

PROTEINOGRAMA SÉRICO DE BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi*

SERUM PROTEIN CONCENTRATIONS IN CATTLE EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Trypanosoma evansi*

M. C. A. TEIXEIRA¹, L. C. MARQUES^{1*}, J. J. FAGLIARI¹, R. Z. MACHADO¹,
P. C. SILVA¹, E. S. PORTUGAL¹, C. E. P. SANTOS¹, A. M. GIRARDI¹

RESUMO

Trypanosoma evansi é patogênico para diversas espécies de animais em áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, a doença é endêmica no Pantanal Mato-Grossense. Este estudo analisou o perfil eletroforético das proteínas séricas de bovinos infectados experimentalmente com *T. evansi*. Foram utilizados oito bovinos, mestiços, com idade aproximada de oito meses, clinicamente saudáveis e soronegativos (RIFI) para *T. evansi*. Os animais foram divididos em dois grupos, G1: cinco bovinos inoculados via intravenosa com $2,2 \times 10^7$ tripomastigotas de *T. evansi*, e G2: três bovinos mantidos como controles. Sangue para obtenção do soro foi coletado diariamente até o 15º dia após a inoculação (DAI), e posteriormente a intervalos semanais até o 204º DAI, a cada 14 dias até o 372º DAI e a cada 30 dias até o 522º DAI. Para o fracionamento das proteínas foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Por meio da prova biológica, detectou-se *T. evansi* nos bovinos 01, 06 e 08 no 15º DAI, 06 e 07 no 30º DAI, 01 e 06 no 45º DAI, 06 no 60º DAI e 01 no 75º DAI. Vinte e seis proteínas com pesos moleculares variando de 20 a 245 kDa foram encontradas nos bovinos, sendo que oito foram identificadas nominalmente: imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulinas G (IgG) de cadeia pesada e de cadeia leve, haptoglobina e glicoproteína ácida.

PALAVRAS-CHAVE: Ruminantes. Proteína. Eletroforese. Trypanosomatídeos.

SUMMARY

Trypanosoma evansi is pathogenic to several animal species in tropical and subtropical areas. In Brazil, the disease is endemic in Pantanal mato-grossense. This study aimed to determine the electrophoretic profile of serum proteins in experimentally infected cattle. Eight crossbred animals, aged approximately eight months, clinically healthy and seronegative (IFAT) for *Trypanosoma evansi* were used. The animals were divided into two groups, G1: five animals inoculated intravenously with 22×10^6 trypomastigotes of *T. evansi*, and G2: three animals kept as controls. The blood used to obtain serum samples was collected daily until the 15th day after inoculation (DAI), and subsequently, at weekly intervals until the 204th DAI, every 14 days until the 372nd DAI and every 30 days until the 522nd DAI. Electrophoresis in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was used for the purification of proteins. Through the biological test, *T. evansi* was detected in animals 01, 06 and 08 on the 15th DAI, 06 and 07 on the 30th DAI, 01 and 06 on the 45th DAI, 06 on the 60th DAI and 01 on the 75th DAI. Twenty-six proteins with molecular weights ranging from 20 kDa to 245 kDa were found in cattle. Eight of them were nominally identified as immunoglobulin A (IgA), ceruloplasmin, transferrin, albumin, heavy and light chain immunoglobulin G (IgG), haptoglobin and acid glycoprotein.

KEY-WORDS: Cattle. Protein electrophoresis. Trypanosomatídeos.

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. CEP-14884-900 – Jaboticabal, SP. Tel. - (16) 3209 2626 - Ramal 557. *Autor para correspondência: lmarques@fcav.unesp.br

INTRODUÇÃO

Trypanosoma evansi apresenta distribuição geográfica ampla, causando doenças em animais de áreas de clima tropical e subtropical, especialmente na África e América Latina (LUN e DESSER, 1995). A doença é enzoótica em equinos do Pantanal Mato-Grossense (SILVA et al., 1995a), sendo, também, descrita em cães, capivaras, quatis, bovinos, búfalos, pequenos marsupiais e tatus (NUNES e OSHIRO, 1990; NUNES et al., 1993; NUNES et al., 1994; SILVA et al., 1995b; Herrera et al., 2004).

Animais infectados pelo *T. evansi* exibem lesões inflamatórias (MARQUES, 1996; CADIOLI, 2001), e, as proteínas de fase aguda aumentam em resposta a produção de mediadores químicos liberados pelos macrófagos e leucócitos durante processos inflamatórios e infecciosos (KENT, 1992). Assim, as proteínas de fase aguda refletem a gravidade da reação inflamatória, podendo auxiliar no diagnóstico e prognóstico, bem como no entendimento de mecanismos patogênicos de doenças (GODSON et al., 1996).

A técnica de eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando identificar concentrações protéicas extremamente baixas em micro-quantidades de amostras (GORDON, 1995). Alterações em diferentes frações protéicas do soro foram observadas em bezerros (VERMAN e GAUTAM, 1979), camelos (BOID et al., 1980) e equinos (BREM et al., 1984) infectados pelo *T. evansi*. Sandoval et al. (1994) encontraram em um cão infectado com este hematozoário variações nos teores séricos da proteína total e albumina e Passos (2004), em ovinos experimentalmente infectados, verificou flutuações dos teores séricos de transferrina, albumina e haptoglobina. Teixeira et al. (2008) identificaram nominalmente 12 proteínas em ratos Wistar experimentalmente infectados com *T. evansi* e Patelli et al. (2008) trabalhando com caprinos, também, infectados experimentalmente com a mesma cepa, verificaram 21 proteínas com pesos moleculares entre 16 e 165 kDa, sendo que seis foram identificadas nominalmente (transferrina, albumina, antitripsina, haptoglobina, glicoproteína ácida e IgG de cadeia leve).

O diagnóstico dessa tripanossomíase é relativamente fácil em animais com infecções agudas, quando os parasitos estão presentes em grande número no sangue periférico (OLIVEIRA et al., 1989), porém, mais difícil nas infecções crônicas quando as parasitemias são baixas e intermitentes (NANTULYA, 1990; HERRERA et al., 2001). Assim, devido à relevância desta tripanossomíase, e as dificuldades de diagnóstico desta doença nos ruminantes, por apresentarem baixa parasitemia, este estudo teve como objetivo determinar o proteinograma sérico de bovinos infectados experimentalmente com *T. evansi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados oito bovinos mestiços, sete fêmeas e um macho, com aproximadamente oito meses de idade. Antes do início do experimento, os animais receberam ivermectina na dose de 200 µg/kg de peso corporal e foram submetidos a exames físicos e hematológicos e mantidos em baias teladas no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp. Os animais foram alimentados *ad libitum* com água, sal mineralizado, silagem de milho, feno de tifton, e, suplementados com ração composta por milho (70%) e soja (30%), na proporção de dois kg/animal/dia.

Os animais foram distribuídos em dois grupos: G1 - inoculado com cepa *T. evansi* (bovinos 01, 03, 06, 07 e 08) e G2 - controle (bovinos 02, 04 e 05). A cepa de *T. evansi* foi isolada por Moreira e Machado (1985) de um cão naturalmente infectado e mantida criopreservada a -196°C. A cepa de *T. evansi* foi inoculada por via intraperitoneal em ratos Wistar para replicação, e G1 foi infectado por via endovenosa com $2,2 \times 10^7$ tripomastigotas.

A pesquisa de tripomastigotas no sangue periférico dos bovinos foi realizada por meio da prova biológica (inoculação em ratos), gota espessa, esfregaços sanguíneos corados pelo May-Gruenwald e método de concentração de Strout no 15°, 30°, 45°, 60°, 75°, 90°, 120°, 150°, 180°, 210°, 240°, 270°, 300°, 330°, 360°, 390°, 420°, 450°, 480°, 510° e 520° dias após a inoculação (DAI). Amostras de sangue para obtenção de soro foram coletadas por venopunção da jugular externa, imediatamente antes das inoculações, diariamente até o 15° DAI, e posteriormente a intervalos semanais até 204° DAI, de 14 em 14 dias até 372° DAI e de 30 em 30 dias até 522° DAI. A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método do biureto e para o fracionamento das proteínas utilizou-se eletroforese em gel de poli-acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970). Após o fracionamento o gel foi corado durante 10 minutos, em solução de azul de coomassie e, em seguida, 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, Tóquio, Japão). Como referência utilizou-se solução marcadora (Sigma, Saint Louis, USA) com pesos moleculares de 36, 45, 66, 97,4, 116 e 205 kDa, além das proteínas purificadas haptoglobina e $\alpha 1$ -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 t para comparações das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de *T. evansi* no sangue periférico dos bovinos inoculados (G1) não foi observada por meio dos métodos parasitológicos diretos, possivelmente devido às baixas parasitemias. Por meio

da prova biológica, detectou-se *T. evansi* nos bovinos 01, 06 e 08 no 15° DAI, 06 e 07 no 30° DAI, 01 e 06 no 45° DAI, 06 no 60° DAI e 01 no 75° DAI. Portanto, é possível inferir que a despeito das baixas parasitemias, os bovinos inoculados albergaram *T. evansi* por pelo menos 75 dias. Cabe ressaltar que o período pré-patente foi de aproximadamente 15 dias. As médias, desvio padrão e teste t, das proteínas identificadas nominalmente nos bovinos do grupo infectado com *T. evansi* (G1) e controle (G2) estão apresentados nas Tabelas 01 e 02.

Os teores séricos de proteína total dos animais infectados apresentaram flutuações dentro dos limites fisiológicos considerados para a espécie bovina, semelhante ao que ocorreu em equinos (MARQUES, 1996) e quatis (HERRERA, 1998), embora, Kathira e Avastthi (1985) citam reduções em bezerros bufalinos infectados com o mesmo hematozoário. Essas variações possivelmente se devem às distintas condições de alimentação dos animais experimentais, e, ainda, às diferenças de patogenicidade entre as cepas de *T. evansi* de diferentes continentes.

Vinte e seis proteínas com pesos moleculares entre 20 a 245 kDa foram encontradas nos bovinos inoculados com *T. evansi*, porém, só oito identificadas nominalmente (imunoglobulina A, ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulinas G de cadeia pesada e de cadeia leve, haptoglobina e glicoproteína ácida), e, para as demais proteínas foram obtidos apenas os pesos moleculares. Passos (2004) sugere que proteínas não identificadas nominalmente são produtos oriundos da degradação dos parasitos, haja vista que não foram encontradas nos animais do grupo controle.

Trabalhos experimentais com a mesma cepa de *T. evansi* realizados em ovinos (PASSOS, 2004), ratos (TEIXEIRA et al., 2008) e caprinos (PATELLI et al., 2008) identificaram, respectivamente, 45, 31 e 21 frações protéicas com pesos moleculares entre 12 e 205 kDa. Portanto, o número de frações protéicas em animais infectados com *T. evansi* parece não ter correlação direta com a resposta imunológica ao parasito, mas, possivelmente às diferenças de resposta de cada espécie animal a estímulos semelhantes. Dentre as proteínas identificadas, a ceruloplasmina, a transferrina, a albumina, a haptoglobina e a glicoproteína ácida são consideradas de fase aguda. Teixeira et al. (2008) e Patelli et al. (2008) trabalhando com ratos Wistar e caprinos, ambas as espécies, infectadas experimentalmente com a mesma cepa de *T. evansi*, identificaram sete e seis proteínas de fase aguda, respectivamente. A maioria das proteínas de fase aguda são glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos como consequência de injúrias, traumatismos ou infecções teciduais (BAUMANN e GAULDIE, 1994).

A IgA apresentou reduções pontuais significativas ao longo do período de observação, semelhante ao ocorrido em ratos (TEIXEIRA et al., 2008), porém, o significado destas alterações ainda é desconhecido.

Nos bovinos, a ceruloplasmina aumentou significativamente no 288°, 316°, 330° e 492° DAI, fase em que a parasitemia não era mais detectada.

Teixeira et al. (2008) relataram em ratos reduções significativas nos estágios iniciais e intermediários da evolução da doença, e, em caprinos (PATELLI et al., 2008) não verificaram a presença desta proteína, já em ovinos infectados (PASSOS, 2004) observou elevações do 5° ao 7° DAI. Semelhante ao que ocorreu em ratos (TEIXEIRA et al., 2008) e caprinos (PATELLI et al., 2008) infectados com *T. evansi*, a transferrina, também, aumentou significativamente nos bovinos. Entretanto, Passos (2004) trabalhando com ovinos inoculados com a mesma cepa, não detectou alterações significativas nos teores desta proteína. A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa cujos teores séricos tendem a decrescer na presença de inflamação (KANEKO, 1997). Assim, certifica-se que os teores de ceruloplasmina e transferrina em animais infectados com *T. evansi* variam consideravelmente com a evolução da doença, não fornecendo subsídios confiáveis como métodos auxiliares de diagnóstico dessa tripanossomíase.

Nos bovinos inoculados, a albumina apresentou elevação significativa no 522° DAI e reduções no 462° e 492° DAI. Do mesmo modo, os teores séricos desta proteína em animais infectados pelo *T. evansi* é variável, há citações de aumentos (PATELLI et al., 2008) e diminuições (VERMAN e GAUTAM, 1982; BREM et al., 1984; SANDOVAL et al., 1994 e TEIXEIRA et al., 2008). Teores séricos de albumina relativamente menores durante o curso da infecção experimental em ovinos foi atribuída ao aumento das globulinas (PASSOS, 2004). As imunoglobulinas de cadeia pesada e de cadeia leve apresentaram aumentos significativos cerca de um ano e meio após as inoculações dos animais, fase em que os parasitos não eram mais re-isolados, assim, infere-se que estas alterações não devem ser atribuídas à ação do *T. evansi*. É sabido que as tripanossomíases africanas induzem pronunciadas respostas de anticorpos (LE RAY, 1975), porém, a resposta imune do hospedeiro, na tentativa de eliminação do parasito, provoca danos teciduais e por vezes pode levar à morte (NAGLE et al., 1974).

A haptoglobina e a glicoproteína ácida apresentaram aumentos significativos apenas pontuais na fase tardia de evolução. Estas são proteínas de fase aguda dos ruminantes que se elevam no curso de doenças inflamatórias e metabólicas; estando ausentes ou em níveis muito baixos em animais sadios, sendo, portanto de valor para determinar o prognóstico e monitorar o tratamento de enfermidades (GANHEIM et al., 2007; GONZÁLES et al., 2007). Passos (2004) verificou elevações e diminuições desta proteína em vários períodos em ovinos infectados com *T. evansi*. Em camundongos infectados com *T. brucei*, a haptoglobina foi detectada dois dias após a inoculação e sua concentração máxima foi verificada no 10° DAI (NGURE et al., 1997). Pelo exposto, nota-se que as variações dos níveis séricos de haptoglobina e proteína ácida é um importante indicador de doenças inflamatórias, entretanto, no curso da infecção pelo *T. evansi* nos bovinos as concentrações séricas destas proteínas sofreram variações pontuais na fase tardia de evolução, o que possibilita inferir que as alterações

Tabela 01 - Médias (M), desvios padrão (DP) e significância do teste t (0 DAI até 176 DAI) da concentração sérica de proteína total e das frações protéicas identificadas nominalmente, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e daqueles do grupo testemunho (G2).

			Dia após a inoculação														
Proteínas			0	1	2	3	4	5	6	7	14	29	57	85	120	148	176
Total	G1	M	7,04	6,90	6,54	6,60	6,61	6,75	6,69	6,51	6,74	6,90	6,94	7,01	7,52	6,84	7,18
		DP	0,34	0,44	0,12	0,29	0,54	0,38	0,39	0,38	0,40	0,41	0,26	0,58	0,27	0,31	0,33
	G2	M	6,82	7,02	6,71	6,57	6,66	6,80	6,71	6,45	6,79	6,69	7,00	6,98	7,50	7,05	7,17
		DP	0,38	0,26	0,21	0,29	0,10	0,32	0,33	0,16	0,57	0,42	0,44	0,40	0,79	0,45	0,50
	Teste	t	0,42 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,89 ^{ns}	0,87 ^{ns}	0,86 ^{ns}	0,95 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,79 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,96 ^{ns}
IgA 180	G1	M	107,93	115,26	106,84	105,15	129,34	129,05	147,30	104,07	121,00	107,81	106,59	83,76	127,06	160,82	117,86
		DP	28,82	27,71	37,38	31,94	30,95	31,76	41,69	26,12	74,63	39,96	78,86	54,54	36,88	56,11	39,25
	G2	M	165,48	154,17	81,66	104,09	152,11	212,21	208,55	166,68	141,19	79,82	119,61	105,78	178,26	159,74	136,19
		DP	15,99	3,43	33,90	50,15	25,98	21,43	22,79	15,86	6,43	20,73	55,57	47,22	45,55	13,29	59,69
	Teste	t	0,02*	0,06 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,97 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,01**	0,06 ^{ns}	0,01*	0,67 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,61 ^{ns}
Ceruloplasmina 128	G1	M	42,05	49,93	39,24	31,62	30,51	40,75	39,54	47,54	55,08	46,86	47,11	30,29	29,94	40,01	25,69
		DP	12,17	20,59	9,08	14,79	10,99	14,59	12,26	13,41	17,29	18,23	20,71	17,97	11,44	13,69	4,99
	G2	M	42,46	34,36	37,29	26,16	21,91	22,84	48,15	54,15	59,96	34,11	32,63	20,99	20,01	34,23	24,13
		DP	4,42	9,32	14,66	3,06	6,56	5,71	30,18	26,51	20,80	5,16	9,66	6,40	6,46	9,98	11,00
	Teste	t	0,96 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,82 ^{ns}	0,56 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,73 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,79 ^{ns}
Tranferrina 82	G1	M	249,91	251,01	243,89	262,45	218,28	956,20	222,38	232,85	278,63	331,55	328,13	261,60	337,70	1.164,38	248,14
		DP	32,95	32,57	21,91	45,64	77,17	1.599,82	34,18	26,06	23,96	30,44	20,70	25,39	80,33	1.865,08	15,78
	G2	M	282,06	279,22	263,34	323,43	228,10	270,38	242,38	256,79	302,58	360,69	380,45	269,56	381,32	383,09	264,26
		DP	24,20	10,83	18,07	95,22	32,11	48,39	78,74	32,62	23,94	32,26	20,10	48,17	38,87	20,47	13,31
	Teste	t	0,20 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,63 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,01*	0,76 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,19 ^{ns}
Albumina 66	G1	M	4.294,25	4.319,27	3.773,45	4.121,85	3.658,01	3.306,55	3.720,10	4.041,41	3.858,61	3.755,83	3.883,39	4.073,73	4.795,17	3.415,13	4.362,05
		DP	285,65	207,20	238,32	297,45	325,74	1.002,16	190,86	270,63	407,60	318,65	207,06	250,19	218,65	1.434,91	269,01
	G2	M	4.103,05	4.303,27	3.842,19	3.854,30	3.746,08	3.767,43	3.688,68	3.857,89	4.024,86	3.674,81	3.931,11	4.310,20	5.030,30	4.215,93	4.605,58
		DP	246,31	346,28	372,70	393,61	112,90	300,71	115,12	153,22	210,70	354,01	163,60	241,37	480,53	253,00	255,40
	Teste	t	0,37 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,68 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,75 ^{ns}	0,75 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,25 ^{ns}
IgG de cadeia pesada 57	G1	M	1.195,81	1.181,81	1.249,39	981,63	1.199,46	1.053,30	1.321,31	1.108,56	1.192,25	1.230,06	1.386,27	1.123,94	891,19	923,33	1.068,31
		DP	156,22	191,43	169,95	235,83	208,97	615,65	236,94	221,09	177,63	248,57	267,38	189,31	425,95	600,66	242,54
	G2	M	1.143,90	1.197,96	1.270,85	1.103,95	1.244,62	1.317,42	1.239,14	1.042,84	1.152,45	1.156,17	1.272,98	1.068,99	879,91	1.061,04	879,26
		DP	168,09	145,12	126,61	116,00	201,24	239,34	244,08	117,79	331,42	106,95	110,34	26,90	211,05	160,28	145,53
	Teste	t	0,67 ^{ns}	0,90 ^{ns}	0,86 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,83 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,97 ^{ns}	0,72 ^{ns}	0,27 ^{ns}
Haptoglobina 42	G1	M	8,39	10,02	21,66	17,62	27,60	18,93	33,20	11,49	14,54	17,29	22,88	13,96	146,76	26,85	15,37
		DP	5,35	5,60	3,17	6,98	18,90	8,74	10,94	8,28	10,35	1,61	9,53	8,85	285,67	13,87	10,74
	G2	M	6,98	14,00	24,42	19,59	19,04	22,64	32,21	9,67	13,59	17,21	24,68	17,64	9,74	26,03	15,69
		DP	2,82	9,25	16,25	3,11	5,57	8,89	6,45	3,00	6,39	8,72	10,99	11,07	5,45	3,12	6,43
	Teste	t	0,69 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,89 ^{ns}	0,73 ^{ns}	0,89 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,62 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,93 ^{ns}	0,97 ^{ns}

Glicoproteína ácida 38	G1	M	8,87	7,40	15,26	18,67	22,00	11,00	16,73	8,90	10,64	15,46	14,88	12,87	17,68	15,47	14,88
		DP	4,90	2,02	9,95	7,82	23,28	5,61	7,72	3,72	5,16	5,38	3,79	3,92	9,21	6,87	7,51
	G2	M	6,28	6,32	11,69	11,89	14,65	8,92	24,74	7,45	8,50	12,88	15,36	15,98	11,35	22,72	21,84
		DP	0,75	5,47	1,48	4,08	8,22	4,66	19,21	1,93	1,08	4,15	9,27	1,79	4,19	1,71	3,20
	Teste	t	0,41 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,63 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,56 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,92 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,19 ^{ns}
IgG de cadeia leve 26	G1	M	488,08	452,19	587,82	513,22	731,98	559,92	748,86	495,66	526,13	647,40	601,64	661,60	476,69	502,45	549,02
		DP	85,95	132,75	116,14	232,22	154,56	274,23	201,42	141,38	156,80	152,28	182,64	153,08	227,23	371,70	122,03
	G2	M	384,90	220,45	603,77	558,15	660,40	481,17	491,88	483,69	485,12	695,19	575,24	581,18	510,37	431,68	540,25
		DP	217,61	248,72	48,93	71,30	199,00	363,48	428,03	8,91	127,91	159,23	107,38	101,28	18,45	77,88	105,95
	Teste	t	0,36 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,83 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,59 ^{ns}	0,74 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,89 ^{ns}	0,72 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,83 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,92 ^{ns}

Tabela 02 - Médias (M), desvios padrão (DP) e significância do teste t (206 DAI até 522 DAI) da concentração sérica de proteína total e das frações protéicas identificadas nominalmente, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e daqueles do grupo testemunho (G2).

Proteína PM (KD)			Dias após a inoculação														
			206	232	246	260	274	288	302	316	330	358	402	432	462	492	522
PT	G1	M	7,07	7,20	7,66	7,77	8,08	7,58	7,78	7,54	7,52	7,46	7,61	7,41	7,45	7,02	8,15
		DP	0,55	0,39	0,62	0,14	0,34	0,28	0,35	1,16	0,39	0,34	0,57	0,32	0,35	0,37	0,49
	G2	M	7,12	4,31	6,98	6,95	7,07	7,01	7,17	6,72	6,83	6,69	6,98	7,17	6,78	7,00	7,45
		DP	0,53	3,76	0,28	0,53	0,61	0,53	0,50	0,53	0,30	0,32	0,28	0,15	0,44	0,44	0,54
	Teste	t	0,92 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,01*	0,02*	0,09 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,04*	0,02*	0,13 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,96 ^{ns}	0,11 ^{ns}
IgA 180	G1	M	70,35	109,83	252,80	181,56	128,05	146,92	95,83	127,20	107,87	190,65	137,43	116,68	112,24	97,09	150,66
		DP	42,04	14,77	130,05	102,00	79,85	24,13	55,99	50,73	64,72	99,85	32,66	69,43	23,54	44,95	10,02
	G2	M	61,92	88,47	159,33	144,84	85,24	120,38	107,66	159,69	155,05	116,59	60,62	96,63	210,09	61,04	209,62
		DP	18,55	59,97	50,19	13,71	27,14	58,47	44,50	38,44	16,99	75,98	17,53	65,39	77,54	18,86	67,15
	Teste	t	0,76 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,01*	0,70 ^{ns}	0,03*	0,24 ^{ns}	0,09 ^{ns}
Ceruloplasmina 128	G1	M	30,90	34,22	54,93	62,74	58,11	62,27	69,71	61,97	69,55	60,55	49,60	61,18	67,26	43,64	84,54
		DP	1,70	7,14	22,29	18,82	30,14	6,76	17,25	13,36	13,20	15,11	10,12	7,42	46,45	8,71	25,79
	G2	M	23,49	23,72	50,54	60,68	36,28	32,75	21,67	17,89	33,14	33,87	22,91	25,41	53,61	23,16	68,58
		DP	13,19	4,71	13,54	17,76	7,60	10,27	7,08	5,36	9,43	25,43	12,77	4,21	7,80	13,28	10,43
	Teste	t	0,24 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,00**	0,00**	0,00**	0,01*	0,11 ^{ns}	0,02	0,00**	0,64 ^{ns}	0,04*	0,36 ^{ns}
Tranferrina 82	G1	M	248,81	244,29	337,35	368,30	243,11	231,05	1.710,94	177,97	241,70	220,99	197,23	1.026,81	188,98	182,24	213,68
		DP	32,04	30,53	55,93	50,36	48,32	30,36	2.070,57	57,39	20,35	23,21	39,05	2.015,53	60,35	38,26	100,69
	G2	M	264,71	262,85	316,43	309,62	382,72	380,37	276,56	342,41	371,01	1.628,52	259,37	282,48	169,13	260,37	225,17
		DP	29,83	13,18	34,50	23,50	55,89	12,51	48,32	32,27	11,39	2.379,46	19,89	7,07	26,18	25,53	46,91
	Teste	t	0,51 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,59 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,01**	0,00**	0,29 ^{ns}	0,00**	0,00**	0,21 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,56 ^{ns}	0,62 ^{ns}	0,02*	0,86 ^{ns}
Albumina 66	G1	M	4.540,07	4.291,64	4.277,39	4.342,95	4.349,87	4.398,40	3.167,53	4.418,81	4.129,23	4.273,54	3.937,26	3.916,84	4.588,73	3.618,65	5.107,52
		DP	228,03	302,02	382,41	157,62	358,13	354,15	1.584,57	807,28	180,70	161,27	446,82	1.598,38	248,73	158,24	238,20
	G2	M	4.610,48	4.087,16	4.156,05	4.128,14	3.894,09	3.935,34	4.423,60	4.512,12	4.083,43	3.102,00	4.521,26	4.381,57	3.977,54	4.535,28	4.532,23
		DP	364,21	434,12	208,84	399,51	531,33	245,81	257,34	314,92	188,64	2.005,53	180,46	195,13	359,03	257,91	162,13
	Teste	t	0,74 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,86 ^{ns}	0,74 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,03*	0,00**	0,01*

IgG de cadeia pesada 57	G1	M	932,09	1.131,28	1.345,28	1.395,53	1.535,58	1.352,75	927,14	1.279,54	1.463,09	1.371,38	1.250,44	929,94	1.003,91	1.156,20	1.171,06
		DP	259,30	318,03	264,94	109,71	193,10	201,20	881,30	72,34	302,46	242,70	169,31	534,03	222,34	176,13	157,56
	G2	M	780,76	994,87	1.068,51	1.171,41	1.218,96	1.272,99	1.097,66	787,82	1.026,00	559,04	765,62	1.066,85	1.099,59	768,96	1.216,94
		DP	103,65	139,32	182,35	284,20	53,51	100,69	54,45	174,65	133,51	491,40	89,09	111,78	21,86	105,70	270,86
Teste	t	0,38 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,04*	0,55 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,00**	0,06 ^{ns}	0,02*	0,00**	0,69 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,01*	0,77 ^{ns}	
Haptoglobina 42	G1	M	16,57	16,21	17,40	24,93	28,06	16,06	31,62	14,87	24,43	27,86	43,96	15,34	20,53	59,41	13,11
		DP	5,06	8,69	5,93	11,61	24,04	11,55	23,08	5,44	12,15	8,06	14,33	11,25	11,39	40,67	4,66
	G2	M	15,95	23,58	15,38	13,69	17,96	24,73	19,37	8,71	25,19	15,59	15,59	25,68	15,71	15,62	17,18
		DP	5,16	5,07	3,43	5,72	8,78	10,99	9,79	4,70	2,49	7,10	4,62	7,49	4,76	4,64	5,96
Teste	t	0,87 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,92 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,02*	0,21 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,32 ^{ns}	
Glicoproteína acida 38	G1	M	12,25	12,45	17,15	19,95	34,48	10,00	35,50	16,22	23,50	23,93	51,11	29,72	32,11	44,08	49,16
		DP	2,98	3,74	7,95	17,38	43,40	5,30	28,63	12,33	5,72	10,32	6,09	20,10	13,84	4,17	20,11
	G2	M	16,66	16,64	17,25	8,67	13,46	15,32	20,61	10,26	22,00	14,15	16,35	17,98	41,54	16,44	37,64
		DP	3,66	1,43	2,19	0,71	3,70	9,11	5,36	4,02	1,09	9,93	3,51	2,61	19,37	3,83	17,64
Teste	t	0,11 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,68 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,00**	0,37 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,00**	0,45 ^{ns}	
IgG de cadeia leve 26	G1	M	648,26	545,02	538,23	621,71	785,84	651,93	672,96	725,05	474,72	479,60	731,07	417,83	541,56	450,64	413,18
		DP	150,08	311,50	106,30	125,49	302,65	79,85	206,30	286,29	146,88	137,44	416,14	262,86	121,81	364,03	246,67
	G2	M	623,91	520,84	530,97	492,96	729,27	575,08	597,57	458,32	274,28	470,69	439,19	556,12	516,26	445,98	613,68
		DP	84,03	95,78	70,92	105,00	128,94	103,07	114,18	6,65	247,14	147,14	354,88	67,38	93,54	362,03	121,83
Teste	t	0,81 ^{ns}	0,90 ^{ns}	0,92 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,59 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,93 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,25 ^{ns}	

inflamatórias e/ou metabólicas causadas pelo parasito, também, foram insignificantes.

Na realidade pouco se sabe a respeito dos mecanismos, por meio dos quais os tripanossomos conseguem sobreviver num organismo imune. A resposta imune específica pode estar relacionada à habilidade do parasito em apresentar variações antigênicas, possibilitando, assim, a persistência da infecção em alguns animais (VICKERMAN, 1978). O papel protetor dos anticorpos é muito discutido, mas há indícios de que participam na limitação da infecção (BRENER e ANDRADE, 1979). À luz dos conhecimentos atuais, sabe-se que a imunidade existente durante a fase crônica não é total ou absoluta (BOERO, 1974). Todavia, supõe-se que os anticorpos exercem significativos efeitos no controle das parasitemias causadas por *T. evansi*.

CONCLUSÃO

Verificou-se que não houve um padrão de elevação ou diminuição das proteínas plasmáticas dos bovinos infectados experimentalmente com uma cepa criopreservada de *T. evansi*. Assim, certifica-se que o fracionamento eletroforético de proteínas de fase aguda não constitui método auxiliar e diagnóstico desta tripanossomíase em bovinos.

REFERÊNCIAS

- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v.15, p.74-80, 1994.
- BOERO, J. J. **Parasitosis Animales**. Buenos Aires: EUDEBA, 3.ed., 1974. 264p.
- BOID, R.; LUCKING, A. G.; RAE, P. E. Serum immunoglobulin levels and electrophoretic patterns of serum proteins in camels infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v.6, p.33-34, 1980.
- BREM, J. J.; MONZON, C. M.; MANCEBO, O. A. Cambios hematológicos en la tripanosomiasis equina experimental (*T. equinum*, Vogés 1901). **Revista Militar Veterinária**, v.32, p.413-420, 1984.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: GANABARA KOOGAN, 1979, p.163.
- CADIOLI, F. A. **Infecção experimental em jumentos (Equus asinus) com Trypanosoma evansi (Steel, 1885) (Sarcocystidina: Trypanomatidae)**. 2001. 135f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Clínica Veterinária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- GANHEIM, C.; ALENIUS, S.; WALLER, K. P. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. **Veterinary Journal**, v.173, p.645-651. 2007.
- 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. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.51, p.277-292, 1996.
- GONZÁLES, F. H. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. et al. Haptoglobina en ruminantes: generalidades y posibles aplicaciones clinicas. **An. Vet.**, v.23, p.17, 2007.
- GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels**. New York: ELSEVIER, 1995. 213p.
- HERRERA, H. M. **Infecção experimental em quatis (Nasua nasua) com Trypanosoma evansi (Steel, 1885) Balbiani 1888**. 1998. 91f. Dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária - Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- HERRERA, H. M.; AQUINO, L. P. C. T.; MENEZES, R. F.; MARQUES, L. C.; MORAES, M. A. V.; WERTHER, K.; MACHADO, R. Z. *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. **Veterinary Parasitology**, v.102, p.209-216, 2001.
- HERRERA, H. M.; DÁVILA, A. M. R; NOREK, A. ABREU, U. G.; SOUZA, S. S; D'ANDREA P. S; JANSEN, A. M. **Enzootiology of Trypanosoma evansi in Pantanal, Brazil**. **Veterinary Parasitology**, v.125, p.263-275, 2004.
- KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: ACADEMIC PRESS, 6.ed., 1997. 932p.
- KATHIRA, L. G.; AVSATTHI, B. L. Some biochemical changes in blood and serum of buffalo calves experimentally inoculated with *Trypanosoma evansi*. **Indian Veterinary Journal**, v.62, p.289-293, 1985.
- KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. **British Veterinary Journal**, v.48, p.279-282, 1992.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LE RAY, D. Structures antigeniques de *Trypanosoma brucei* (protozoa, Kinetoplastida). Analyse immunoelectrophoretique et étude comparative. **Société Belge de Médecine Tropicale**, v.55, p.129-311, 1975.

- LUN, Z. R.; DESSER, S. S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA. **Parasitology Today**, v.11, p.131-133, 1995.
- MARQUES, L. C. **Infecção experimental em equinos com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (*Sarcomastigophora: Trypanomatidae*)**. 1996. 136f. Tese de Livre Docência (Clínica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MOREIRA, R. D.; MACHADO, R. Z. Identificação e isolamento de *Trypanosoma evansi* em cão do município de Camapuã, MS In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 10, Jaboticabal: **Resumos.**, 1985. p.66.
- NAGLE, R. B.; WARD, P. A.; LINDSEY, H. B.; SADUN, E. H.; JOHNSON, A. J.; BERKAW, R. E.; HILDEBRANDT, P. K. Experimental infections with African trypanosomes. VI. Glomerulo-nephritis involving the alternative pathway of complement activation. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.23, p.15-26, 1974.
- NANTULYA, V. M. Trypanosomosis in domestic animals: the problem of diagnosis. **Revue Scientifique Technique**, v.9, p.357-367, 1990.
- NGURE, R. M.; ECKERSALL, P. D.; JENNINGS, F. W.; BURKR, J. M.; STEAR, M. J.; KENNRDU, P. G. E.; MURRAY, M. Major acute phase response of haptoglobin and serum amyloid-P following experimental infection of mice with *Trypanosoma brucei brucei*. **Parasitology International**, v.46, p.247-254, 1997.
- NUNES, V. L. B., OSHIRO, E. T. *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v.84, p.692, 1990.
- NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. C.; GARCIA, A. A.; DA SILVA, A. A.; BOGLIOLO, A. R. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma (trypanozoon) evansi* no pantanal sul mato-grossense. Estudo de reservatórios. **Revista Brasileira Parasitologia**, v.2, p.41-44, 1993.
- NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. C.; ESPINDOLA, M. A.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; NUNES, A. B.; PIRES, R. C.; GARCIA, W. B. Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose tegumentar e mal das cadeiras no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - Estudo de reservatórios, 1992-1994. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.3, p.29-35, 1994.
- OLIVEIRA, T. C. G.; SOGAYAR, R.; SALATA, E. Estudos sorológicos de infec es experimentais por *Trypanosoma evansi*, em cobaias. São Paulo, **Revista Instituto Medicina Tropical**, v.31, p.95-99, 1989.
- PASSOS, P. B. **Infec o experimental em ovinos com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (*Sarcomastigophora: Trypanomatidae*)**. 2004. 236f. Tese de Doutorado (Medicina Veterinária - Clínica Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- PATELLI, T. H. C.; MARQUES, L. C.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, P. C. Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science.**, v.45, p.481-487, 2008.
- SANDOVAL, G. L.; COPPO, N. B.; NEGRETTE, M.; FRANCISCATO, C.; LOPES, T. A.; PAIN, C. B.; RODRIGUES, A.; TEIXEIRA, M. Altera es bioquímicas e histopatológicas de um cão e ratos infectados com *Trypanosoma evansi*. **Hora Veterinaria**, v.14, p.53-55, 1994.
- SILVA, R. A. M. S.; HERRERA, H. M.; BARROS, A. T. M. Trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil. **Interamericano Instituto Cooperación Agricultura**, v.2, p.1-2, 1995a.
- SILVA, R. A. M. S.; HERRERA, H. M.; BARROS, A. T. M. Trypanosomosis outbreak due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil. A preliminary approach on risk factors. **Revue  levage Médecine Pays Tropicaux**, v.48, p.315-319, 1995b.
- TEIXEIRA, M. C. A.; MARQUES, L. C.; CADIOLI, F. A.; FAGLIARI, J. J.; MACHADO, R. Z.; SILVA, P. C. Proteinogramas séricos de ratos Wistar experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.60, p.1447-1453, 2008.
- VERMA B. B.; GAUTAM, O. P. Electrophoretic analysis of serum proteins of calves experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Indian Journal Animal Health.**, v.18, p.33-37, 1979.
- VERMA B. B.; GAUTAM, O. P. Serological diagnosis of experimental bovine surra (*Trypanosoma evansi* infection). A comparison of passive haemagglutination, gel difusi n and indirect fluorescent antibody test. **Indian Veterinary Journal**, v.54, p.809-813, 1982.
- VICKERMAN, K. Antigenic variation in trypanosomes. **Nature**, v.273, p.803-813, 1978.