



unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ERITROLEUCOMETRIA, PERFIL BIOQUÍMICO,
HISTOPATOLOGIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS
WISTAR DIABÉTICOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM
*Trypanosoma evansi***

Carla Orloski Morales
Médica Veterinária

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

Julho de 2016

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ERITROLEUCOMETRIA, PERFIL BIOQUÍMICO,
HISTOPATOLOGIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS
WISTAR DIABÉTICOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM**

Trypanosoma evansi

Carla Orloski Morales

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

Julho de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CARLA ORLOSKI MORALES - nasceu na cidade de Viradouro, São Paulo, em 18 de novembro de 1983. É Médica Veterinária formada pela Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, na qual colou grau em 16 de dezembro de 2011. Em março de 2013 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração de Clínica Médica, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Unesp, Campus de Jaboticabal. Atualmente atua como Médica Veterinária autônoma.

Eritroleucometria, perfil bioquímico, glicemia, histopatologia e estresse oxidativo em ratos wistar diabéticos infectados com *Trypanosoma evansi*

RESUMO - *Trypanosoma evansi* possui ampla distribuição mundial, ocorrendo na África, Ásia, Europa, América Central e do Sul e infecta equídeos, bovinos, cães, gatos e pequenos ruminantes, além de camelos, capivaras, quatis, veados e coelhos. *T. evansi* é ávido consumidor da glicose plasmática, causando hipoglicemia severa, achado comum nos animais infectados. O diabetes mellitus é caracterizado pela manutenção persistente da hiperglicemia, o que gera estresse oxidativo e induz a maioria das complicações do diabetes. O objetivo deste estudo foi observar a influência do *T. evansi* no estresse oxidativo de ratos Wistar diabéticos bem como no quadro eritroleucocitário, no perfil bioquímico e verificar as alterações histopatológicas resultantes da infecção experimental. Quarenta ratos divididos em quatro grupos, grupo não infectado e não diabético (GC), grupo diabético (GD), grupo infectado (GI) e grupo diabético e infectado (GDI). GD manteve os maiores índices oxidativos em comparação ao GDI e ao GI, indicando que a infecção pelo parasita favoreceu a diminuição do estresse oxidativo causado pelo modelo de diabetes proposto. Uma significativa redução de todos os parâmetros hematológicos, com exceção do VCM, foi observada. Hiperglicemia inerente ao status diabético, induzido pela estreptozotocina pode ter desencadeado uma lesão hepática no grupo diabético, como indicado pelos elevados teores séricos de AST e ALT. Deste modo, a infecção com *T. evansi* no GDI poderia ter protegido os indivíduos do desenvolvimento de tal condição.

Palavras-chave: diabetes, antioxidantes, infecção experimental, tripanossomíase

Red and white cells counts, biochemical profile, histopathological and oxidative stress in diabetic Wistar rats infected with *Trypanosoma evansi*

ABSTRACT- *Trypanosoma evansi* has extensive worldwide distribution, occurring in Africa, Asia, Europe, Central and South America in infects horses, cattle, dogs, cats, small ruminants, camels, capybaras, coatis, deer and rabbits. *T. evansi* is avid consumer of plasma glucose, causes severe hypoglycemia, commonly found in infected animals. Diabetes is characterized by persistent hyperglycemia maintenance, which leads to oxidative stress, and induces the majority of diabetic complications. The objective of this study was to observe the influence of *T. evansi* in oxidative stress in diabetic Wistar rats and in red and white cells counts, biochemical profile and verify histopathological changes resulting from the experimental infection. Forty rats were divided into four groups, uninfected group and not diabetic (GC), diabetic group (GD), infected group (GI) and diabetic and infected group (GDI). GD kept higher oxidation rates compared to the GDI and GI, indicating that the parasite infection favoring a decrease in oxidative stress caused by diabetes model proposed. A significant reduction of all hematological parameters, except for the VCM, was observed. Hyperglycemia inherent in the diabetic status, induced by streptozotocin may have triggered a non-alcoholic hepatic steatosis condition in the diabetic group, as indicated by elevated serum levels of AST and ALT. Thus, infection with *T. evansi* in GDI could have protected individuals of developing such a condition.

Key words: diabetes, antioxidants, experimental infection, tripanosomiasis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1. INDUÇÃO DO DIABETES	6
3.2. INFECÇÃO EXPERIMENTAL E DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA.....	6
3.3. PESO E CONSUMO DE RAÇÃO	7
3.4. EUTANÁSIA E COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	7
3.5. EXAMES LABORATORIAIS	8
3.5.1. GLICEMIA.....	8
3.5.2. ERITROLEUCOMETRIA	8
3.5.3. DETERMINAÇÕES DO PERFIL BIOQUÍMICO.....	9
3.5.4. DETERMINAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	10
3.5.5. CAPACIDADE OXIDANTE TOTAL (TOC).....	10
3.6. EXAMES ANATOMOPATOLÓGICOS.....	11
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	11
4. RESULTADOS	12
4.1 INDUÇÃO DO DIABETES, INFECÇÃO EXPERIMENTAL E DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA	12
4.2 PESO E CONSUMO DE RAÇÃO	13
4.3 EXAMES LABORATORIAIS	17
4.3.1 CONTROLE DA GLICEMIA.....	17
4.3.2 ERITROLEUCOMETRIA	18
4.3.3 PERFIL BIOQUÍMICO	23
4.3.4 ESTRESSE OXIDATIVO	27
4.3.5 STATUS OXIDANTE TOTAL (TOC) E RELAÇÃO DA TAXA DE OXIDANTES/ANTIOXIDANTES.....	29
4.4 EXAMES ANATOMOPATOLÓGICOS.....	31
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Tripanossomíases são doenças cosmopolitas que acometem humanos e animais. *Trypanosoma brucei*, *T. congolense*, *T. vivax* e *T. evansi*, causam importantes prejuízos econômicos em rebanhos animais em todo o mundo (SILEGUEM et al., 1994). O curso da infecção é variável e depende da espécie de tripanosoma envolvida, seu isolado e do hospedeiro afetado (BISWAS et al., 2010; VERDILLO et al., 2012).

Trypanosoma evansi possui ampla distribuição mundial, ocorrendo na África, Ásia, Europa, América Central e do Sul. Embora somente em 2005 tenha sido descrita a primeira infecção em humanos (JOSHI et al., 2005), existem inúmeros relatos de infecções em animais domésticos como equídeos, bovinos, cães, gatos e pequenos ruminantes, além de camelos, capivaras, quatis, veados e coelhos (CADIOLI et al., 2006a; BISWAS et al., 2010; VERDILLO et al., 2012). Surto recente do *T. evansi* na Europa indicam que as áreas de ocorrência desse hemoprotozoário estão em expansão (GUTIERREZ et al., 2010; TAMARIT et al., 2011).

Episódios de infecção aguda por *T. evansi* ocorrem em toda área tropical e subtropical da América do Sul, cobrindo uma faixa que vai desde a Argentina até o Panamá (WELLS, 1984). No Brasil, o Pantanal mato-grossense é considerado região endêmica (FRANKE et al., 1994), na qual o parasita gera prejuízos da ordem US\$ 2,4 milhões anuais, afetando 6.462 equinos por ano, de uma população de 49.000 animais (SEIDL et al., 1998). Nestas áreas, *T. evansi* pode ser transmitido por insetos hematófagos dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys*, além do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (TUNTASUVAN et al., 2000; DA SILVA et al., 2012). Infecções por tripanossomos patogênicos em rebanhos

animais têm ocorrido com frequência maior fora das áreas endêmicas, sendo os últimos casos relacionados ao *T. evansi* relatados na região Sul do Brasil (RODRIGUES et al., 2005; ZANETTE et al., 2008).

A doença causada por *T. evansi* é caracterizada por rápida perda de peso, febre intermitente, anemia, edema dos membros pélvicos e das partes baixas do corpo e fraqueza progressiva. Em equídeos causa lesões no sistema nervoso central, que culmina com incoordenação dos membros pélvicos, fato que originou sua denominação popular de “mal-das-cadeiras” (MARQUES et al., 2000). Os animais afetados podem morrer dentro de semanas, mas infecções crônicas duram meses (CADIOLI et al., 2006a).

Em ratos Wistar experimentalmente infectados pelo *T. evansi* foi observado anemia intensa e marcada perda de peso, incluindo sinais clínicos neurológicos (CADIOLI, 2005). Adicionalmente, o *T. evansi* é ávido consumidor da glicose plasmática, sendo capaz de causar hipoglicemia severa, achado comum nos animais infectados (MENEZES et al., 2004; CADIOLI, et al., 2006b).

Na necropsia de ratos podem ser observadas mucosas pálidas, edema do tecido subcutâneo, reatividade de órgãos linfóides e atrofia serosa da gordura (OHAERI, 2010). Cérebro, cerebelo e medula espinhal também são afetados e apresentam meningoencefalite e mielite moderada difusa, com provável envolvimento dos nervos (MARQUES, 1996; CADIOLI et al., 2006a), embora lesões similares tenham sido observadas em ratos Wistar (DA SILVA et al, 2012), e em roedores silvestres, nos quais há predomínio de lesões degenerativas (BISWAS et al., 2010). Em ratos Wistar experimentalmente infectados com *T. evansi*, órgãos como adrenais, fígado, baço, coração, rins e encéfalo foram afetados, apresentando degeneração, trombose e infiltrado inflamatório

mononuclear, além do esgotamento das reservas de tecido adiposo (CADIOLI, 2005). Roedores, especialmente ratos, são altamente susceptíveis ao *T. evansi*, o que os tornam modelos experimentais importantes para a doença causada por este tripanossomo (SILVA, et al., 2007; SILVA, et al., 2009).

Supõe-se que muitas lesões relacionadas à infecção pelo *T. evansi* ocorram de modo indireto, pela capacidade deste hemoparasita em substituir suas glicoproteínas variantes de superfícies (GVS), um importante método de evasão do sistema imune, mas que conduz à autoimunidade (MACGREGOR et al., 2012). Em experimentos com ratos infectados pelo *T. evansi*, observa-se a incapacidade destes animais em reduzir e neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) que se formam durante a resposta imunológica, o que determina a ocorrência de estresse oxidativo (MURRAY et al., 2003; SALEH et al., 2009).

Desta forma, a ação direta dos EROs na peroxidação das membranas celulares e proteínas, causam efeitos funcionais deletérios nos animais infectados produzindo lesões que anteriormente eram atribuídas à resposta imunológica policlonal (HABILA et al., 2012). Nesse sentido, a ocorrência da anemia na infecção pelo *T. evansi* pode ser resultado do estresse oxidativo (OMER et al., 2007; MIJARES et al., 2010, HABILA et al., 2012). Omer et al. (2007) observaram que em ratos infectados experimentalmente com *T. evansi* ocorre redução da ação da glutathiona peroxidase e da glicose-6-fostato desidrogenase; Wolkmer et al. (2009) notaram aumento da peroxidação de lipídeos da membrana de eritrócitos. Em camelos naturalmente infectados com *T. evansi*, Saleh et al. (2009) também observaram redução do *status* antioxidante e aumento na peroxidação lipídica tanto no soro quanto nas membranas de eritrócitos.

Diabetes mellitus é caracterizado pela manutenção persistente da hiperglicemia, atribuindo-se ao estresse oxidativo, amplamente estudado, o papel de indutor das complicações do diabetes. São inúmeras as fontes formadoras de EROs durante o diabetes, porém, a autoxidação da glicose parece ter papel central na patogenia, pois os radicais da glicose formados podem reagir com metais e peróxido de hidrogênio, criando hidroxilas, EROs mais reativos e, conseqüentemente, maior dano às proteínas e lipídeos (BAYNES e THORPE, 1999; NIEDOWICZ e DALEKE, 2005).

Wang et al. (2008) observaram que camundongos experimentalmente infectados por *T. brucei brucei* apresentaram hiperglicemia nas fases iniciais da infecção, com posterior queda dos níveis de glicose plasmática devido ao grande consumo pelos tripanossomos. Verificou-se também intensa neoglicogênese para manutenção dos requerimentos energéticos dos animais infectados, o que conduz à cetose, condição metabólica similar ao diabetes tipo 2. Cadioli (2005) observou indícios da existência de intensa neoglicogênese em ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi*.

O diabetes pode favorecer a ocorrência das tripanossomíases por ser considerada enfermidade causadora de imunossupressão (CHIGOZIE e MADUKA, 2011). Entretanto, Igbokwe et al. (1998) e Chigozie e Maduka (2011), observaram que a parasitemia em ratos diabéticos infectados por *T. brucei* e *T. congolense* ocorreu posteriormente aos ratos infectados não-diabéticos, sendo que animais diabéticos infectados pelo *T. congolense* apresentaram maior sobrevivência que os não-diabéticos infectados.

O presente estudo é justificado por não haver na literatura compilada estudos sobre a progressão da doença causada pelo *T. evansi* em ratos Wistar

diabéticos e o estudo do estresse oxidativo nessas condições, observações que podem ser de grande valia para a elucidação da fisiopatogenia de ambas as enfermidades.

2. OBJETIVOS

Estudar a influência do *T. evansi* no estresse oxidativo de ratos Wistar diabéticos bem como no quadro eritroleucocitário, no perfil bioquímico e verificar as alterações histopatológicas resultantes da infecção experimental.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-01024-2013.

Foram utilizados 40 ratos Wistar, com peso médio de 250 gramas, mantidos em ambiente de ciclo claro e escuro de 12/12 horas (período claro iniciado às 7:00 horas) e temperatura de $23,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$.

Quatro grupos com dez animais em cada foram constituídos: Grupo não infectado e não diabético (GC), Grupo infectado e não diabético (GI), Grupo diabético e não infectado (GD) e Grupo diabético e infectado (GDI).

Os animais foram induzidos ao diabetes 20 dias antes da inoculação (-20 DAI), e a confirmação de que os animais tornaram-se diabéticos ocorreu 14 dias antes da inoculação (-14 DAI). O período experimental compreendeu o momento da inoculação do *T. evansi*, dia 0, até o 10 DAI (dias após a inoculação), quando os ratos foram submetidos à eutanásia por apresentarem parasitemia alta e risco iminente de morte.

Todos os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, respeitando-se a proporção de 330 cm²/rato e separados de acordo com seus respectivos grupos. A alimentação constituiu-se de ração comercial¹ e água *ad libitum*.

3.1. Indução do diabetes

O diabetes nos ratos GD e GDI foi induzido por meio de injeção de estreptozotocina na dose de 35 mg/kg via veia peniana, em dose única. O procedimento foi realizado sob anestesia com cloridrato de quetamina (80 mg/kg, IM) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, IM) após jejum de 12 horas.

Os níveis de glicose sanguínea foram monitorados por glicosímetro comercial², diariamente até a confirmação do diabetes, sendo considerados diabéticos, os ratos que apresentaram taxa de glicose sanguínea acima de 250 mg/dL.

3.2. Infecção experimental e determinação da parasitemia

A amostra de *T. evansi* empregada neste estudo foi isolada de um cão naturalmente infectado, atendido junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”/FCAV – Unesp, e é mantida sob congelamento em nitrogênio a -196°C, no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária/FCAV – Unesp.

Para as infecções experimentais foi utilizada uma alíquota criopreservada de sangue/conservante contendo *T. evansi*, a qual foi descongelada em banho-maria a 37°C e homogeneizada com solução de Alsever na proporção de 1:1. A

¹Labina. Purina Alimentos S. A. - SP

² Accu-check, Roche Diagnostics

contagem do número de parasitas viáveis por mililitro de solução sangue/conservante foi feita pelo método descrito por BRENER (1961) de modo a padronizar a amostra. Animais dos grupos GI e GDI foram inoculados com $1,0 \times 10^4$ parasitas de *T. evansi* por via intraperitoneal.

Para a mensuração da parasitemia foram confeccionados esfregaços sanguíneos em lâminas histológicas, previamente limpas e desengorduradas, sendo corados com uma mistura de metanol, May-Grünwald e Giemsa. A contagem de parasitas foi realizada em 50 campos microscópicos em aumento de 1000x.

3.3. Peso e consumo de ração

Pesos individuais foram aferidos com auxílio de balança digital³ a cada três dias. O consumo de ração pelos grupos experimentais foi verificado diariamente.

3.4. Eutanásia e colheita de amostras biológicas

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (80mg/kg, IP) e posteriormente foi realizada toracotomia mediana para a exposição do coração, sendo colhidos, no mínimo, 10 mL de sangue através de punção do ventrículo esquerdo, procedimento que resultou em eutanásia dos animais.

Para cada rato Wistar do grupo GI, foi eutanasiado um do grupo GC, o mesmo ocorrendo entre os ratos dos grupos GD e GDI. As amostras de sangue foram transferidas para tubos adequados e mantidas refrigeradas até a centrifugação a 800 g (4°C, 15 minutos). Amostras de soro e plasma obtidas

³ Toledo Mod. 9094 II – Toledo do Brasil – São Paulo – S.P.

foram aliquotizadas em triplicata e armazenadas a -80°C até o dia das análises, sendo o sangue total colhido com EDTA prontamente processado.

3.5. Exames laboratoriais

A determinação da parasitemia e controle da glicemia foram realizadas a cada três dias. Os demais exames foram realizados apenas nos dias em que os animais foram submetidos à eutanásia, no período matutino, aproximadamente às 9 horas.

Uma alíquota de sangue foi acondicionada em tubo contendo EDTA na proporção de 1 mg/mL de sangue e outra em tubo contendo heparina sódica. Aproximadamente 4,0mL de sangue de cada rato foram acondicionados em tubo sem anticoagulante, para obtenção do soro.

3.5.1. Glicemia

O monitoramento da glicemia foi realizado com o auxílio de glicosímetro comercial² a cada três dias.

3.5.2. Eritroleucometria

Segundo as recomendações e critérios de Jain (1986), com o auxílio de um contador eletrônico de células sanguíneas⁴, foram determinados os níveis totais de leucócitos, eritrócitos, hemoglobina e índice hematimétrico (VCM e CHCM), sendo o volume globular obtido pelo método microcapilar de Strumia (centrifugação 12700 g por 5 minutos). Em esfregaços sanguíneos tingidos com

⁴ Contador eletrônico hematológico veterinário, Mod. BC-2800 vet, Mindray, China.

corante hematológico panótico rápido comercial⁵ foi realizada a contagem diferencial de leucócitos.

3.5.3. Determinações do perfil bioquímico

Todas as análises bioquímicas foram realizadas a 37°C em analisador bioquímico automatizado⁶, previamente calibrado com calibrador comercial⁷ e controles nível I⁸ e II⁹. Utilizando conjunto de reativo comercial, a concentração plasmática de ureia foi determinada pelo método enzimático UV (urease/glutamato desidrogenase)¹⁰; de creatinina pelo método cinético (picrato alcalino)¹¹; de albumina pelo método de verde de bromocresol¹²; bilirrubina pelo método Van der Bergh¹³; ácido úrico pelo método enzimático (uricase/peroxidase)¹⁴; do colesterol pelo método enzimático (oxidase/peroxidase)¹⁵; proteína total pelo método do biureto¹⁶; cálcio total¹⁷ pelo método colorimétrico da cresolftaleína complexona; fósforo inorgânico¹⁸ pelo método colorimétrico do molibdato e aspartatoaminotransferase (AST)¹⁹ e alanina aminotransferase (ALT)²⁰, ambas pelo método cinético IFCC (Federação Internacional de Química Clínica).

⁵Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR.

⁶ BS-200 Chemistry Analyzer. Mindray Bio-Medical, Alemanha.

⁷Calibrator serum, Cód.18011, BioSystems, Barcelona, Espanha.

⁸ Assayed control serum level I, Cód. 18005, BioSystems, Barcelona, Espanha.

⁹ Assayed control serum level II, Cód. 18007, BioSystems, Barcelona, Espanha.

¹⁰ Urea/BUN-UV,Cod. 11516, BioSystems, Barcelona, Espanha.

¹¹Creatinine, Cod.11502, BioSystems, Barcelona, Espanha.

¹²Albumine, Cod.11574, BioSystems, Barcelona, Espanha.

¹³ Bilirrubina Espectrofotométrica Cod. 11510, BioSystems, Barcelona,Espanha

¹⁴Uric acid, Cod.11802, BioSystems, Barcelona, Espanha.

¹⁵Cholesterol, Cód.11505, BioSystems, Barcelona, Espanha.

¹⁶ Proteína, cod.11500c-0011, BioSystems, Barcelona, Espanha.

¹⁷ Cálcio total, cod 04b, Katal Biotecnologia®, Belo Horizonte, Brasil

¹⁸Fósforo,cod 24 b, Katal Biotecnologia®, Belo Horizonte, Brasil

¹⁹Aspartatoaminotransferase, Cod 11531p0510, BioSystems, Barcelona, Espanha

²⁰ Alanina aminotransferase, Cod 11533 f-0508, BioSystems, Barcelona, Espanha

3.5.4. Determinação dos antioxidantes endógenos e capacidade antioxidante total

Além da quantificação da concentração plasmática dos antioxidantes endógenos, albumina, ácido úrico e bilirrubina total, foi determinada a capacidade antioxidante total do plasma (CAT) utilizando-se conjunto de reativo comercial²¹, pelo método de inibição de formação de cátion de ABTS® (2,2'-Azino diethyl-bezothiazolinesulfonicacid) monitorado com padrão antioxidante específico para automatização²², conforme Erel (2004).

A peroxidação plasmática foi determinada pela quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, utilizando conjunto de reativo comercial²³ com auxílio de uma leitora automática de microplacas de 96 poços e absorvância 540 nm²⁴.

3.5.5. Capacidade oxidante total (TOC)

Foi mensurada utilizando-se método colorimétrico desenvolvido por Erel (2005). Neste método, os oxidantes presentes na amostra oxidam o complexo íon ferro-dianisidina a íon férrico. Esta reação de oxidação é incrementada por moléculas de glicerol, abundantes no meio de reação. O íon férrico associado ao laranja de xilenol torna o meio colorido quando este se torna ácido. A intensidade de cor resultante pode ser mensurada por espectrofotometria e relaciona-se à quantidade total de moléculas oxidantes presentes na amostra. O ensaio é calibrado com peróxido de hidrogênio e os resultados são expressos em mmolH₂O₂ equivalente/L.

²¹ Total antioxidant status, cat. NX2332, Randox laboratories, UK.

²² Anti-oxidants standard, cat. NX2615, Randox laboratories, UK.

²³ TBARS Assay Kit, cat. 10009055, Cayman Chemical Company, Printed, USA.

²⁴ Elisa plate analyser-Readwell®

3.6. Exames anatomopatológicos

Após eutanásia, os ratos Wistar foram imediatamente submetidos à necropsia. Foram colhidos adrenal, fragmentos do baço, coração, encéfalo, medula espinhal torácica, fígado, músculos esqueléticos semimembranoso/semitendinoso, pulmão e rins sendo imediatamente fixados por 24 horas em solução de formol a 10% tamponado com fosfatos (pH 7,2). Após fixação, os fragmentos foram transferidos para solução de etanol a 70%. Posteriormente, foram processados segundo técnicas histológicas convencionais de inclusão em parafina, seccionados em amostras de 5 µm de espessura, montados em lâminas histológicas e corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE).

3.7. Análise estatística

Constatada a normalidade, os parâmetros analisados foram submetidos a comparação múltipla de médias pelo teste de Tukey. Entretanto, as médias para basófilos e eosinófilos, por não apresentarem normalidade, foram submetidas ao teste de Dunn para múltipla de médias.

4. RESULTADOS

4.1 Indução do diabetes, infecção experimental e determinação da parasitemia

Não foi constatada nenhuma anormalidade nos ratos que sofreram a indução do diabetes por estreptozotocina nas seis horas posteriores ao procedimento. Aumentos na glicemia nos ratos dos grupos GD e GDI foram observadas a partir do dia -14 DAI indicando que tornaram-se diabéticos.

Similarmente, nenhum dos ratos Wistar apresentou qualquer alteração decorrente do procedimento de inoculação do *T. evansi*. Foram observadas tripomastigotas de *T. evansi* a partir do 4º DAI em ratos do GDI, porém, no grupo GI foram observados apenas a partir do 7º DAI. Animais do GDI apresentaram maiores parasitemias médias durante o período experimental (**Figura 1**). A maior parasitemia foi observada no rato 9 (GDI) com 9141 tripomastigotas de *T. evansi*/50 campos.

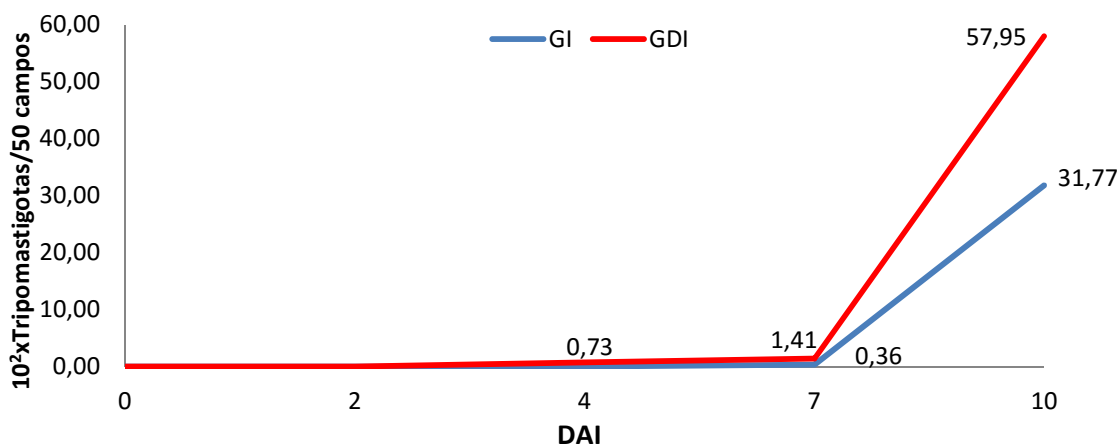


Figura 1 - Parasitemia média observada em ratos Wistar dos grupos experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e diabético infectado com *T. evansi* (GDI) durante o período experimental.

4.2 Peso e consumo de ração

Os ratos dos grupos diabético (GD) e diabético inoculado (GDI) apresentaram pesos menores ao final do período experimental quando comparados aos grupos controle (GC) e inoculado (GI) (**Tabela 1**).

As maiores perdas de pesos médios foram observadas no GDI (-10,2 g) entre o 4 e 7 DAI. Muito embora apresentassem queda de peso abrupta, os animais do GDI mostraram maior recuperação de peso ao final do experimento (**Figura 2**).

Foi observado maior consumo de ração nos animais GD e GDI em relação aos ratos GC e GI (**Figura 3**), sendo altamente significativa ($p < 0,01$) entre o 2° a 5° DAI (**Tabela 2**). Os animais do GDI apresentaram maior consumo de ração em relação ao GC e GI nos 9 DAI.

Tabela 1 - Média e desvio-padrão do peso e de sua variação de peso (gramas) dos ratos Wistar dos grupos controle (GC), diabético (GD), experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e infectado com *T. evansi* e diabéticos (GDI).

DAI	Grupos							
	GC		GD		GI		GDI	
	Peso (g)	Variação (g)	Peso (g)	Variação (g)	Peso (g)	Variação (g)	Peso (g)	Variação (g)
0	485,40±50,76a	0	402,22±50,75b	0	480,00±35,01a ¹	0	398,60±44,75b ¹	0
2	492,00±55,10a	6,60±7,66x	399,78±53,43b ¹	-4,44±32,09x	486,00±34,37a ¹	6,00±5,42x	405,80±27,77b ¹	7,20±21,17x
4	497,20±55,79a ²	5,20±4,83x	400,22±52,39b ¹	0,44±20,66x	487,00±36,10a ¹	1,00±8,12x	406,40±42,62b	0,60±28,35x
7	501,40±58,39a ¹	4,20±5,37x	393,33±50,98b ¹	-6,88±8,07y	487,20±38,83a ¹	0,20±4,47xy	396,20±22,42b ¹	-10,20±30,82xy
10	512,00±62,10a ¹	10,60±6,39xy	392,89±55,27b ¹	-0,44±6,83x ²	497,80±33,50a ¹	10,60±10,45xy	418,20±22,87b ¹	22,00±6,25y ²

a,b,c – Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
 Números iguais sobrescrito indicam níveis de sigficância diferentes. ¹ $p < 0,01$; ² $p < 0,001$

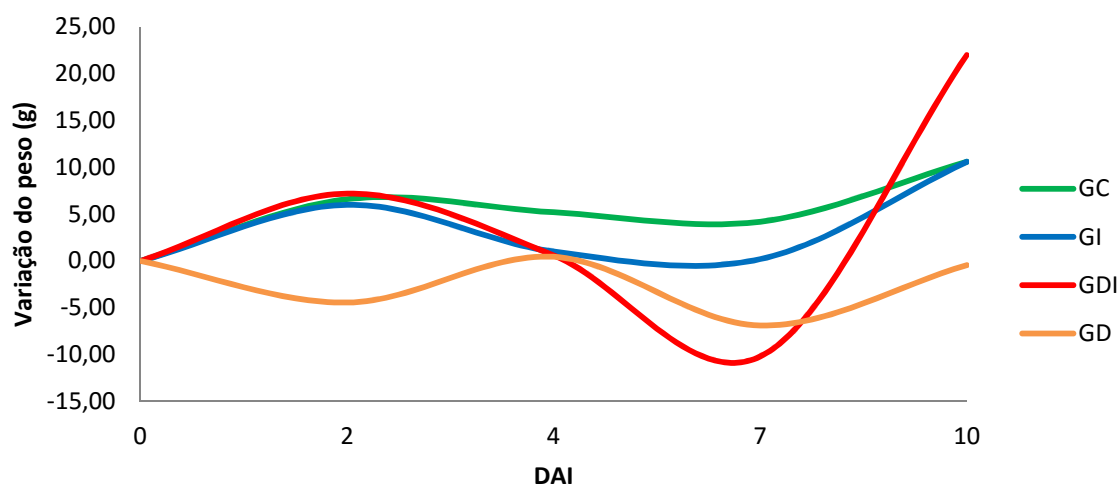


Figura 2 - Variação dos pesos (g) de ratos Wistar do grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético infectado com *T. evansi* (GDI) durante o período experimental.

Tabela 2 - Média e desvio-padrão de peso de ração consumida (gramas) de ratos Wistar dos grupos controle (GC), diabético (GD), experimentalmente infectado com *Trypanosoma evansi* (GI) e infectado com *T. evansi* e diabéticos (GDI).

DAI	Grupos			
	GC	GD	GI	GDI
0	31,20±3,35a ¹	47,44±10,72ab ¹	28,40±1,20ac ^{1,2}	53,60±7,83b ^{1,2}
1	33,50±3,81a ¹	38,07±9,77a	31,00±3,00a ²	48,80±6,50b ^{1,2}
2	30,20±4,68a ¹	69,55±12,03b ^{1,2}	28,60±3,63a ^{1,2}	70,40±5,29b ^{1,2}
3	31,80±4,95a ^{1,2}	69,55±6,43b ²	30,40±3,94a ^{1,2}	66,60±3,32b ¹
4	33,60±4,79a ^{1,2}	54,67±4,63b ¹	38,50±7,55a ²	64,90±4,33b ²
5	33,60±4,79a ^{1,2}	54,67±4,63b ¹	38,50±7,55a ²	64,90±4,33b ²
6	42,20±16,35a	54,22±3,01ab ¹	28,00±1,98ac ^{1,2}	55,20±11,88ab ^{1,2}
7	36,00±6,44a ²	60,00±3,51b ²	31,40±1,65ac ^{1,2}	54,00±6,33ab ¹
8	29,20±3,45a	44,22±17,28ab	22,60±7,61ac ²	59,00±3,96b ²
9	27,60±4,57a ¹	47,55±20,93a	26,00±4,12a ¹	53,80±13,43b ¹
10	28,60±4,53a ¹	68,44±4,68b ^{1,2}	22,60±3,82a ²	59,00±8,81ab ²

a,b,c – Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
 Números iguais sobrescritos letras diferentes indicam níveis de sigficância diferentes. ¹ $p < 0,01$; ² $p < 0,001$

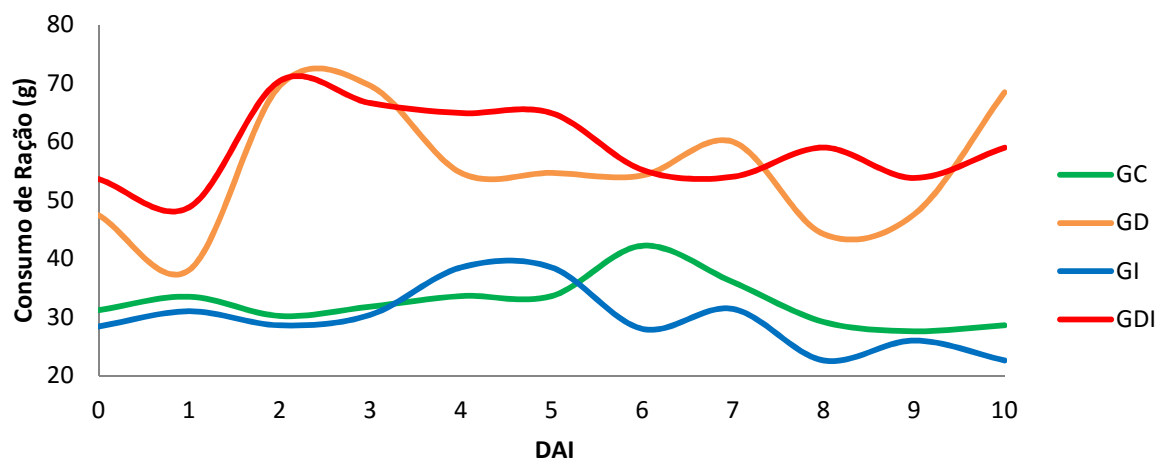


Figura 3 - Consumo de ração (g) pelos ratos Wistar do grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético infectado com *T. evansi* (GDI) durante o período experimental.

4.3 Exames laboratoriais

4.3.1 Controle da glicemia

Entre 0 a 7 DAI notou-se a tendência de GC e GI não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), o mesmo ocorrendo com GD e GDI. No 10 DAI GDI não diferiu estatisticamente do GC (**Tabela 3 e Figura 4**).

Tabela 3 - Glicemia média (mg/dL) dos ratos Wistar do grupo controle (GC), Grupo Diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e infectado com *T. evansi* e diabéticos (GDI) durante o período experimental.

DAI	Grupos			
	GC	GD	GI	GDI
0	106,40±8,11a ¹	480,44±60,90b ²	94,50±12,43a ²	505,70±71,25b ^{1,2}
2	106,40±8,11a ¹	557,89±67,47b ²	94,50±12,43a ²	586,10±30,18b ^{1,2}
4	110,60±7,23a ^{1,2}	557,67±45,97b ²	107,60±8,77a ^{1,2}	502,60±54,86b ¹
7	113,4±10,26a ¹	549,44±74,42b ^{1,2}	109,80±10,02a ²	551,10±45,06b ^{1,2}
10	117,60±11,29a ¹	535,55±38,44b ^{1,2}	84,50±22,21ac ²	453,20±133,55ab ²

a,b,c – Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).
Números iguais sobrescritos letras diferentes indicam níveis de sigficância diferentes. ¹ $p<0,01$; ² $p<0,001$

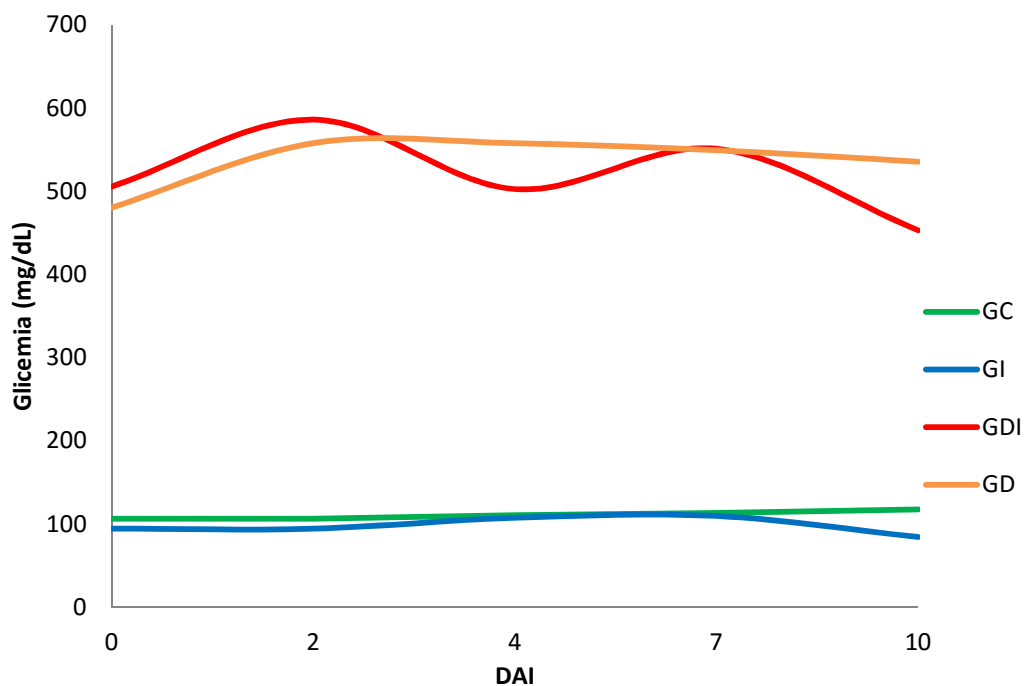


Figura 4 - Glicemia média (mg/dL) dos ratos Wistar do grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético infectado com *T. evansi* (GDI) durante o período experimental.

4.3.2 Eritroleucometria

Os valores para eritrócitos, hemoglobina, plaquetas, volume globular (VG), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) são apresentados na **Tabela 4** e **Figura 5**. Com exceção do VCM, as médias do GC foram maiores que as dos grupos inoculados para eritrócitos, hemoglobina, plaquetas, VG e CHCM. Já o GD diferiu do GDI na hemoglobina, no volume globular (VG) e no volume corpuscular médio (VCM), onde apresentou médias maiores.

Houve diferença entre as médias e desvios-padrão de leucócitos do GDI e GC, onde os animais diabéticos infectados apresentaram as maiores médias. Para neutrófilos, o GDI apresentou médias maiores que o GC e GD que não apresentaram diferença entre si. Em relação aos linfócitos, os GC e GD não apresentaram diferença entre si, mas tiveram médias diferentes do GDI que apresentou média maior. Já a média do GC, para monócitos, foi menor que as médias do GI e GDI e não houve diferença significativa entre eles. Eosinófilos e basófilos não apresentaram diferença entre os grupos (**Tabela 5 e Figura 6**).

Tabela 4 - Médias e desvios-padrão de eritrócitos, hemoglobina, plaquetas, volume globular (VG), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de ratos Wistar dos grupos controle (GC), diabético (GD), experimentalmente infectado com *Trypanosoma evansi* (GI) e infectados com *T. evansi* e diabéticos (GDI).

Parâmetro	Grupos			
	GC	GD	GI	GDI
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	8,79±0,62a ²	8,21±0,59ab	7,44±1,55b	7,01±0,57b ²
Hemoglobina (g/dL)	15,93±0,62a ^{1,2}	14,47±0,78ab	12,09±2,39bc ¹	10,95±1,00c ²
Plaquetas (p/cp/1000X)	850,30±127,60a ^{1,2}	600,70±165,50ab	136,80±100,10b ²	265,30±353,70b ¹
VG (%)	46,60±1,51a ²	41,89±2,52ab	34,33±5,87bc ²	32,75±3,37c ²
VCM (fL)	52,92±2,81a	54,72±1,52ab	50,20±2,65ac	50,31±3,91ac
CHCM (%)	34,34±0,82a ²	32,28±1,21b	32,44±0,72b	31,16±1,38b ²

a,b,c – Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
Números iguais sobrescritos letras diferentes indicam níveis de sigficância diferentes. ¹ $p < 0,01$; ² $p < 0,001$

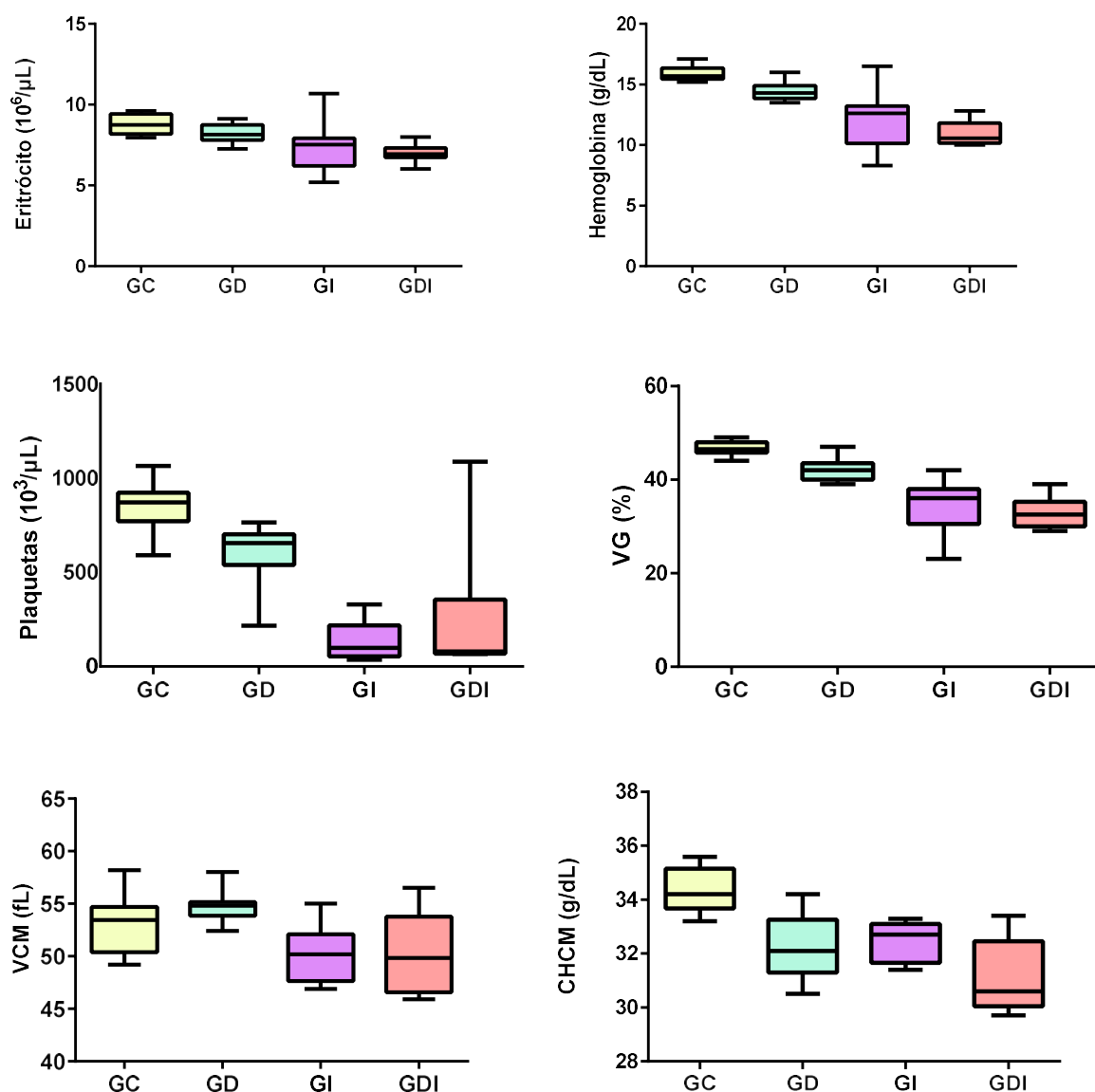


Figura 5 - Médias e desvios padrão das contagens de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), de hemoglobina (g/dL), plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$), volume globular – VG (%), valor corpuscular médio – VCM (fL) e concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM (g/dL) de ratos Wistar composto pelo grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI).

Tabela 5 - Médias e desvios-padrão de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos de ratos Wistar dos grupos controle (GC), diabético (GD), experimentalmente infectado com *Trypanosoma evansi* (GI) e infectados com *T. evansi* e diabéticos (GDI).

Parâmetro	Grupo			
	GC	GD	GI	GDI
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10,01 \pm 1,86a ¹	9,98 \pm 2,57a ¹	27,66 \pm 20,58ab	61,58 \pm 37,11b ¹
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2625,70 \pm 829,20a	2953,78 \pm 1321,30a	4413,78 \pm 3069,90ab	11911,00 \pm 9536,12b
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6681,00 \pm 1565,72a ¹	6090,00 \pm 2145,05a ¹	18917,00 \pm 17127,32ab	42191,00 \pm 26514,19b ¹
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	524,00 \pm 456,14a ¹	600,00 \pm 408,08ab	4220,00 \pm 4102,40b	7725,00 \pm 7705,14b ¹
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	34,30 \pm 74,39a	64,11 \pm 92,02a	251,20 \pm 275,90a	140,75 \pm 260,99a
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	24,40 \pm 77,16a	13,22 \pm 39,67a	124,70 \pm 374,00a	67,13 \pm 189,90a

a,b,c – Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
Números iguais sobrescritos letras diferentes indicam níveis de sigficância diferentes. ¹ $p < 0,01$; ² $p < 0,001$

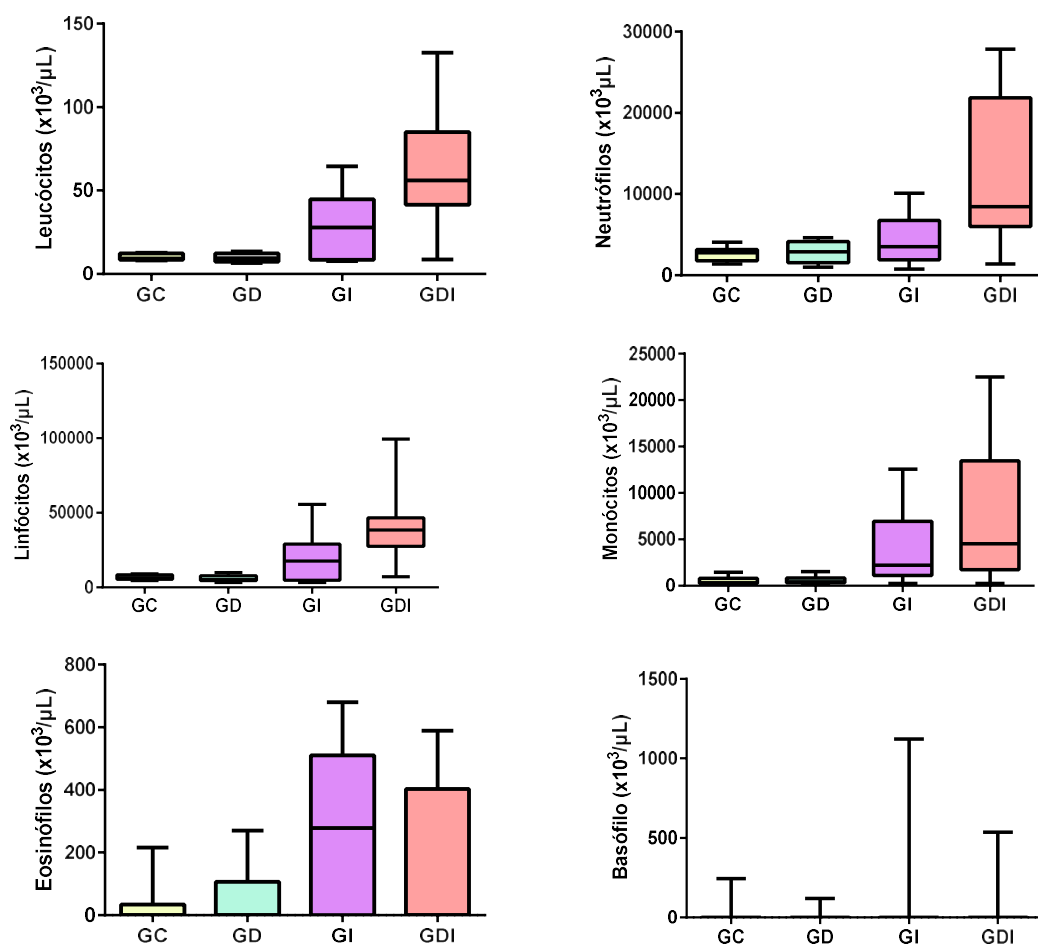


Figura 6 - Médias e desvios padrão das contagens de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), de neutrófilos (μL), dos linfócitos (μL), dos monócitos (μL), dos eosinófilos (μL) e dos basófilos (μL) de ratos Wistar composto pelo grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI).

4.3.3 Perfil bioquímico

As médias da concentração de uréia, creatinina, bilirrubina, colesterol, proteína total, aspartatoaminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) estão apresentadas na **Tabela 6** e **Figuras 7** e **8**. A concentração de ureia foi significativamente maior ($P < 0,001$) no GDI que GC, sendo a concentração de creatinina maior nos grupos inoculados quando comparada ao GC e GD.

Níveis elevados de colesterol foram observados apenas no GD, muito embora as médias para triglicérides tenham sido similares entre GD, GI e GDI.

As atividades séricas das enzimas hepáticas ALT e AST foram maiores no GD. Já os níveis de glicose foram mais elevados no GD e GDI.

Proteína total e globulina não apresentaram médias significativas ($p > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 6 - Médias e desvios-padrão de ureia, creatinina, bilirrubina, colesterol, proteína total, cálcio total, fósforo inorgânico, aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) de ratos Wistar dos grupos controle (GC), diabético (GD), experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e infectados com *T. evansi* e diabéticos (GDI).

Parâmetros	Grupos			
	GC	GD	GI	GDI
Uréia	50,30±6,54a ²	68,61±14,13ab	67,93±31,09ab	93,94±22,33b ²
Creatinina	0,71±0,09a ¹	0,54±0,12a ²	1,43±0,39b ²	2,04±0,79b ^{1,2}
Colesterol	49,29±5,37a	77,12±12,67b ^{1,2}	45,00±16,38a ¹	41,68±13,08a ²
Triglicérides	97,06±43,73a ^{1,2}	443,18±256,81b ¹	215,43±131,84ab	601,80±302,88b ²
Proteína total	63,84±3,53a	62,45±4,43a	65,66±9,84a	65,85±5,36a
ALT	65,13±12,65a ²	243,50±82,08b ²	160,32±147,50ab	156,50±94,27ab
AST	135,03±52,01a ^{1,2}	313,88±162,86b ¹	218,86±83,85ab	329,69±83,91b ²
Glicose	117,60±11,29a	535,55±38,44b ²	83,89±23,47a ²	490,50±76,34b ²
Globulina	41,06±2,52a	42,44±4,54a	47,13±7,84a	47,51±5,39a

a,b,c- Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
 Números iguais sobrescritos letras diferentes indicam níveis de significância diferentes. ¹ $p < 0,01$; ² $p < 0,001$

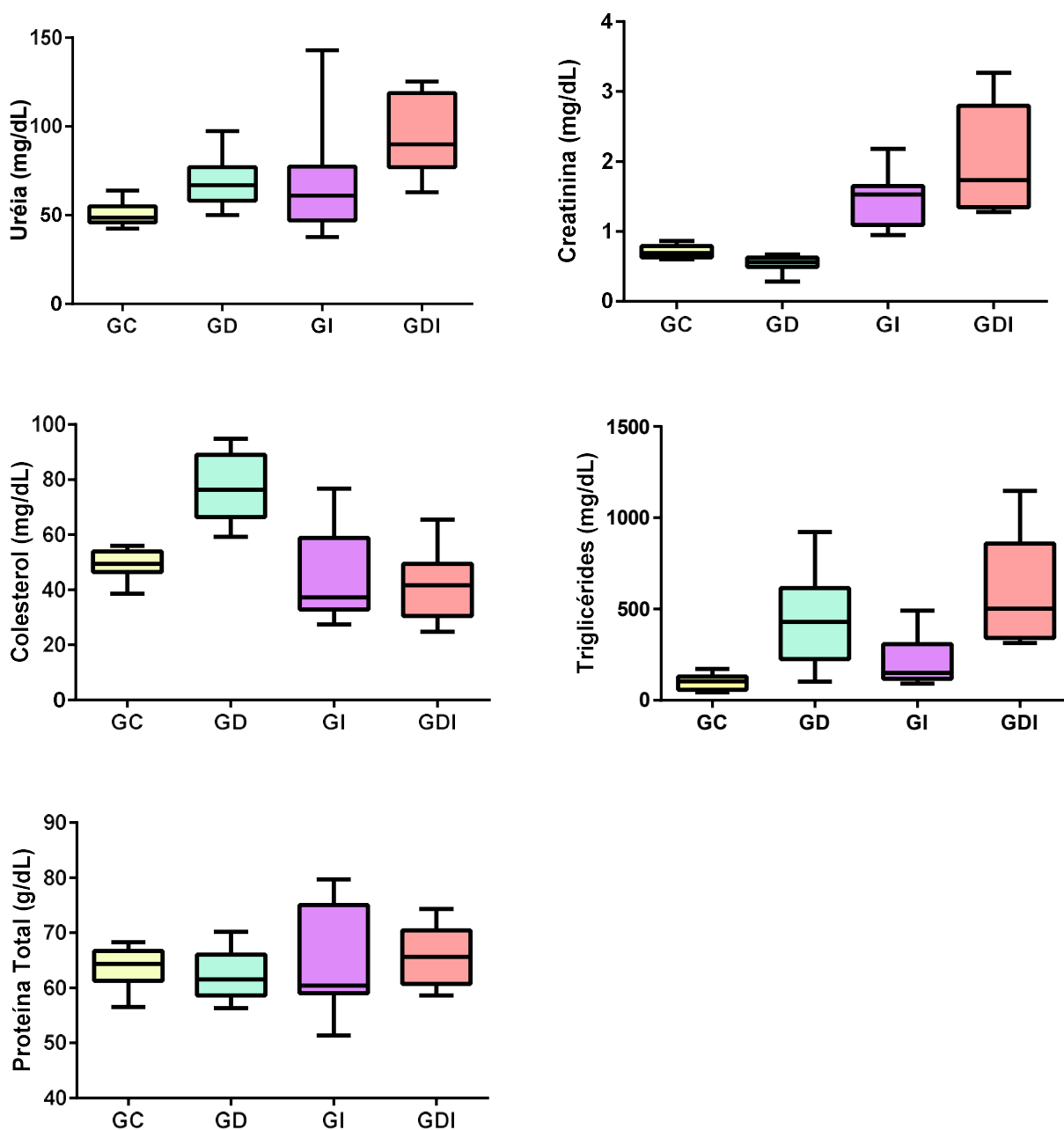


Figura 7 - Médias e desvios padrão da uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL), colesterol (mg/dL) e triglicérides (mg/dL) e proteína total (g/dL) de ratos Wistar do grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI).

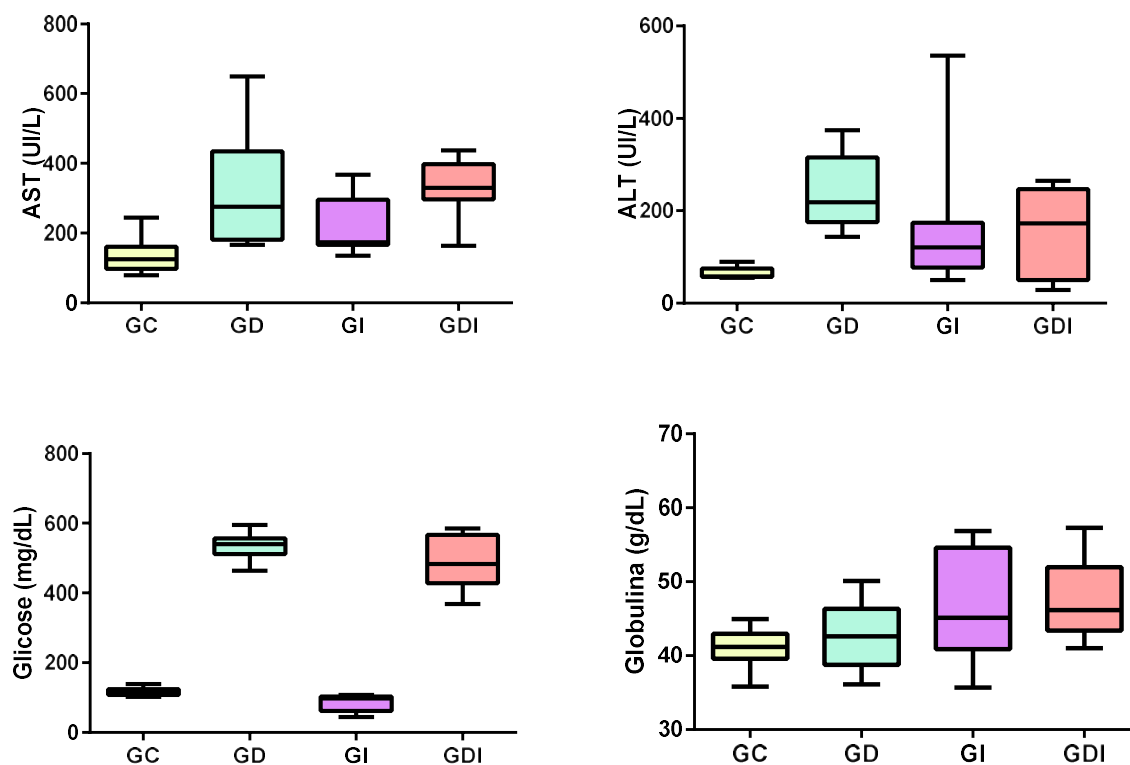


Figura 8 - Médias e desvios padrão da AST (U/L), ALT (U/L), glicose (mg/dL) e globulina (g/dL) de ratos Wistar do grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI).

4.3.4 Estresse oxidativo

A capacidade antioxidante total (TAC) do plasma foi menor no GD quando comparado ao GDI ($p < 0,05$). Níveis de malondialdeído (MDA) foram maiores no GD que no GC ($p < 0,01$) e no GDI ($p < 0,001$). Os dados estão apresentados na **Tabela 8 e Figura 9**.

GC apresentou maiores teores de albumina que GI e GDI ($p < 0,01$). A bilirrubina foi maior no GDI que nos outros grupos. O ácido úrico não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 8 - Médias e desvios-padrão da capacidade antioxidante total do plasma (TAC), malondialdeído (MDA), albumina e ácido úrico de ratos Wistar dos grupos controle (GC), diabético (GD), experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e infectados com *T. evansi* e diabéticos (GDI).

Parâmetros	Grupos			
	GC	GD	GI	GDI
TAC	391,00±337,82a	262,22±236,68ac	762,22±405,21a	937,50±455,59ab
MDA	10,01±5,83a	20,87±4,48b ²	14,00±6,25ab	6,73±5,97a ²
Albumina	22,78±1,38a ¹	20,00±1,67ab	18,53±2,68b ¹	18,34±2,98b ¹
Ác. úrico	0,94±0,36a	1,85±0,88a	1,64±1,70a	1,71±1,15a
Bilirrubina	0,09±0,02a	0,11±0,06a	0,09±0,02ab	0,18±0,06ac

a,b,c– Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
Números iguais sobrescritos letras diferentes indicam níveis de sigficância diferentes. ¹ $p < 0,01$; ² $p < 0,001$

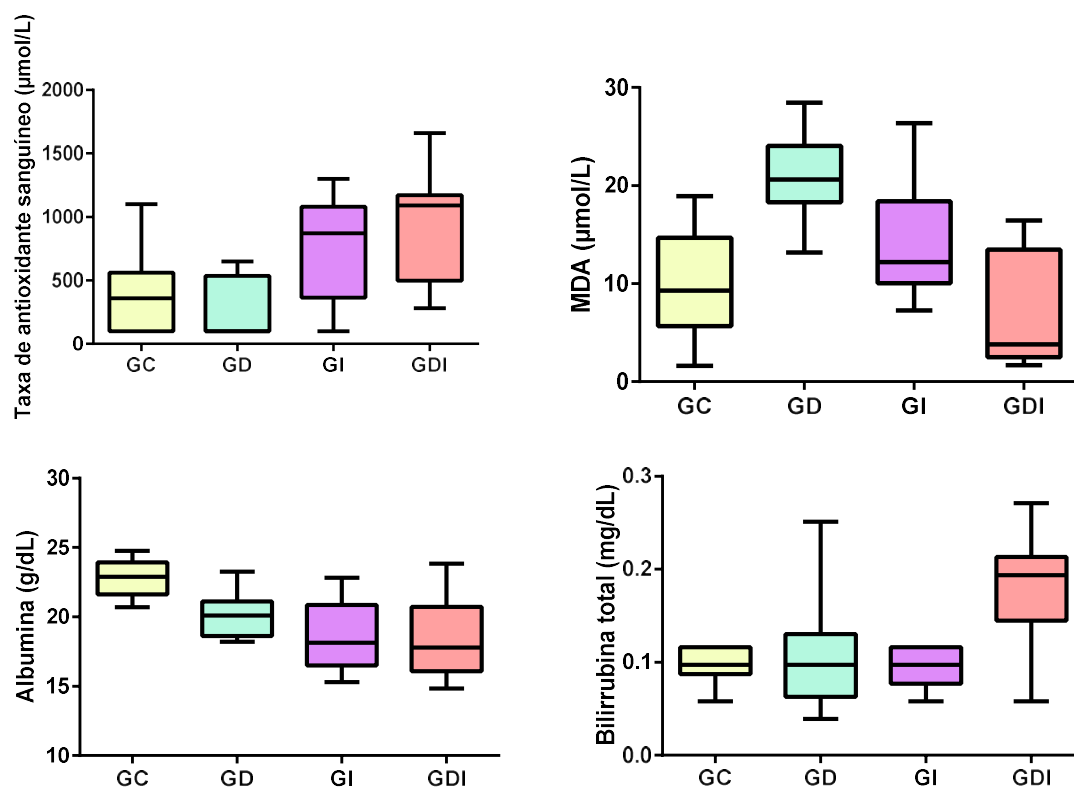


Figura 9 – Médias e desvios padrão do TAC, MDA, albumina (g/dL), ácido úrico (mg/dL) e bilirrubina de ratos Wistar composto pelo grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI).

4.3.5 Status oxidante total (TOC) e relação da taxa de oxidantes/antioxidantes

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as médias dos grupos para a capacidade oxidante total (TOC) do plasma (**Tabela 9 e Figura 10**). Entretanto para a relação da taxa de oxidantes/antioxidantes observou-se que a média do GD diferiu significativamente dos GI ($p < 0,05$) e GDI ($p < 0,05$), já o GC não diferiu significativamente de nenhum grupo (**Tabela 10 e Figura 11**).

Tabela 9 - Médias e desvio-padrão de capacidade oxidante total (TOC) do soro de ratos Wistar dos grupos controle (GC), diabético (GD), experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e infectados com *T. evansi* e diabéticos (GDI).

Parâmetro	Grupos			
	GC	GD	GI	GDI
TOC	12,49±5,47a	18,37±7,26a	11,01±8,26a	14,78±10,33a

a,b,c – Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

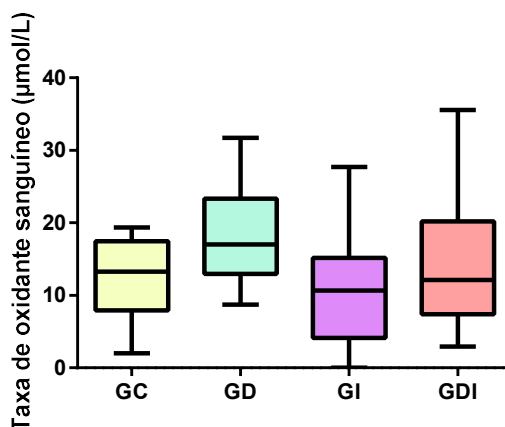


Figura 10 – Média e desvio padrão do TOC de ratos Wistar composto pelo grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI).

Tabela 10 - Médias e desvio-padrão da relação da taxa de oxidantes (TOC) e antioxidantes (TAC) do soro de ratos Wistar dos grupos controle (GC), diabético (GD), experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e infectados com *T. evansi* e diabéticos (GDI).

Parâmetro	Grupos			
	GC	GD	GI	GDI
Relação TOC/TAC	7,61±7,04a	12,36±9,49ab	4,43±8,83ac	2,60±3,02ac

a,b,c – Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

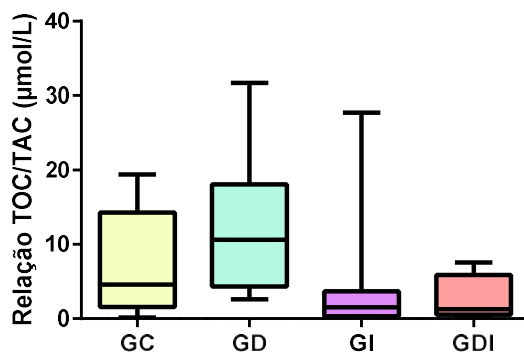


Figura 11 – Média e desvio padrão da Relação TOC/TAC de ratos Wistar composto pelo grupo controle (GC), grupo diabético (GD), grupo experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI).

4.4 Exames anatomopatológicos

A necropsia de todos os animais inoculados (GI e GDI) revelaram hepatoesplenomegalia, além de superfície esplênica irregular e congestão hepática. Nos grupos diabéticos (GD e GDI) os animais apresentaram caquexia e diminuição significativa de gordura abdominal.

Nenhum rato Wistar do grupo GC apresentou alteração macroscópica dos órgãos viscerais.

O resumo dos achados histopatológicos estão condensados no **Quadros 1 e 2**.

Quadro 1 - Achados histopatológicos observados no fígado, baço e pulmão de ratos Wistar do grupo controle (GC), grupo diabético (GD), experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI).

Órgão	Alterações	Grupo (animal nº)
Fígado	Infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta e sinusóides (discreto)	GDI (3, 4, 5, 6) GC (3, 8) GD (1) GI (2, 8, 10)
	Infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta e sinusóides (discreto a moderado)	GDI (7, 10) GI (1, 4, 9)
	Infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta e sinusóides (moderado)	GDI (8, 9) GI (6, 7)
	Hiperplasia de ducto biliar discreta associada a infiltrado inflamatório mononuclear multifocal discreto	GC (2)
	Infiltrado inflamatório mononuclear discreto	GD (3, 5)
Baço	Hiperplasia linfóide discreto á moderado	GDI (3) GD (1, 7, 8, 9)
	Hiperplasia linfóide moderada	GDI (5, 7, 8) GC (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) GD (2, 3, 4, 6)
	Hiperplasia linfóide acentuada	GDI (9, 10) GC (3) GI (4, 9)
	Hiperplasia linfóide associada à necrose	GDI (4, 6) GD (5) GI (1, 2)
	Perda da arquitetura normal	GI (6, 10)
	Perda da arquitetura normal e necrose linfóide moderada	GI (7,8)
Pulmão	Presença de hiperplasia de tecido linfóide associado aos brônquios	GDI (8, 10) GC (8) GD (1, 9) GI (8)
	Presença de macrófagos espumosos	GD (2, 6)
	Septos alveolares com infiltrado misto moderado a acentuado associado a células gigantes (pneumonia)	GD (3)

Quadro 2 - Achados histopatológicos observados na adrenal, rim, SNC e coração de ratos Wistar grupo controle (GC), grupo diabético (GD), experimentalmente infectado com *T. evansi* (GDI) e grupo diabético e infectado (GDI).

Órgão	Alterações	Grupo (animal nº)
Adrenal	Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal	GDI (8, 10) GC (3)
Rim	Pelve renal com infiltrado eosinofílico focal discreto	GC (3)
	Infiltrado inflamatório mononuclear discreto a moderado multifocal	GD (2)
	Áreas multifocais de congestão	GC (1)
SNC	Meninges com congestão	GDI (4)
	Infiltrado inflamatório mononuclear, células gigantes e eosinófilos focal discreto	GC (6)
Coração	Áreas multifocais de congestão	GC (1)

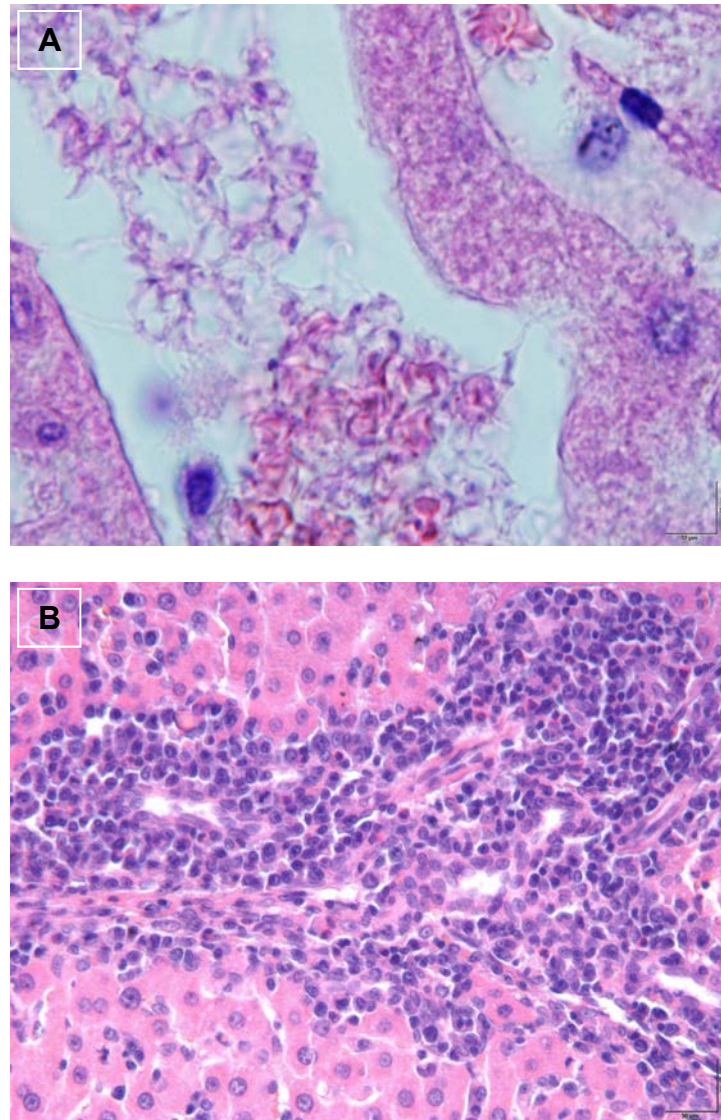


Figura 12 – Histopatologia de fígados de ratos Wistar experimentalmente infectados com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI). A – trombo em capilar sinusóide com presença de *T. evansi* (GDI5, HE, obj 100x); B – Espaço porta com infiltrado inflamatório mononuclear (GI7, HE, obj 100X).

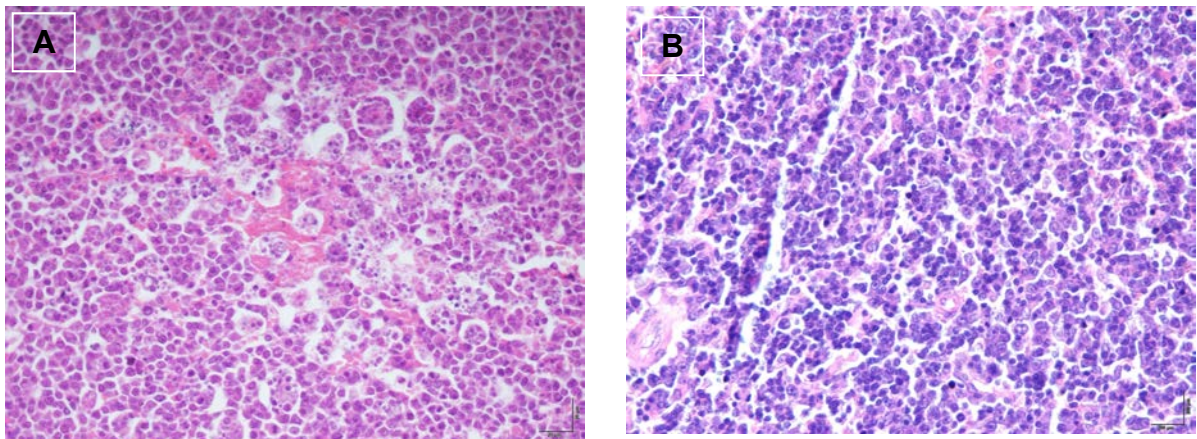


Figura 13 – Histologia de baços de ratos Wistar experimentalmente infectado com *T. evansi* (GI) e grupo diabético e infectado (GDI). A – necrose polpa branca (GI1,HE, obj 40X); B – Hiperplasia linfoide (GDI9, HE, obj 40X).

5. DISCUSSÃO

A estreptozotocina (EZT) é agente quimioterápico, usado em tratamentos de tumores carcinoides e endócrinos do pâncreas. Sua utilização visa diminuir a ação da adeninanicotinamida das células β -pancreáticas, assim, inibe a síntese de DNA, resultando em bloqueio da produção de insulina, que não se pode reverter. A EZT proporciona um quadro grave de hiperglicemia, induzindo diabetes em animais experimentais, comparáveis ao diabetes tipo 1 em humanos (CARVALHO et al., 2003). Completando esta ideia, Kirsten et al. (2010) indicam que o modo de indução do diabetes, realizado quimicamente em ratos, acontece logo após a eliminação seletiva das células β -pancreáticas. Em dosagens sub-diabetogênicas (40mg/kg) a EZT é capaz de gerar insulite pancreática, somado à morte progressiva das células β resultando também em diabetes mellitus (KIRSTEN et al., 2010).

A indução do *status* diabético a partir da administração da EZT tem se mostrado um método bem confiável na literatura, incluindo a obtenção das principais características da patologia, como a hiperglicemia e o estresse oxidativo. Do mesmo modo, o procedimento utilizado no presente trabalho alcançou resultados favoráveis de indução, considerando o parâmetro de diabetes definido no início do estudo onde animais que receberam dose de 35 mg/kg apresentaram aumento de glicose no plasma, com valores de 440 ± 10 mg/dL, sendo considerados diabéticos. Metodologia similar de indução do diabetes pela EZT foi utilizada por Cintra et al. (2014) obtendo com sucesso *status* diabético em ratos Wistar.

O isolado de *T. evansi* utilizado resultou em infecção nos ratos Wistar deste experimento. Wolkmer (2009) observou período pré-patente de 24h, muito

embora devamos considerar aspectos como a patogenicidade do isolado, bem como métodos de infecção experimental e diferenças no *status* imunológicos dos animais experimentais. No nosso caso, a infecção experimental dos ratos Wistar ocorreu a partir da inoculação de doses de uma alíquota criopreservada obtida do sangue de ratos infectados experimentalmente com o *T. evansi* por via intraperitoneal. Em ratos do GDI, o período pré-patente foi a partir do 4º DAI, enquanto que nos ratos do GI, ocorreu a partir do 7º DAI. Contudo, em diversos estudos anteriores, pesquisadores reportaram que o período pré-patente para a infecção por *T. evansi*, em ratos inoculados pela via intraperitoneal, pode variar entre 1,5 e 5,6 dias (OLIVEIRA et al., 1989; QUEIROZ et al., 2001; DOYLE et al., 2007) dependendo da dose infectante. Por outro lado, Queiroz et al. (2000), não verificaram essa correlação com a dose e período pré-patente. Carmona et al. (2006) relataram um período pré-patente de seis dias independentemente da cepa utilizada.

Essa diferença, entre os grupos, pode ter ocorrido em função de diversos fatores, incluindo fatores imunológicos e metabólicos. De uma perspectiva imunológica, considerando que a diabetes caracteristicamente deprime o sistema imune, é esperado que o período pré-patente do grupo acometido pela patologia desenvolva o parasita de maneira mais rápida. Em uma outra vertente, a partir de uma perspectiva metabólica, os níveis elevados de glicemia poderiam gerar um ambiente favorável à proliferação do parasita, fato que explica a parasitemia ter sido observada mais precocemente e com maior concentração no GDI que em GI (Figura 1). Isto estaria de acordo com estudos sobre a parasitemia de *T. cruzi* (AMOLE et al., 1985; TANOWITZ et al., 1988). A partir da análise do presente trabalho, foi notável o aumento

encontrado na ingestão da ração entre os grupos no qual a estreptozotocina foi administrada (GD e GDI) em relação aos grupos GI e GC (Figura 3).

As taxas significativamente mais altas de ingestão alimentar em ambos os grupos GD e GDI ocorreram no mesmo período, entre o 2º ao 5º DAI. Este fato, pode indicar que neste determinado período do desenvolvimento do *status* diabético ocorreu a fase de maior déficit energético por estes animais, que se reflete em um comportamento compensatório, no qual há maior ingestão de ração pelos animais. Todavia, em relação ao peso corporal destes animais, os grupos que apresentaram uma significativa perda de peso médio ao término do experimento, em relação ao controle, foram os grupos GD e GDI (Tabela 1). Isto está de acordo com os achados de Clark (2003), que observou que os ratos controle de seu experimento ganharam consideravelmente mais peso corporal que os ratos diabéticos, e que atribuiu o fato aos efeitos causados pela diabetes.

Quando se fala de *T. evansi*, a hipoglicemia é enxergada como relevante no contexto clínico-laboratorial, pois sua associação pode ser interpretada junto à gravidade patológica (MOREIRA, 1985; SINGH & JOSHI, 1991; KATUNGUKA-RWAKISHAVA et al., 1992). *T. evansi* requer grandes quantidades de glicose para se manter, com vista em seu metabolismo (CADIOLI et al., 2006). A glicose usada pelo parasita sofre degradação através de etapas de oxidação controladas, visando o fornecimento de energia química na forma de ATP e de NADH, através da glicólise oxidativa, resultando piruvato como produto final (MILLER, 1995, VOET, et al., 2000).

Era esperado que a glicemia de ambos os grupos, GD e GDI, que receberam as doses únicas de estreptozotocina, mantivessem-se acima de 250

mg/dL, de modo a manter a condição diabética proposta pelo trabalho, enquanto os outros dois grupos (GC e GI), mantivessem níveis de glicemia menores. Neste quesito, nossos resultados foram positivos, de modo que ambos os grupos mantiveram a condição definida como diabética até o final do experimento, quando então foram eutanasiados. Além disso, as flutuações observadas na figura 4, referente aos níveis glicêmicos médio dos quatro grupos podem ser relacionadas a outros aspectos inerentes ao experimento.

No gráfico (Figura 4) é possível observar uma fase inicial ascendente da glicemia referente aos grupos GDI e GD, indicando o curso do desenvolvimento da condição diabética a partir da administração de EZT, enquanto os níveis glicêmicos referentes aos grupos GC e GI se mantêm estáveis. Isto indica um desenvolvimento satisfatório da indução do diabetes, a partir da dose única pela veia peniana de EZT, utilizada no experimento. Além disso, observa-se dois declínios nos valores glicêmicos referentes ao grupo GDI (Figura 4), sendo o primeiro mais pontuado no 4º DAI e o segundo se iniciando no 7º DAI. Como sugerido por SINGH e JOSHI (1991), a redução da glicemia pode estar associada ao rápido consumo da glicose pelo parasita e aos processos imunológicos que dispara, como febre. Deste modo, a queda glicêmica observada no 4º DAI pode estar diretamente relacionada à primeira observação dos indicadores de infecção pelo *T. evansi*, enquanto que a queda que se inicia no 7º DAI pode estar relacionada ao aumento da parasitemia (Figura 1).

De maneira semelhante, a queda glicêmica iniciada no 7º DAI no GI (Figura 4), pode estar diretamente relacionada com o primeiro indício de infecção

pelo *T. evansi* e com o aumento abrupto de sua parasitemia (Figura 1). Tais resultados estariam de acordo com a hipótese de Boero (1974), na qual a glicemia possuiria uma correlação negativa com a parasitemia.

Ambos os grupos infectados pelo *T. evansi* apresentaram todos os parâmetros hematológicos, com exceção do VCM, significativamente menores que os do grupo controle, indicando anemia. Isto está de acordo com outros estudos sobre tais parâmetros, nos quais os tripanossomas causaram consideráveis alterações no perfil hematológico do hospedeiro, promovendo a redução do VG, da contagem de hemácias e da taxa de hemoglobina (BOERO, 1974; SILVA et al., 1995b; POCHINI, 2000). Além disso, a anemia tem sido um achado consistente, como relatado previamente, em diversos tipos de hospedeiros de *T. evansi* (JAKTAR e PUROHIT, 1971; OSHIRO et al., 1989; MONZON et al., 1991; AQUINO, 2007).

Anschau (2011), apresenta em seu trabalho uma resposta leucocitária onde não houve evidência de um padrão alterado em ratos Wistar inoculados pelo *T. evansi*. Em uma contagem diferencial de leucócitos proposta por Monzón et al. (1990), Katunguka-Rwakishaya et al. (1992) e Omer (2007), pode-se notar leucocitose e linfocitose em equinos, ovinos e ratos, nesta ordem. A abordagem investigativa apresenta indícios de que o padrão de respostas leucocitária nos animais infectados com parasita *T. evansi* possui um alto grau de variabilidade, de modo que sugere que estes exames possuem limitado índice de relevância quando se trata do diagnóstico e da patogenicidade desta hemoparasitose. Teixeira (2010), trabalhando com bovinos inoculados com *T. evansi*, não encontrou diferenças entre seus grupos experimentais no que tange as quantidades de leucócitos, linfócitos, basófilos, eosinófilos e

neutrófilos presentes no plasma sanguíneo. Notou-se apenas uma sutil diminuição de monócitos em ambos os grupos, inoculados e controle. Desse modo, não foi possível encontrar um padrão de resposta leucocitária. Entretanto, no presente trabalho a quantidade de leucócitos, neutrófilos e linfócitos em GDI foram significativamente maiores que no controle, incluindo o grupo GD com relação aos neutrófilos e linfócitos. Já a contagem de monócitos indicou quantidades maiores em GDI e GI do que no grupo controle.

Os parâmetros bioquímicos de ratos Wistar sofrem influências de inúmeros fatores, como o espaço em que foi feita a coleta, o método de contenção, a anestesia, o nível de estresse, idade e sexo. O local e os métodos utilizados para tratar a amostragem têm que permanecer ininterruptos, para que não haja possíveis variáveis na análise do resultado. A coleta por exsanguinação, com o uso de anestesia, possibilita que se obtenham os maiores volumes de sangue, facilitando a abordagem analítica da amostra, podendo ser efetuadas iniciando pela veia cava caudal, aorta, ou ainda por punção cardíaca (ORLANDINI, 2012).

Os teores séricos de AST e ALT aparecem significativamente elevados no GD em relação a todos os outros grupos. O aumento dessas enzimas pode estar associado à danos hepáticos relacionados à hepatites, cirrose e em esteatose não-alcóolica, sendo que esta última, pode ser promovida pela obesidade, hiperglicemia ou diabetes (WANG et al., 2009). Os níveis de colesterol aparecem significativamente elevados apenas no grupo GD. Observações semelhantes foram feitas por Silva et al. (2011) em trabalhos com hamsters.

A uréia apresentou níveis significativamente mais elevados no grupo GDI quando em comparação ao grupo controle. Já a creatinina apresentou valores consideravelmente maiores em GDI e GI que em GC e GD.

Os níveis de globulina e de proteína total não demonstraram diferenças significativas entre os grupos indicando que apesar de infectados com *T. evansi*, os animais não sobreviveram tempo suficiente para produzir anticorpos inespecíficos e em grande quantidade, fatos comumente observados nas infecções naturais e experimentais por *T. evansi*.

De acordo com Rocha et al. (2006), um dos possíveis mecanismos bioquímicos da diabetes que poderia levar à hiperglicemia se relaciona à ativação de isoformas de proteína C quinase (PKC). Diversos estudos indicam que um aumento nos níveis da glicose pode levar a ativação da via de síntese de novo de diaciglicerol (DAG), que por sua vez pode ativar diversas isoformas de PKC, que possuem funções sinalizadoras intracelulares, além de possui papel na regulação de várias funções vasculares. A ativação de PKC causada pela glicose, pode ainda levar a ativação de NADPH oxidases na superfície de células vasculares, resultando em aumento na formação de EROS. Além disso, alguns estudos sugerem que a acumulação da MDA em tecidos ou fluidos biológicos pode servir de indicação da extensão da geração de radicais livres, estresse oxidativo e perda de tecido (GUTTERIDGE, 1995).

Tal fato talvez possa explicar os maiores níveis de MDA no grupo GD em relação aos grupos GC ou GDI, assim como dos valores significativamente maiores da relação da taxa de oxidantes/antioxidantes do grupo GD em relação aos grupos GI e GDI. Por este raciocínio, quanto maior a glicemia do organismo, maior a potencialidade deste em produzir EROs,

favorecendo desta maneira, o desenvolvimento do estresse oxidativo. Assim, o grupo GD, com a maior glicemia dentre os grupos teria níveis oxidativos superiores em relação ao GC e GDI, que está infectado pelo *T. evansi*, muito provavelmente por sua capacidade em consumir glicose (CADIOLI et al., 2006b).

A albumina apresentou níveis significativamente menores nos grupos GDI e GI em relação ao controle. De acordo com Kaneko (1997), esta é considerada uma proteína de fase aguda negativa, na qual os valores séricos possuem uma tendência a decrescer em condições inflamatórias.

O grupo GDI apresentou uma capacidade antioxidante total consideravelmente maior em relação ao GD, e níveis de bilirrubina significativamente maiores em relação a todos os outros grupos.

A bilirrubina é considerada uma substância com alta capacidade antioxidante, como confirmado por Belanger et al. (1997). Estes, em uma pesquisa utilizando seres humanos recém-nascidos, evidenciaram que a retirada mecânica de bilirrubina por meio do procedimento de exsanguineotransfusão, causava uma considerável redução da capacidade antioxidante total do plasma. Além disso, Drury et al. (1998) demonstraram uma relação entre a capacidade antioxidante total do plasma e os níveis de bilirrubina, como é possível ser observado em nossos resultados.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de ácido úrico e sobre a capacidade de oxidação total entre os grupos.

A partir da análise dos dados anatomopatológicos, notou-se que todos os indivíduos, independente do grupo ao qual pertenciam, apresentaram hiperplasia ou perda de arquitetura do baço, em associação ou não, com

necrose. Isto poderia indicar alguma anormalidade na linhagem dos animais que foram utilizados nos experimentos.

No GDI, todos os indivíduos apresentaram anomalias hepáticas como, sinais de infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta e sinusóides, com a intensidade variando de discreta a moderada. Outras anomalias também foram observadas, entretanto, de maneira pontual entre os indivíduos, como meningite com congestão, infiltrado inflamatório mononuclear multifocal na adrenal e presença de hiperplasia de tecido linfóide associado aos brônquios.

Semelhantemente ao grupo anterior, todos os indivíduos pertencentes ao GI, também apresentaram sinais hepáticos de infiltrado inflamatório mononuclear nos sinusóides e espaço porta, com intensidade variando de discreto a moderado. Um dos indivíduos deste grupo também apresentou pulmões com hiperplasia de tecido linfóide associado aos brônquios. Além disso, quatro indivíduos deste grupo foram os únicos que apresentaram uma perda de arquitetura normal do baço, de modo que todos os outros indivíduos, inclusive dos outros grupos, apresentaram apenas hiperplasia linfóide no baço.

Já o GD, apresentou um alto índice de anomalias relacionadas aos pulmões. As anomalias observadas neste órgão foram: presença de macrófagos espumosos focal, septos alveolares com infiltrado misto associado a células gigantes e presença de hiperplasia de tecido linfóide associado aos brônquios.

O GC não demonstrou padrões de anomalias nos órgãos analisados, como ocorreu nos outros grupos. Deste modo, a análise do grupo controle mostrou apenas anomalias pontuais, presentes em um ou dois indivíduos, nos rins, coração, pulmões, adrenal e sistema nervoso central. Já no grupo diabético, as

anomalias observadas surgiram nos pulmões e rins, em dois indivíduos e no fígado de três indivíduos.

6. CONCLUSÕES

1) GD manteve os maiores índices oxidativos em comparação ao GDI e ao GI. Com isto, hipotetiza-se que a infecção pelo parasita *T. evansi* atuou na diminuição dos indicadores oxidativos nos grupos em que foi inoculado, provavelmente em função do fato dele se alimentar de glicose e assim, diminuir a glicemia dos indivíduos. Deste modo, a infecção pelo parasita favoreceu a diminuição do estresse oxidativo causado pelo modelo de diabetes proposto.

2) A infecção com *T. evansi* nos grupos em que foi inoculado, inclusive o diabético, causou uma significativa redução de todos os parâmetros hematológicos, exceto VCM, o que estabeleceu nestes indivíduos, a condição anêmica, um dos principais sintomas da parasitose.

3) A hiperglicemia inerente ao status diabético, induzido pela estreptozotocina pode ter desencadeado lesão hepática no GD, como indicado pelos elevados teores séricos de AST e ALT. Deste modo, a infecção com *T. evansi* no GDI poderia ter protegido os indivíduos do desenvolvimento de tal condição.

7. REFERÊNCIAS

- ANSCHAU, V. (2011). Hematológicos, estresse oxidativo e parâmetros. Universidade do Estado de Santa Catarina–UDESC Centro de Ciências Agroveterinárias-CAV. Mestrado em Ciência Animal.
- AQUINO, L. P. C. T., MACHADO, R. Z., LEMOS, K. R., MARQUES, L. C., GARCIA, M. V., & BORGES, G. P. (2010). Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(2), 112-118.
- BAYNES, J. W., & THORPE, S. R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48(1), 1-9.
- BELANGER, S.; LAVOIE, J.-C.; CHESSEX, P. Influence of bilirubin on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants. **Neonatology**, v. 71, n. 4, p. 233-238, 1997.
- BISWAS, D., CHOUDHURY, A., & MISRA, K. K. (2010, June). Histopathology of *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* infection in bandicoot rat. II. Brain and choroid plexus. In *Proceedings of the Zoological Society* (Vol. 63, No. 1, pp. 27-37). Springer-Verlag.
- BRENER, Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. 1961. Tese (Livre Docência). Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia e Farmácia. 1961.
- CADIOLI, F. A., MARQUES, L. C., MACHADO, R. Z., ALESSI, A. C., AQUINO, L. P. C. T., & BARNABÉ, P. A. (2006a). Experimental *Trypanosoma evansi* infection in donkeys: hematological, biochemical and histopathological changes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(5), 749-756.

CADIOLI, F., BARNABÉ, P., AQUINO, L., & MARQUES, L. (2006b). Consumo de glicose in vitro por hemácias de rato e por *Trypanosoma evansi*. *ARS Veterinária*, 22(3), 174-178.

CADIOLI, F.A. Estudos metabólicos, hematológicos e anatomopatológicos em ratos Wistar infectados com *Trypanosoma evansi*. 2005. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – área de Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CINTRA, L. T. A., SAMUEL, R. O., AZUMA, M. M., RIBEIRO, C. P., NARCISO, L. G., DE LIMA, V. M. F., GOMES-FILHO, J. E. (2014). Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clinical oral investigations*, 18(9), 2123-2128.

DA SILVA, A. S., OLIVEIRA, C. B., BERTONCHELI, C. M., SANTOS, R. P., BECKMANN, D. V., WOLKMER, P., MONTEIRO, S. G. (2012). Clinical signs and histopathology of brain, spinal cord and muscle of the pelvic limb of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Pathology-Research and Practice*, 208(1), 39-44.

EREL, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37(4), 277-285.

EREL, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.

FRANKE, C. R., GREINER, M., & MEHLITZ, D. (1994). Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Tropica*, 58(2), 159-169.

- GUTIERREZ, C., DESQUESNES, M., TOURATIER, L., & BÜSCHER, P. (2010). *Trypanosoma evansi*: recent outbreaks in Europe. *Veterinary parasitology*, 174(1), 26-29.
- HABILA, N., INUWA, M. H., AIMOLA, I. A., UDEH, M. U., & HARUNA, E. (2012). Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. *Research in veterinary science*, 93(1), 13-17.
- WEISS, D. J., & WARDROP, K. J. (Eds.). (2011). *Schalm's veterinary hematology*. John Wiley & Sons. Chap.2, p.20-86.
- JOSHI, P. P., SHEGOKAR, V. R., POWAR, R. M., HERDER, S., KATTI, R., SAL.KAR, H. R., & TRUC, P. (2005). Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73(3), 491-495.
- MACGREGOR, P., SZÖŐR, B., SAVILL, N. J., & MATTHEWS, K. R. (2012). Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: an elegant balancing act. *Nature Reviews Microbiology*, 10(6), 431-438.
- MARQUES, L.C. Infecção experimental em equinos com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae). 1996. 136 f. Tese de Livre Docência [Medicina Veterinária – área de Patologia Animal] - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- MARQUES, L. C., MACHADO, R. Z., ALESSI, A. C., AQUINO, L. P. C. T., & PEREIRA, G. T. (2000). Experimental infection with *Trypanosoma evansi* in horses: clinical and haematological observations. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 9(1), 11-15.

- DE MENEZES, V. T., QUEIROZ, A. O., GOMES, M. A. M., MARQUES, M. A. P., & JANSEN, A. M. (2004). *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss-Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. *Parasitology research*, 94(3), 193-200.
- MURRAY, R.K., & RIVERA MUNOZ, B. (2003). Harper's illustrated biochemistry. McGraw-Hill, 622-701.
- NIEDOWICZ, D. M., & DALEKE, D. L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell biochemistry and biophysics*, 43(2), 289-330.
- OHAERI, C. C. (2010). Histological Changes in Organs of Rats Infected with *Trypanosoma congolense*. *Research Journal of Animal Sciences*, 4(1), 50-52.
- OMER, O. H., MOUSA, H. M., & AL-WABEL, N. (2007). Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary parasitology*, 145(1), 142-145.
- RODRIGUES, A., FIGHERA, R. A., SOUZA, T. M., SCHILD, A. L., SOARES, M. P., MILANO, J., & BARROS, C. S. (2005). Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos¹. *Pesq. Vet. Bras*, 25(4), 239-249.
- SALEH, M. A., AL-SALAHY, M. B., & SANOUSI, S. A. (2009). Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary parasitology*, 162(3), 192-199.
- SEIDL, A., MORAES, A. S., AGUILAR, R., & SILVA, M. S. (1998). A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Preventive veterinary medicine*, 33(1), 219-234.

- SILEGHEM, M., FLYNN, J. N., DARJI, A., BAETSELIER, P. D., NAESSENS, J., & KIERSZENBAUM, F. (1994). African trypanosomiasis. *Parasitic infections and the immune system.*, 1-51.
- SILVA, A. S. D., CEOLIN, L. V., OLIVEIRA, C. B., MONTEIRO, S. G., & DOYLE, R. L. (2007). Infecção via oral por *Trypanosoma evansi* em animais de laboratório. *Ciência rural*, 37(3), 897-900.
- SILVA, A. S. D., WOLKMER, P., GRESSLER, L. T., OTTO, M. A., BESS, F., TAVARES, K. C. S., & MONTEIRO, S. G. (2009). Patogenicidade de um isolado de *Trypanosoma evansi* em ratos inoculados com o parasito em sangue in natura e criopreservado. *Ciência rural*, 39(6), 1842-1846.
- TAMARIT, A., TEJEDOR-JUNCO, M. T., GONZÁLEZ, M., ALBEROLA, J., & GUTIERREZ, C. (2011). Morphological and biometrical features of *Trypanosoma evansi* isolates from an outbreak in mainland Spain. *Veterinary parasitology*, 177(1), 152-156.
- TUNTASUVAN, D., MIMAPAN, S., SARATAPHAN, N., TRONGWONGSA, L., INTRARAKSA, R., & LUCKINS, A. G. (2000). Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine–biotin immunohistochemistry. *Veterinary parasitology*, 87(2), 223-230.
- VERDILLO, J. C. M., LAZARO, J. V., ABES, N. S., & MINGALA, C. N. (2012). Comparative virulence of three *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes in the Philippines. *Experimental parasitology*, 130(2), 130-134.
- WANG, Y., UTZINGER, J., SARIC, J., LI, J. V., BURCKHARDT, J., DIRNHOFER, S., & HOLMES, E. (2008). Global metabolic responses of mice to *Trypanosoma brucei brucei* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(16), 6127-6132.

WELLS, E. A. (1984). Animal trypanosomiasis in south America. *Preventive Veterinary Medicine*, 2(1), 31-41.

WOLKMER, P., DA SILVA, A. S., TRAESEL, C. K., PAIM, F. C., CARGNELUTTI, J. F., PAGNONCELLI, M., & DOS ANJOS LOPES, S. T. (2009). Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary parasitology*, 165(1), 41-46.

ZANETTE, R. A., SILVA, A. S. D., COSTA, M. M. D., MONTEIRO, S. G., SANTURIO, J. M., & LOPES, S. T. D. A. (2008). Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em equinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 38(5), 1468-1471.