light and electron microscopic studies on erythrocyte pathologic changes and phagocytosis. **Amer. J. Vet. Res.**, v. 44, n. 4, p. 645-651, 1983.
- AQUINO, L. P. C. T. **Aspectos clínicos, imunológicos e patológicos da infecção experimental em cães por *Trypanosoma evansi***. 1997. 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

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

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

ASSOKU, R. K. Immunological studies of the mechanism of anaemia in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rats. **Intern. J. Parasitol.**, v. 5, n. 2, p. 137-145, 1975.

ATANASIU, V.; MANOLESCU, B.; STOIAN, I. Hepcidin – central regulador of iron metabolism. **Eur. J. Haematol.**, v. 78, p. 1-10, 2006.

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

AUDU, P. A. et al. Studies of infectivity and pathogenicity of an isolate of *Trypanosoma evansi* in Yankasa sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 86, p.185-190, 1999.

BACKWELL, R. Q.; HUANG, J. T.H. Simplified preparation of blood hemolysates for hemoglobin electrophoresis. **Clin. Chem.**, v. 11, n. 6, p. 628-632, 1965.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, v. 15, n. 2, p.74-80, 1994.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

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

BELOZERSKAYA, T.; GESSLER, N. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 506-515, 2007.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 20313–20316, 1997.

BEUTLER, E. G6PD Deficiency. **Blood**, v. 84, n. 11, p. 3613-3636, 1994.

BOERO, J. J. **Parasitosis animales**. 3. ed. Buenos Aires: Eudeba, 1974. 264 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, n. 1, p. 248-54, 1976.

BRANDÃO, J. P. et al. Natural infection by *Trypanosoma evansi* em dog - Case report. **Clín. Veter.**, n. 36, p. 23-26, 2002.

BREIDBACH, T. et al. Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. **Int. J. Parasitol.**, n. 32, p. 473–479, 2002.

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

BURAK ÇIMEN, M. Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clin. Chim. Acta**, v. 390, p. 1–11, 2008.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Fundamentos de Química Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. p. 681.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2004. p. 100-148.

CADET, J.; TÉOULE, R. Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. **Photochem. Photobiol.**, n. 28, p. 661-667, 1997.

CADIOLI, F. A. **Infecção experimental em jumento (*Equus asinus*) com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcocystidophora: Trypanosomatidae)**. 2001. 135f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 484-490. 1985.

CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **Intern. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 38, p.1482–1495, 2006.

CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chem. Phys. Lipids**, v. 157, p.1–11, 2009.

CECARINI, V. et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1773, p. 93–104, 2007.

CHEVION, M.; BERENSHTEIN, E.; STADTMAN, E. R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as marker of damage. **Free Radic. Res.**, v. 33, p. 99-108, 2000.

CIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clin. Chim Acta**, v. 390, p. 1-11, 2008.

CLARKSON, A. B. et al. Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. **J. Biol. Chem.**, n. 264, p. 17770–17776, 1989.

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

COMMINS, M. A. et al. *Babesia bovis*: studies of parameters influencing microvascular stasis of infected erythrocytes. **Res. Vet. Sci.**, n. 44, p. 226–228, 1988.

COMPORTI, M.; SIGNORINI, C.; BUONOCORE, G.; CICCOLI, L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. **Free Radic. Biol. Med.**, n. 32, p. 568–76, 2002.

CONNOR, R.J.; VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. 2. 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**, v. 35, n. 4, p. 928-931, 2005.

COOKE, M. S. et al. Oxidative damage: mechanisms, mutation and disease. **Faseb J.**, v. 17, p. 1195-1214, 2003.

COOPER, A. J. L. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L., Kunk, L.M. (Eds.), **The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease**. Butterworth - Heinemann, Boston, 1997, p. 1195–1230.

CORTESE, M. M. et al. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, p. 2002-2012, 2008.

DACIE, J.; LEWIS, S. M. **Practical haematology**. 8. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995. 453p.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta**. v. 329, p. 23–38, 2003.

DAMAYANTI, R.; GRAYDON, R. J.; LADDS, P. W. The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo (*Bubalus bubalis*). **J. Comp. Pathol.**, v. 110, n. 3, p. 237-52, 1994.

DARGANTES, A. P. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. I. Clinical signs and clinical pathology. **J. Comp. Pathol.**, v. 133, p. 261-266, 2005.

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

DA SILVA, A. S. et al. *Trypanosoma evansi*: levels of copper, iron and zinc in the bloodstream of infected cats. **Exp. Parasitol.**, n. 123, p. 35-38, 2009.

DA SILVA, A. S. et al. Clotting disturbances in *Trypanosoma evansi* infected cats. **Comp. Clin. Pathol.** v. 19, p. 207-210, 2010.

DÁVILA, A. M. R. et al. The seroprevalence of equine trypanosomiasis in the Pantanal. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 199-202, 1999.

DELAFOSSÉ, A.; DOUTOUM, A. A. Prevalence of *Trypanosoma evansi* infection and associated risk factors in camels in eastern Chad. **Vet. Parasitol.**, v. 119, n. 23, p. 155-164, 2004.

DESQUESNES, M. et al. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. **Inter. J. Parasitol.**, v. 39, p. 333-346, 2009.

DEVASENA, T., LALITHA, S., PADMA, K. Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. **Clin. Chim. Acta**, n. 308, p. 155-161, 2001.

DIAZ, et al. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clin. Chem**, v. 44, p. 2215-2217, 1998.

DIZDAROGLU, M. et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 32, n. 11, p. 1102-1105, 2002.

DOMANSKI, A.V. et al. Oxidative Processes Induced by tert-Butyl Hydroperoxide in Human Red Blood Cells: Chemiluminescence Studies. **Biochem.**, n. 70, p. 761-769, 2005.

DORMEYER, M. et al. Cloning, sequencing and expression of ribonucleotide reductase R2 from *Trypanosoma brucei*. **FEBS Lett.** v. 414, n. 2, p. 449-453, 1997.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.

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

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, n. 1, p. 70-77. 1959.

EL-MISSIRY, M.A.; ABOU-SEIF, M. Photosensitization induced reactive oxygen species and oxidative damage in human erythrocytes. **Cancer Lett.**, v. 158, p. 155-163, 2000.

EVELYN, K. A.; MALLOY, H. A. T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. **J. Biol. Chem.**, v. 126, p. 655-664, 1938.

FALLIS, M. A. Discoverer of the first pathogenic trypanosome. **Can. Vet.**, n. 27, p. 336-338, 1986.

FANG, Y. Z.; YANG, S.W. G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FLOYD, R. A. Free radicals in molecular biology. **Aging and disease**. New York: Raven, 1984. 416p.

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

FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigation on naturally occurring *T. evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, v. 58, p. 159-69, 1994.

GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric xylenol orange peroxide assay. **Anal. Biochem.**, v. 304, n. 1, p. 42-46. 2002.

GILBERT, H. F.; MC LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv. Enzymol. Relat. Mol. Biol.**, v. 63, p. 69-172, 1990.

GLOCK, G. E.; MC, L. P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem J.**, v. 55, n. 3, p. 400-408, 1953.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary chemistry: a review. **Vet. Bull., Stuttgart**, v. 64, n. 1, p. 1009-1018, 1994.

GUTIERREZ, C. et al. *Trypanosoma evansi*: Recent outbreaks in Europe. **Vet. Parasitol.**, v. 174, p. 26-29, 2010.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, v. 41, p.1819-1828, 1995.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods Enzymol**, v. 77, p. 218-31, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Rad. Biol. Med.**, 3. ed. UK: Oxford University Press, 2000, p. 936.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Rad. Biol. Med.**, 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Rad. Biol. Med.**, 4. ed. New York: Clarendon Press, 2007, p. 880.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**. v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HARVEY, J. W. **The erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical disorders.** In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W. (Eds.), M. L. Bruss Clin. Biochem. Domestic Animals. 5. ed. Academic press, London, 157–203, 1997.

HERRERA, H. M. **Infecção experimental em quatis (*Nasua nasua*) *Trypanosoma evansi* *Balbani*, 1888.** 1998. 80f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

HERRERA, H. M. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. **Acta Tropica**, v. 81, n. 3, p. 203-210, 2002.

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

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

HOWILL, M. G. Deformation of erythrocytes by trypanosomes. **Exp. Cell. Res.**, v. 37, p. 306-311, 1965.

HUISMAN, T. H. J. Human hemoglobin. In : MILLER, D. R., BAEHNER, R. L. (Eds). **Blood Diseases of Infancy and Childhood**. 7th ed. Saint Louis : Mosby, 1995. P. 385-414.

IGBOKWE, I. O. et al. Effect of acute *Trypanosoma vivax* infection on cattle erythrocyte glutathione and susceptibility to in vitro peroxidation. **Vet. Parasitol.**, n. 63, p. 215-224, 1996.

JACOB, C. et al. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. **Angew. Chem. Int.**, n. 42, p. 4742-4758, 2003.

JAHANGIRI, A. et al. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca^{2+} dynamics and antioxidant status. **Free Rad. Biol. Med.**, n. 40, p. 1592-1602, 2006.

JAIN, N. C. **Shalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986. Hematology techniques: p. 64-71.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea and Fabinger, 1993.

JATKAR, P. R.; PUROHIT M. S. Pathogenesis of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. I. Haematology. **Indian Vet. J.**, v.48, n.3, p.239-244, 1971.

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

JENSEN, R E. et al. What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. **Trends Parasitol.** n.24, p. 428–431, 2008.

JÚNIOR, A. A. J. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 32, p. 434-449, 1998.

JOSHI, P. P. et al. Human trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: The first case report. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 3, p. 491-495, 2005.

KADIMA, K. B. et al. Serum biochemical values of *Trypanosoma vivax*-infected cattle and the effects of lactose in saline infusion. **Vet. Arch.**, v.70, p. 67-74, 2000.

KATUNGUKA-RWAKISHAVA, E.; MURRAY, M.; HOLMES, P. H. The pathophysiology of ovine trypanosomiasis: Haematological and blood biochemical changes. **Vet. Parasitol.**, v. 45, n. 1, p.17-32, 1992.

KIKUGAWA, K. et al. Effect of supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids on oxidate stress-induced DNA damage of rat hepatocytes. **Bio. Pharm. Bull.** v. 26, n. 9, p. 1239-1244, 2003.

KIPPER, M. et al. Relationship between splenic sequestration and thrombocytopenia in *Trypanosoma evansi* infection in rats. **Res. Vet. Sci.**, v. 91, n. 2, p. 240-2, 2011.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K.H. Color atlas of biochemistry. 2. ed. New York. 2005, 467p.

LEHNINGER, A. L. **Lehninger princípios de bioquímica.** 3. ed. São Paulo, 2002. 975p.

LEMOS K. R. **Resposta imune celular e alterações histopatológicas no sistema nervoso central de equinos infectados experimentalmente com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae).** 2003. 85f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

LE TRANT, et al. Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification characterization, and similarity to leishmanial and trypanosomal enzymes. **J. Biol. Chem.**, n. 258, p. 125–130, 1983.

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

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v. 233, p. 346-357, 1994.

LIEW, C. C. et al. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. **J. Lab. Clin. Med.**, n. 147, p. 126–132, 2006.

LOSOS, G. J. Diseases caused by *Trypanosoma evansi*. A review. **Vet. Res. Comm.**, v. 4, p. 165-81, 1980.

LOO, V. G.; LALONDE, R. G. Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Imm.**, v. 45, n. 3, p.726-730, 1984.

- LUCAS, S. **Pathology of tropical infections**. In: MCGEE, J.O.D.; ISAACSON, P.G.; WRIGHT, N.A. Oxford textbook of pathology. New York: Oxford University Press, 1992. v. 2b. cap. 29, p. 2187-2265.
- LUN, Z. R.; DESSER, S. S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? **Parasitol. Today**, v. 11, p. 131–133, 1995.
- MACNEE, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 429, p. 195-207, 2001.
- MALVEZI, A. D. et al. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, n. 41, p. 69–77, 2004.
- MARCONDES, M. C. et al. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 4, p. 347-352, 2000.
- MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat. Res.** v. 424, p.83–95, 1999.
- MARQUES, L.C. **Infecção experimental em equinos com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (Sarcostigophora: Trypanomatidae)**. 1996. 134f. Tese (Livre Docência em Clínica Médica). Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MARQUES, L.C. et al. Experimental infection with *Trypanosoma evansi* in horses: clinical and haematological observations. **Ver. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 9, p. 11-15, 2000.
- MATOUSEK DE ABEL DE LA CRUZ, A. J. et al. Changes in the total content of iron, copper, and zinc in serum, heart, liver, spleen, and skeletal muscle tissues of rats infected with *Trypanosoma cruzi*. **Biol. Trace Elements Res.**, n. 37, p. 51–70, 1993.
- MAUDLIN, I.; HOLMES, P.; MILES, M. A. **The trypanosomiases**. CABI. Publishing, Wallingford, 2004.

MAY, J. M.; QU, Z. C.; MENDIRATTA, S. Protection and recycling of alfa-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. **Arch. Biochem. Bioph.**, v. 349, p. 281–289, 1998.

McCULLOCH, C.E.; SEARLE, S.R. **Linear and generalized linear mixed models**, New York: Wiley, 2001, 358p.

MIDDLETON, Jr. E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, n. 52, p. 673-751, 2000.

MIJARES, A. et al. *Trypanosoma evansi*: Effect of experimental infection on the osmotic fragility, lipid peroxidation and calcium-ATPase activity of rat red blood cell. **Exp. Parasitol.**, v. 124, p. 301-305, 2010.

MONZÓN, C.M.; VILLAVICENCIO, V. I. Serum protins inguinea-pigs and horses infected with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). **Vet. Parasitol.**, v. 36, n. 3-4, p. 395-301, 1990.

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

MOSIALOU, E. **Microsomal Glutathione Transferase and Oxidative Stress**. Dissertação de Pós-Doutorado, Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology. Estocolomo, Suécia. 1993.

MURADOR, P.; DEFFUNE E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, p. 168–178, 2007.

MURRAY, M.; DEXTER, T. M. Anaemia in bovine African trypanosomiasis. **Acta Trop.**, v. 45, n. 4, p. 389-432, 1988.

NETTO, L. E.; et al. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v.146, n.1-2, p.180-93, 2007.

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 167–181. 2000.

NIKI, E. **Antioxidants and atherosclerosis**. Biochemical Society Transactions, London, v. 32, p. 156-159, 2004.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E.T. *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Trans. Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p. 692, 1990.

OGA, Z. **Fundamentos da toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 530 p.

OHKAWA, H., OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351–358, 1979.

OLIVEIRA, T.C.G.; SALATA, E.; SOGAYAR, R. Análise eletroforética das proteínas séricas de cobaias experimentalmente com *Trypanosoma evansi*. **Rev. Vet. Zootec.**, v. 2, n. 1, p. 41-45, 1990.

OLIVEIRA, F. J.; CECCHINI, R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. **J. Parasitol.**, v. 86, p. 1067–1072, 2000.

OMER, O.H.; MOUSA, H. M.; AL-WABEL, N. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet. Parasitol.**, n.145, p.142-145, 2007.

ONAH D. N.; HOPKINS, J.; LUCKINS, A. G. Hematological changes in sheep experimentally infected with *T. evansi*. **Parasitol. Res.**, v. 82, n. 1, p. 659-663, 1996.

OPPERDOES, F. R.; COPPENS, I.; BAUDHUIN, P. Digestive enzymes, receptor mediated endocytosis and their role in the nutrition of the bloodstream-form trypanosome. In: CHANG, K. P.; SNARY, D. **Host-parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections**. Berlin: Springer-Verlag. p. 51-65, 1987.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin. Chim. Acta**, v. 333. p. 19–39, 2003.

POCHINI, L. R. **Infecção experimental em bovinos com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcostigophora:Trypanosomatidae)**. 2000, 102 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

PRASANTHI, K.; MURALIDHARA, RAJINI, P. S. Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following in vitro exposure to Fenvalerate and its metabolite. **Toxicol. In Vitro**, v. 19, p. 449-456, 2005.

PRUDHVI REDDY, K.; HAFEEZ, M. D. Incidence of Trypanosomiasis in bovines in Anapur district of Andhra Pradesh. **Cheiron**. v. 25, n. 1, p. 53-57, 1996.

QUEIROZ, A.O.; CABELLO, P. H.; JANSEN, A. M. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso – Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 92, p. 107–118, 2000.

QUIÑONES MATEU, M. E.; FINOL, H. J.; TORRES, S. H. Muscular changes in Venezuelan wild horses infected with *Trypanosoma evansi*. **J. Comp. Pathol.**, v. 110, n. 1, p. 79-89, 1994.

RANJITHKUMAR, M. et al. Disturbance of oxidant/antioxidante equilibrium in horses naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet. Parasitol.**, doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.029, 2011.

RAVENTOS-SUAREZ, C.; POLLACK, S.; NAGEL, R. L. Plasmodium falciparum: inhibition of in vitro growth by desferrioxamine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 31, 919–22, 1982.

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. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 25, n. 4, p. 239–249, 2005.

RODRIGUES, A. et al. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 25, n. 4, p. 239-249, 2006.

RODRIGUES, A. et al. Neuropathology of Naturally Occurring *Trypanosoma evansi* Infection of Horses. **Vet. Pathol.**, v. 46, p. 251-258, 2009.

ROHN T.T.; HINDS, T.R.; VINCENZI, F. F. Inhibition of the Ca²⁺ pump of intact red blood cells by t-butyl hydroperoxide: important of glutathione peroxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1153, p. 67–76, 1993.

RUE, M. L. et al. Leucocyte and reticulocytes counts in acute infection of dogs with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. **Rev. Latinoamer. Microbiol.**, v. 42, p. 163-166, 2000.

SALEH, Mostafa A.; AL- SALAHY, M. Bassam; SANOUSI, Samera A. Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet. Parasitol.**, n. 162, p. 192-199, 2009.

SALEH, M.A.; BASSAN-AL-SALAHY, M.; SANOUSI, S. Oxidative stress in blood camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected by *T. evansi*. **Vet. Parasitol.**, v. 162, p. 192-199, 2009.

SALLAU, A. B. et al. Bloodstream form of *Trypanosoma evansi* contains Galactosidase. **Middle East Journal of Science Research**, n. 3, p. 49–52, 2008.

SCANDALIOS, J. G. Introduction to Oxyradicals. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 23, n. 3, p. 471-472, 1997.

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROL, E. J. **Veterinary Hematology**. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 609p; 1975.

SCHWABBAUER, M. **Normal erythrocyte production, physiology and destruction**. Clinical hematology: Principles, procedures and correlations. Philadelphia: Lippincott. 1998, p. 57–72.

SEED, J. R.; HALL, J. H. **Pathophysiology of African tripanosomiasis. Immunology and pathogenesis of trypanosomiasis**. Boca raton: Tizard CRC. p. 1-11, 1985.

SEILER, R. J.; OMAR, S.; JACKSON, A. R. B. Meningoencephalitis in naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection (Surra) of horses. **Vet. Pathol.**, v. 18, n. 1, p. 120-122, 1981.

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

SHEHU, S. A. et al. Neuraminidase (Sialidase) activity and its role in development of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. **J. App. Sci.**, v. 6, n. 13, p. 2779-2783, 2006.

SHIONO, H. et al. Acquired methemoglobinemia in anemic cattle infected with *Theileria sergenti*. **Vet. Parasitol.**, n.102, p.45-51, 2001.

SICIŃSKA, P. et al. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. **Toxicon.**, v. 47, p. 387-397, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. **Oxidative Stress**, USA: Academic press. 1985. p. 1-7.

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

SILVA, R. A. M. S. et al. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects. **Ciência Rural**, v. 25, n. 2, p. 233-238, 1995b.

SILVA, R. A. M. S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia Diagnóstico e Controle, EMBRAPA. Disponível: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/Livro015>, 2002. Acesso em: setembro/2011.

SINGH, B.; JOSHI, S. J. Epidemiology, clinic-pathology and treatment of clinical *Trypanosoma evansi* in buffalo. **Indian Vet. J.**, v. 68, n. 1, p. 975-979, 1991.

SLATER, T. F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.**, v. 222, p. 1-15, 1984.

SOTERIADOU, K., et al. Effect of iron chelation on the in-vitro growth of leishmania promastigotes. **J. Antimicrob. Chemother.** n. 35, p. 23-29, 1995.

SOUZA, M. H. L.; RÊGO, M. M. S. **Princípios de Hematologia e Hemoterapia: Manual de Instrução Programada**. Rio de Janeiro: Alfa Rio. 1996. p. 43.

STEPHEN, L. E. **Trypanosomiasis: a veterinary perspective**. Pergamon Press, New York, 1986.

STERNBERG, J. et al. Gene exchange in African trypanosomes: frequency and allelic segregation. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 34, n. 3, p. 269-279, 1989.

STOKER, R.; KEANEY-Jr, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 1381-1478, 2004.

STRYER, L. **Biochem.** 4. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. p. 131-135.

SUDARTO, M.W.; TABEL, H.; HAINES, D.M. Immunohistochemical demonstration of *Trypanosoma evansi* in tissues of experimentally infected rats and a naturally infected water buffalo (*Bubalus bubalis*). **J. Parasitol.**, v. 76, n. 2, p. 162-167, 1990.

TAMARIT, A. et al. *Trypanosoma evansi* infection in mainland Spain. **Vet. Parasitol.**, v. 167, p. 74-76, 2010.

TAN, K. H.; MEYER, D. J.; KETTERER, B. Thymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. **FEBS Letters, Amsterdam**, v. 207, p. 231-233, 1986.

TIAN, W. et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 17, p. 10609-10617, 1998.

TUNTASUVAN, D.; SARATAPHAN, N.; NISHIKAWA, H. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Vet. Parasitol.**, v. 73, n. 3-4, p. 357-363, 1997.

TUNTASUVAN, D.; LUCKINS, A.G. Status of Surra in Thailand. **J. Trop. Med. Parasitol.**, v. 21, n. 2, p. 1-8, 1998.

TUNTASUVAN, D. et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. **Vet. Parasitol.**, v. 87, n. 2-3, p. 223-230, 2000.

TUNTASUVAN, D. et al. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. **Vet. Parasitol.**, v. 110, p. 227-233, 2003a.

TUNTASUVAN, D. et al. Efficacy of diminazene aceturate on the treatment of Trypanosomosis in pigs. **J. Thailand Vet. Med. Asso.**, v. 54, n. 1-2, p. 49-56, 2003b.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Intern. J. Biochem. & Cell Biol.** v. 39, p. 44-84, 2007.

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. **J. Parasitol.**, v. 86, p. 1289-1298, 2000.

VICKERMAN, K. Antigenic variation in trypanosomes. **Nature**, v. 273, p. 613-617, 1978.

VOET, D. et al., **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul LTDA, 2000. p.383-414.

WAJCMAN, H.; LANTZ, B.; GIROT, R. **Les Maladies du globule rouge**. Paris: Les éditions INSERM. Médecine-Sciences Flammarion, 1984. cap. 3, p. 31-44.

WALTHER, U.I. et al. Enhancing glutathione synthesis can decrease zinc-mediated toxicity. **Biol. Trace Element Res.**, v. 122, p. 216-228, 2008.

WEN, J. J.; VYATKINA, G.; GARG, N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: Role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 37, p. 1821–1833, 2004.

WEN, J. J.; YACHELINI, P. C.; SEMBAJ, A.; et al. Increase oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. **Free Rad. Biol. Med.**, n. 41, p. 270-276, 2006.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WIEACKER, P. et al. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. **Ann. Génét.**, v. 23, p. 73-77, 1980.

WIJAYANTI, N.; KATZ N. Biology of heme in health and disease. **Curr. Med. Chem.**, v.11, n.8, p.981-986, 2004.

WILHELM FILHO, D. et al. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 719-726, 2001.

WOLKMER, P. et al. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet. Parasitol.**, p.01-06, 2009.

WOO, P. T. K. Salivarian trypanosomes producing disease in livestock outside of sub-Saharan Africa. In: KREIER, J.P. (Ed.) **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, p. 270-298, 1977.

ZACKS, M.A.; WEN, J. J.; VYATKINA, G. et al. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **Ann. of the Braz. Acad. Sci.**, v. 77, n. 4, p. 695-715, 2005.

ZAVODNIK, L. B. et al. Hypochlorous acid-induced membrane pore formation in red blood cells. **Bioelectrochem.**, v. 58, p. 157– 161, 2002.

ZOU, C. G.; AGAR, N. S.; JONES, G. L.; Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. **Life Sci.**, v. 69, p. 75-86, 2001.

ANEXO**ANEXO A. Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA.**

Ofício n º 22/2010 – CETEA/CAV

Lages, 13 de Dezembro e 2010.

Prezado Pesquisador/ Professor .

O Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, reunido no dia 25/10/2010, aprovou o projeto de pesquisa de Protocolo 1.42.10 de origem do Departamento de Produção Animal e alimentos sendo interessado o Prof. Dr Luiz Claudio Milette com **Título: "Estresse Oxidativo e parâmetros hematológicos como biomarcadores da infecção experimental com Trypanossoma evansi em ratos"** Sem mais para o momento, agradecemos.

Atenciosamente,



Prof. Aury Nunes de Moraes
Presidente do CETEA

ILMO.Prof. Dr.Luiz Claudio Milette
CAV/UDESC