

Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*

Thais Helena Constantino PATELLI¹
Luiz Carlos MARQUES¹
José Jurandir FAGLIARI¹
Paulo César SILVA¹

1 - Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal-SP

Resumo

Considerado como um dos principais agentes das tripanossomíases, *Trypanosoma evansi* causa uma doença genericamente conhecida como “surra” e de ampla distribuição geográfica. Esse trabalho teve como objetivo principal estudar o perfil eletroforético das proteínas de fase aguda de caprinos experimentalmente infectados com este hematozoário. Para tal, foram utilizadas dez fêmeas caprinas, com vários graus de mestiçagem, com idade aproximada de 4 meses, clinicamente sadias e sorologicamente negativas para a presença de anticorpos anti-*T. evansi* (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI). Os animais foram divididos em dois grupos: grupo 1 (G1): seis animais inoculados via intravenosa com $2,38 \times 10^6$ tripomastigotas de *T. evansi* e grupo 2 (G2): quatro animais utilizados como testemunhos. O sangue para a obtenção do soro foi obtido diariamente até o 14º dia após a inoculação (DAI), semanalmente até o 98º DAI e quinzenalmente até o 364º DAI. O fracionamento das proteínas foi obtido por em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE). Vinte e uma proteínas foram encontradas nos soros caprinos. Destas, oito foram nominalmente identificadas; fosforilase, transferrina, albumina, antitripsina, glicoproteína ácida, haptoglobina, hemoglobina e imunoglobulina de cadeia leve.

Palavras-chaves:

Eletroforese.
Proteínas. Cabras.
T. evansi.

Correspondência para:

Rua São Paulo, 2812, 86.360-000,
Bandeirantes-PR, tpatelli@hotmail.com

Recebido para publicação: 11/09/2006
Aprovado para publicação: 28/08/2008

Introdução

Dentre as principais tripanossomíases, a “surra”, como é conhecida genericamente tem como agente causador o *Trypanosoma evansi*. Este protozoário, pertencente ao gênero *Trypanosoma*, subgênero *Trypanozoon*, afeta grande número de animais.¹ Apesar da distribuição cosmopolita, as tripanossomíases animais apresentam maior ocorrência nos países tropicais e sub-tropicais principalmente na África, Ásia e Américas.²

Os principais hospedeiros acometidos variam geograficamente, entretanto, os búfalos, bovinos, camelos e eqüídeos são particularmente sensíveis.³

O período pré-patente tem duração de aproximadamente duas semanas. Em caprinos,

Ngeranwa et al.⁴ observaram período pré-patente que variou de 2 a 4 dias e Sharma et al.⁵ em condições experimentais, detectaram parasitemias nos caprinos cerca de sete dias após a inoculação.

O diagnóstico dessa enfermidade torna-se relativamente simples em animais com infecções agudas, quando os parasitas estão presentes em grande número no sangue periférico. A detecção direta do parasita é comumente realizada por técnicas como o exame da gota espessa, o método de concentração (centrifugação) de Strout e contagem de parasitas em esfregaços sangüíneos.⁶ Em adição aos métodos de diagnóstico, o proteinograma, pode auxiliar no diagnóstico das tripanossomíases.⁷

As proteínas de fase aguda são grupos

de glicoproteínas produzidos principalmente pelo fígado, sendo suas produções estimuladas por citocinas específicas, liberadas por leucócitos e macrófagos, com rápidas elevações de sua concentração no plasma durante condições inflamatórias.⁸ Essas proteínas podem ser classificadas em positivas, representadas pela ceruloplasmina, fibrinogênio, proteína C-reativa, antitripsina e haptoglobina e em negativas, como a pré-albumina, a albumina e a transferrina.⁹

Na clínica, os métodos de detecção de proteínas de fase aguda têm auxiliado o diagnóstico de processos inflamatórios. Alguns trabalhos comparativos sugerem que as proteínas de fase aguda são mais sensíveis para detecção da inflamação do que a análise hematológica.¹⁰ Em ovinos, Skinner e Roberts¹¹ demonstraram que a haptoglobina foi melhor indicador de infecção bacteriana do que os exames hematológicos.

Alterações em diferentes frações protéicas do soro foram observadas em camelos¹², bezeros¹³ e em eqüinos¹⁴ infectados com *T. evansi*. Em um cão infectado com este hematozoário, Sandoval et al.¹⁵ encontraram variações nos teores séricos das proteínas totais e na albumina e oscilações nos teores séricos da transferrina, haptoglobina e albumina foram obtidos por Passos¹⁶ em ovinos experimentalmente infectados. Em ratos Wistar experimentalmente infectados com *T. evansi*, Teixeira⁶ identificou nominalmente 12 proteínas de fase aguda, com variados graus de oscilações durante o período observado.

O presente trabalho é plenamente justificável devido à relevância da tripanossomíase, especialmente nos países tropicais, aliado a escassez de literatura na espécie caprina. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o proteinograma de caprinos infectados experimentalmente com *T. evansi*.

Material e Método

Para este experimento foram utilizadas dez fêmeas caprinas, com vários graus de mestiçagem, com aproximadamente

4 meses de idade e clinicamente saudáveis. Os animais foram mantidos em baias devidamente teladas, junto ao setor de grandes animais do Laboratório de Pesquisas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp. Durante toda fase experimental os animais receberam água, sal mineralizado, silagem de milho (*Zea mays*) e feno de coast cross (*Cynodon dactylon* L.) “ad libitum”, e ainda foram suplementados com ração composta por milho (70%) e soja (30%) na proporção de 500g animal dia. Antes do início do experimento, os animais foram desverminados e submetidos a exames clínicos e laboratoriais.

Os animais foram distribuídos em dois grupos: grupo inoculado (G1) composto pelos animais 02, 06, 07, 08, 09 e 10 e grupo testemunho (G2) composto pelos animais 01, 03, 04 e 05.

A cepa de *T. evansi* utilizada foi isolada por Moreira e Machado¹⁷ de um cão naturalmente infectado. Tripomastigotas sangüícolas deste parasita foram colhidas em solução de Alsever, adicionada de Dimetil sulfoxido (DMSO) a 10% e criopreservada em nitrogênio a -196°C.

Os caprinos do grupo G1 foram inoculados via intravenosa com 1 mL do inóculo padronizado, de maneira que cada animal recebeu cerca de $2,38 \times 10^6$ tripomastigotas de *T. evansi*. Durante o experimento foi realizada prova biológica em ratos no 10°, 40°, 70°, 100°, 130°, 160°, 190°, 220°, 250°, 280°, 310°, 340°, 365° dias após a inoculação (DAI) e parasitemia por exame da gota espessa e método de concentração de Strout para a confirmação da presença do agente nos animais inoculados.

Alíquotas de sangue para obtenção de soro foram colhidas, por punção da veia jugular externa, imediatamente antes das inoculações, diariamente até 14° DAI, semanalmente até 98° DAI e quinzenalmente até 364° DAI.

A concentração plasmática de proteína total foi determinada pelo método de Biureto. Para o fracionamento das

proteínas utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli¹⁸. Após o fracionamento o gel foi corado durante 10 min. em solução de azul de coomassie e, em seguida, colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu CS 9301, Tokio, Japan). Como referência utilizou-se uma solução marcadora (Sigma, Saint Louis, USA) com pesos moleculares 36.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 daltons (D), além de proteínas purificadas haptoglobina, a1-antitripsina.

Para a análise estatística empregou-se o delineamento inteiramente casualizado e as análises foram realizadas dentro de cada dia de observação, utilizando-se o teste de t para comparações múltiplas.

Resultados e Discussão

A primeira detecção do tripomastigota sangüícola nas cabras infectadas ocorreu no 21° DAI, observado em exame de gota espessa. Posteriormente, os animais foram apresentando-se positivos, sendo o último no 35° DAI. A partir do 95° DAI, a parasitemia tornou-se negativa em diferentes momentos. Entretanto, a presença do parasita foi evidenciada no decorrer de todo o experimento através da prova biológica. Cabe ressaltar que nenhuma cabra inoculada apresentou hipertermia durante o período de avaliação.

O método de fracionamento de proteínas por eletroforese permitiu identificar 21 proteínas com pesos moleculares que variaram entre 16 e 165 kDa. Destas, 6 foram identificadas nominalmente (Tabela 1), sendo a transferrina, a albumina, a antitripsina, a haptoglobina, a glicoproteína ácida e a IgG de cadeia leve. As demais foram obtidas através de seus pesos moleculares. Considerando que o objeto de estudo deste trabalho foi avaliar o

comportamento das proteínas de fase aguda, serão então discutidas as proteínas nominalmente identificadas neste experimento.

De acordo com a tabela 1, os teores séricos da transferrina no 14°, 42°, 70°, 98°, 210°, 266° e 364° DAI (dias após a inoculação) apresentaram-se estatisticamente diferentes, sendo superiores nos animais inoculados (G1). Embora o tempo de meia-vida desta proteína seja de oito a dez dias¹⁹, no presente trabalho esses valores permaneceram elevados nos animais inoculados até o final do período observado. Elevações nos teores séricos da albumina também foram observadas no 98° DAI nos animais do G1. Passos¹⁶ trabalhou com ovinos experimentalmente infectados com *T. evansi* e encontrou elevações no traçado da albumina durante os 240 dias de observação. Em ratos inoculados com a mesma cepa deste hematozoário, Teixeira⁶ observou aumento significativo da transferrina no 10° DAI e reduções significativas nos teores séricos da albumina no 15° e 60° DAI. Entretanto, redução dos teores séricos da albumina em infecções com *T. evansi* foram observados em bezerros por Verman e Gautam¹³, em equinos por Brem, Monzon e Mancebo¹⁴, em hamsters por Monzón e Villavicencio²⁰ e em cães por Sandoval et al.¹⁵.

Embora a albumina e a transferrina sejam consideradas de fase aguda negativa, tendendo a decrescer seus valores frente a condições inflamatórias⁸, ressalta-se que no presente experimento a presença do parasita foi confirmada durante todo período avaliado, tornando-se um fator causador de reação imunológica pelo organismo animal e, portanto, podendo ser a possível causa da elevação dos teores das mesmas.

Segundo Godson et al.²¹ as proteínas de fase aguda positiva se elevam imediatamente após a instalação de um processo inflamatório ou endotoxêmico. No presente estudo, observou-se que os valores séricos da antitripsina, haptoglobina, glicoproteína ácida e da IgG de cadeia leve não demonstraram alterações significativas.

Tabela 1 - Médias (M), desvio-padrão (DP) e significância do teste t das concentrações séricas das frações protéicas identificadas nominalmente presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de caprinos inoculados com *T. evansi* (G1) e nos do grupo testemunho (G2). Jaboticabal, 2006

Proteína	PM (KD)	G	Dias após a Inoculação com <i>T. evansi</i>											
			0	7	14	28	42	70	98	154	210	266	322	364
Proteína total (g/dL)	G1	M	0,91	0,86	0,89	0,89	0,93	0,90	0,91	0,91	0,92	0,95	0,93	0,94
		DP	0,04	0,02	0,04	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
	G2	M	0,91	0,87	0,87	0,87	0,88	0,86	0,87	0,87	0,88	0,92	0,93	0,90
		DP	0,04	0,03	0,06	0,04	0,04	0,03	0,01	0,02	0,03	0,02	0,01	0,03
	Teste T		0,3675 ^{ns}	0,3899 ^{ns}	0,5115 ^{ns}	0,5134 ^{ns}	0,0330 ^{ns}	0,0673 ^{ns}	0,0379*	0,0640 ^{ns}	0,1014 ^{ns}	0,1031 ^{ns}	0,9178 ^{ns}	0,5473 ^{ns}
Transferrina 75	G1	M	2,63	2,65	2,71	2,67	2,71	2,75	2,80	2,61	2,70	3,71	2,70	2,74
		DP	0,05	0,04	0,03	0,04	0,13	0,06	0,04	0,09	0,04	0,03	0,06	0,02
	G2	M	2,62	2,62	2,62	2,63	2,54	2,64	2,66	2,56	2,62	2,63	2,69	2,59
		DP	0,03	0,03	0,07	0,16	0,05	0,06	0,03	0,07	0,06	0,03	0,04	0,04
	Teste T		0,6897 ^{ns}	0,1831 ^{ns}	0,0182*	0,4937 ^{ns}	0,0338*	0,0250*	0,0003**	0,3765 ^{ns}	0,0281*	0,0003**	0,6673 ^{ns}	0,0001**
Albumina 66	G1	M	3,59	3,53	3,53	3,53	3,55	3,57	3,59	3,61	3,61	3,71	3,63	3,69
		DP	0,04	0,02	0,04	0,03	0,05	0,02	0,02	0,04	0,03	0,03	0,06	0,03
	G2	M	3,57	3,53	3,49	3,54	3,54	3,54	3,55	3,61	3,58	3,68	3,65	3,66
		DP	0,02	0,04	0,10	0,03	0,05	0,04	0,01	0,05	0,02	0,01	0,02	0,01
	Teste T		0,4591 ^{ns}	0,9881 ^{ns}	0,3882 ^{ns}	0,6065 ^{ns}	0,6381 ^{ns}	0,1160 ^{ns}	0,0360*	0,8318 ^{ns}	0,0644 ^{ns}	0,0903 ^{ns}	0,4271 ^{ns}	0,0768 ^{ns}
Antitripsina 60	G1	M	3,11	3,07	3,14	3,14	3,19	3,15	3,13	2,96	3,02	3,01	3,06	2,99
		DP	0,06	0,06	0,11	0,07	0,11	0,08	0,09	0,12	0,14	0,07	0,09	0,08
	G2	M	3,15	3,12	3,15	3,15	3,15	3,11	3,11	2,92	3,05	3,00	2,99	3,01
		DP	0,07	0,07	0,11	0,10	0,07	0,08	0,03	0,13	0,11	0,07	0,08	0,09
	Teste T		0,3774 ^{ns}	0,2929 ^{ns}	0,9174 ^{ns}	0,9197 ^{ns}	0,4687 ^{ns}	0,4184 ^{ns}	0,6535 ^{ns}	0,6376 ^{ns}	0,7103 ^{ns}	0,8092 ^{ns}	0,1647 ^{ns}	0,7030 ^{ns}
Haptoglobina 44	G1	M	0,84	0,69	0,92	0,84	0,67	0,53	0,54	0,58	0,35	0,00	0,22	0,14
		DP	0,16	0,35	0,18	0,07	0,39	0,42	0,42	0,45	0,63	0,00	0,53	0,32
	G2	M	0,87	0,75	0,62	0,42	0,58	0,56	0,05	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00
		DP	0,07	0,13	0,42	0,49	0,41	0,43	0,11	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00
	Teste T		0,7883 ^{ns}	0,7236 ^{ns}	0,1536 ^{ns}	0,0720 ^{ns}	0,7225 ^{ns}	0,8953 ^{ns}	0,0577 ^{ns}	0,7187 ^{ns}	0,3121 ^{ns}	0,0000	0,4468 ^{ns}	0,4071 ^{ns}
Glicoproteína ácida 38	G1	M	1,50	1,29	0,74	0,69	0,71	0,13	0,37	0,53	1,22	0,79	1,10	0,69
		DP	0,39	0,36	0,68	0,67	0,62	0,33	0,63	0,42	0,36	0,40	0,58	0,67
	G2	M	1,34	0,80	1,00	0,55	0,56	0,00	0,00	0,38	1,07	0,75	1,25	0,88
		DP	0,15	0,54	0,06	0,69	0,47	0,00	0,00	0,44	0,38	0,50	0,07	0,14
	Teste T		0,4541 ^{ns}	0,1235 ^{ns}	0,4630 ^{ns}	0,7600 ^{ns}	0,6985 ^{ns}	0,4468 ^{ns}	0,2778 ^{ns}	0,5993 ^{ns}	0,5657 ^{ns}	0,8801 ^{ns}	0,6269 ^{ns}	0,5995 ^{ns}
IgG cadeia leve 26	G1	M	2,45	2,44	2,48	2,46	2,47	2,50	2,43	2,55	2,41	2,37	2,17	2,36
		DP	0,06	0,04	0,10	0,04	0,04	0,09	0,07	0,06	0,06	0,06	0,10	0,07
	G2	M	2,54	1,82	2,47	2,51	2,49	2,46	2,39	2,56	2,36	2,36	2,36	2,29
		DP	0,10	0,22	0,06	0,06	0,09	0,71	0,05	0,07	0,08	0,08	0,34	0,12
	Teste T		0,1098 ^{ns}	0,2341 ^{ns}	0,8488 ^{ns}	0,1219 ^{ns}	0,6379 ^{ns}	0,5075 ^{ns}	0,3071 ^{ns}	0,7749 ^{ns}	0,3073 ^{ns}	0,8355 ^{ns}	0,2338 ^{ns}	0,3318 ^{ns}

Dados transformados para log (x+1); G – grupo; PM – peso molecular

Estes resultados diferiram de Teixeira⁶ que observou em ratos inoculados com *T. evansi*, redução da antitripsina no 5° DAI e aumento no 45° DAI, bem como da glicoproteína ácida e da haptoglobina. Entretanto, é importante aventar que no presente experimento, embora não tenha apresentado variações significativas, a glicoproteína ácida oscilou de sobremaneira, apresentando valores que variaram de 0,13 a 1,50 mg/dL, sofrendo reduções e elevações que podem ter relação com a permanência do tripanossoma.

Merece destaque a observação de que no presente trabalho, as proteínas de fase aguda identificadas permaneceram presentes

ao longo do experimento, alertando para a importância de que mesmo que não tenham apresentado diferenças significativas, ainda assim, apresentaram variações em seus valores, fato que ressalta a necessidade de novos estudos.

Os teores séricos da proteína total neste trabalho não apresentaram variações significativas, exceto no 98° DAI, no qual foram mais elevadas nos animais inoculados. Em bovinos infectados com *T. evansi*, Verman e Gautam²² também não observaram diferenças significativas na proteína total em 40 dias de observação. Resultado semelhante foi obtido por Marques²³ em equinos infectados com este

hematozoário.

No presente trabalho, ressalta-se que os animais inoculados não apresentaram sintomas clínicos desta tripanossomíase,

embora todas as provas biológicas e parasitêmicas tenham sido positivas, fato que sustenta a possibilidade desta espécie comportar-se como reservatório da doença.

Electrophoresis profile of the acute phase proteins of goats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*.

Abstract

Considered as one of the main agents of the tripanossomíases, *Trypanosoma evansi* causes a disease generically known as “surra”, with wide geographic occurrence. This work has the aim to study the electrophoretic profile of the acute phase proteins of goats, experimentally infected with *T. evansi*. Ten crossbred female goats, around 4 months of age, clinically healthy and serum negative for the presence of antibodies anti-*T. evansi* (IFAT) were used. The animals were divided in two groups: six were inoculated (G1) intravenously with $2,38 \times 10^6$ tripomastigotes of *T. evansi* and four were kept as non-infected controls. The blood for serum was collected daily until the 14 days after inoculation (DAI), weekly up to the 98th DAI and every two weeks up to the 364th DAI. The serum proteins were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Twenty-one proteins were found in the serum of the goats, eight were nominally identified; phosphorylase, transferrin, albumin, antitrypsin, acid glycoprotein, haptoglobin, hemoglobin, and light chain immunoglobulin.

Key words:
Electrophoresis.
Proteins.
Goats.
T. evansi.

Referências

- 1 WOO, P. T. K. Salivarian trypanosomes producing disease in livestock outside of sub-Saharan Africa. In: KREIER, J. P. **Parasitic protozoa**. New York: Academic Press, 1977. v. 1, p. 270-295.
- 2 TOURATIER, L. Dixième reunion internationale sur *Trypanosoma evansi*: rapport du groupe de travail. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 9, n. 4, p. 1197-1207, 1990.
- 3 GUTIEEREZ, C.; CORBERA, J. A.; MORALES, M.; BÜSCHER, P. Trypanosomosis in goats: current status. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1081, p. 300-310, 2006.
- 4 NGERANWA, J. J.; GATUMBI, P. K.; MUTIGA, E. R.; AGUMBAH, G. J. O. Pathogenesis of *Trypanosoma (brucei) evansi* in small East African goats. **Res. Vet. Sci.**, v. 54, p. 283-289, 1993.
- 5 SHARMA, D. K.; CHAUHAN, P. P. S.; SAXENA, V. K.; AGRAWAL, R. D. Haematological changes in experimental trypanosomiasis in Barbari goats. **Small Ruminant Research**, v. 38, n. 2, p. 145-149, 2000.
- 6 TEIXEIRA, M. C. A. **Proteinogramas séricos de ratos wistar experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcocystis sp. Trypanosomatidae)**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- 7 GRURYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Vet. Bull.**, v. 64, n. 11, p. 1009-1018, 1994.
- 8 SINGH, S. V.; PACHAURI, S. P. Acute phase proteins in bovine mastitis. **Indian J. Anim. Sci.**, v. 72, n. 1, p. 20-22, 2002.
- 9 KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- 10 HORADAGODA, N. U.; KNOX, K. M.; GIBBS, H. A.; REID, S. W.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S. E.; ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Vet. Rec.**, London, v.144, n.16, p.437-442, 1999.
- 11 SKINNER, J. G.; ROBERTS, L. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. **Vet. Rec.**, v. 134, n. 2, p. 33-36, 1994.
- 12 BOID, R.; LUCKINS, A. G.; RAE, P. F.; GRAY, A. R.; MAHMOUD, M. M.; MALIK, K. H. Serum immunoglobulin levels and electrophoretic patterns of

- serum proteins in camels infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet. Parasitol.**, v. 6, n. 4, p. 333-345, 1980.
- 13 VERMAN, B. B.; GAUTAM, O. P. Electrophoretic analysis of serum proteins of calves experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Indian J. Anim. Health**, v.18, p. 33-37, 1979.
- 14 BREM, J. J.; MONZÓN, C. M.; MANCEBO, O. A. Cambios hematológicos en la tripanosomiasis equina experimental (*T. equinum*, Vogés 1901). **Rev. Mil. Vet.**, v. 32, n. 150, p. 413-420, 1984.
- 15 SANDOVAL G. L.; COPPO, N. B.; SANCHEZ NEGRETTE, M.; COPPO, J. A. Alterações bioquímicas e histopatológicas de um cão e ratos infectados com *Trypanosoma evansi*. **Hora Vet.**, v. 14, n. 81, p. 53-55, 1994.
- 16 PASSOS, P. B. **Infecção experimental em ovinos com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcostigophora: Trypanosomatidae)**. 2004. 236 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- 17 MOREIRA, R. D.; MACHADO, R. Z. Identificação e isolamento do *Trypanosoma equinum* em um cão do Município de Camapuã, M.S. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 10., 1985, Jaboticabal. **Resumos...** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1985. p. 66.
- 18 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 19 JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- 20 MONZÓN C. M.; VILLAVIVENCIO, V. I. Serum proteins in guinea-pigs and horse infected with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). **Vet. Parasitol.**, v. 36 n. 3-4, p. 295-301, 1990.
- 21 GODSON D. L.; CAMPOS, M.; ATTAH-POKU, S. K.; REDMOND, M. J.; CORDEIRO, D. M.; SETHI, M. S.; HARLAND, R. J.; BABIUK, L. A. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Vet. Immunol. And Immunopathol.**, v. 51, p. 277-292, 1996.
- 22 VERMAN, B. B.; GAUTAM, O. P. Serological diagnosis of experimental bovine surra (*Trypanosoma evansi* infection) – A comparison of passive haemagglutination, gel diffusion and indirect fluorescent antibody test. **Indian Vet. J.**, v. 54, p. 809-813, 1982.
- 23 MARQUES, L. C. **Infecção experimental em equinos com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (Sarcostigophora: Trypanomatidae)**. 1996. 134 f. Tese (Livre Docência em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.