

Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente

Diminazene aceturate and imidocarb dipropionate in the control of *Trypanosoma evansi* infection in *Rattus norvegicus* experimentally infected

Aleksandro Schafer da Silva^I Camila Tochetto^I Régis Adriel Zanette^I Felipe Pierezan^{II}
Daniel Ricardo Rissi^{II} Janio Moraes Santurio^{III} Silvia Gonzalez Monteiro^{III*}

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do aceturato de diminazeno e do dipropionato de imidocarb no controle da infecção por *Trypanosoma evansi* em ratos (*Rattus norvegicus*) infectados experimentalmente. Cinquenta e quatro ratos machos foram inoculados via intraperitoneal com 10^4 tripomastigotas de *T. evansi*/animal. Os ratos foram monitorados diariamente por meio de esfregaço sanguíneo periférico. No momento em que se observassem oito protozoários por campo microscópico de 1000x, era iniciado o tratamento com as drogas (dia zero). O estudo foi dividido em dois protocolos terapêuticos e os fármacos foram administrados via intramuscular. O primeiro protocolo foi aplicado nos grupos A, B, C e D e o segundo protocolo nos grupos E, F, G e H. O grupo controle foi identificado como grupo I, não medicados. No primeiro protocolo, os ratos receberam uma dose única dos fármacos no dia zero e sempre que se observasse *T. evansi* na circulação periférica. No segundo protocolo, os roedores receberam as mesmas doses, no entanto, por cinco dias consecutivos. No primeiro protocolo, os dois princípios ativos não apresentaram eficácia curativa, ocorrendo reincidência da parasitemia após alguns dias do tratamento. No segundo protocolo, o aceturato de diminazeno eliminou a forma tripomastigota da circulação e os ratos foram eutanasiados após 90 dias do início do tratamento. Os roedores tratados com dipropionato de imidocarb apresentaram recidiva da infecção após 30 dias. Na histopatologia não se observou alteração renal e hepática relacionada à doença ou aos medicamentos testados. Com base nos resultados, foi concluído que o aceturato de diminazeno, quando administrado por cinco dias consecutivos, é efetivo no tratamento da tripanossomose em ratos.

Palavras-chave: tripanossomose, imidocarb, aceturato, roedores, histopatologia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficacy of diminazene aceturate and imidocarb dipropionate in the control of *Trypanosoma evansi* infection in rats (*Rattus norvegicus*) experimentally infected. Fifty-four male rats were inoculated through intraperitoneal route with 10^4 *T. evansi* trypomastigotes. The rats were evaluated daily by periferic blood smears examination and treated when eight flagellated parasites were observed in 1000x microscopic field. Two therapeutics protocols were used. The first one included Groups A, B, C, D in which the rats were submitted to a single dose of the testing drugs administered by intramuscular route at the day 0 and again when *T. evansi* was observed in the blood smears. The rats of the second protocol (Groups E, F, G, H) were submitted to the same treatment by five consecutive days. Four rats (Group I) were used as control and were not submitted to any treatment. Tested drugs did not show any curative effect when used in the first protocol, since parasitaemia was evident few days after treatment. The use of diminazene aceturate in the second protocol resulted in elimination of the trypomastigotes from circulation. In this case the rats were euthanized at the day 90. The infection recurred 30 days after the administration of imidocarb dipropionate. Histologically, no lesions were found in the liver or kidney. Diminazene aceturate is effective in treating trypanosomosis in rats when used five days consecutively.

Key words: trypanosomosis, imidocarb, aceturate, rodents, histopathology.

INTRODUÇÃO

Trypanosoma evansi é um protozoário da seção salivaria, agente etiológico da doença conhecida como Mal das Cadeiras ou surra em equinos (SILVA et

^ICurso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{II}Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM, Camobi, Km 9, Prédio 20, sala 4232, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: sgmonteiro@uol.com.br. *Autor para correspondência.

al., 2002). É geralmente monomórfico, tem um pequeno cinetoplasto subterminal, embora existam formas acinetoplásticas, como as cepas brasileiras (VENTURA et al., 2000). Ele apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo na África, Índia, Malásia, Indonésia, China, Rússia, Filipinas, América Central e América do Sul. É comumente observado parasitando o sangue de cavalos, camelos, burros, bovinos, zebuínos, caprinos, suínos, cães, búfalos, elefantes, capivaras, quatis, antas, veados, pequenos roedores silvestres e humanos (SILVA et al., 2002; JOSHI et al., 2005).

Os tripanossomas são parasitos digenéticos, que reproduzem-se por fissão binária longitudinal, quando estão no sangue de seu hospedeiro (BRUN et al., 1998). Os tripomastigotas, presentes nos vasos sanguíneos de vertebrados, são transmitidos por insetos hematófagos durante o repasto sanguíneo (SILVA et al., 2002). Em eqüinos, a doença provoca anemia, edema de membros e partes baixas, febre, letargia, perda de apetite, emagrecimento, lacrimejamento, aborto, perda de condição corporal, formações de placas cutâneas (onde os pêlos ficam eriçados), sangramentos nasais e oculares e uma claudicação típica, que denomina a enfermidade, sendo rapidamente fatal em roedores, cães, eqüinos e camelos (KUBIAK & MOLFI, 1954; MAHMOUD & GRAY, 1980; SILVA et al., 1995; CARREIRA, 2005). Em ratos os sinais clínicos de apatia e prostração somente são observados 24 horas antes da morte dos animais (DOYLE et al., 2007).

O aceturato de diminazeno é o produto mais comumente usado no controle das tripanosomoses dos animais domésticos por apresentar alto índice terapêutico na maioria dessas espécies (PEREGRINE & MAMMAM, 1993). É uma diamidina que tem atividade tripanocida, babesicida e bactericida, principalmente para *Brucella* sp. e *Streptococcus* sp.. Os fabricantes indicam uma dose única de 3,5mg kg⁻¹ para eqüinos, bovinos, ovinos e caninos, ocorrendo desaparecimento dos sinais clínicos em 24 horas (BRENDER et al., 1991).

O dipropionato de imidocarb é uma carbanilida, cuja ação baseia-se na alteração morfológica e funcional do núcleo e do citoplasma do parasito. Os resíduos metabólicos deste fármaco são depositados no fígado e no rim por longo período, o que pode resultar em necrose nesses órgãos. (ANDRADE & SANTARÉM, 2002). Em bovinos, os derivados do imidocarb são recomendados para a quimioprofilaxia da tristeza parasitária bovina, devido ao seu efeito babesicida e anaplasmicida (FARIAS, 1998).

O controle da tripanossomose é preocupante, pois os medicamentos vendidos comercialmente não apresentam eficácia no combate ao *T. evansi*, mesmo quando usados na posologia indicada, ocorrendo recidiva da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do aceturato de diminazeno e do dipropionato de imidocarb, com diferentes protocolos terapêuticos, no controle de infecções por *Trypanosoma evansi* em ratos (*Rattus norvegicus*) infectados experimentalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no biotério experimental do Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, onde os roedores receberam diariamente ração comercial e água à vontade, sendo mantidos em temperatura e umidade controlada (25°C; 70% UR). Foram utilizados 54 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, com dois meses de idade, separados em nove grupos com seis animais cada.

Todos os animais foram inoculados no dia zero, com uma cepa de *T. evansi* isolada de um cão infectado naturalmente, no município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul (COLPO et al., 2005), mantida em laboratório sob cultura viva em ratos wistar. O sangue foi inoculado via intraperitoneal na concentração de 10⁴ tripomastigotas/animal. Os ratos foram monitorados diariamente por meio de esfregaço sanguíneo periférico (SILVA et al., 2006).

Nos grupos tratados, os medicamentos somente foram administrados quando foram observados, no esfregaço sanguíneo, em média, oito tripomastigotas por campo microscópico em aumento de 1000 vezes. O estudo foi dividido em dois protocolos terapêuticos, administrados via intramuscular. No primeiro protocolo, os animais dos grupos A, B, C e D receberam uma dose única das drogas testes no dia zero e, posteriormente, sempre quando apresentavam o *T. evansi* na circulação periférica com o objetivo de manter os ratos vivos por mais de 60 dias. No segundo protocolo, os grupos E, F, G e H receberam as mesmas doses do outro protocolo, no entanto, em intervalos de 24 horas, por cinco dias consecutivos. O grupo controle, grupo I, contendo o mesmo número de animais dos demais grupos, não recebeu medicação. Os ratos medicados com aceturato de diminazeno receberam 3,5mg kg⁻¹ (grupos A e E) e 7mg kg⁻¹ (grupo B e F) e os animais tratados com dipropionato de imidocarb receberam 2mg kg⁻¹ (grupo C e G) e 4mg kg⁻¹ (grupo D e H).

No primeiro protocolo, os medicamentos somente foram administrados até 60 dias após início do estudo, no entanto, os animais foram acompanhados

por 90 dias. Considerou-se eficaz o medicamento que não ocasionou a morte dos ratos no decorrer do experimento e que foi capaz de eliminar o protozoário da circulação periférica. No segundo protocolo, os ratos que sobreviveram ao tratamento também foram acompanhados por 90 dias.

Os animais mortos ou sacrificados foram necropsiados, segundo as técnicas descritas por LUCCA et al. (1996). Na necropsia, foram coletados fragmentos de fígado e rim de dois animais por grupo. Todos os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10%, processados rotineiramente para histologia e corados pela hematoxilina-eosina.

A análise estatística dos dados foi feita por análise de variância (ANOVA), seguida da aplicação do teste de TUKEY para comparação entre as médias (SILVA & AZEVEDO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se, neste estudo, diferença estatística significativa quanto ao número de doses, ao intervalo entre doses e à longevidade de ratos dos grupos A, B, C e D. A longevidade dos animais tratados foi superior, estatisticamente, ao grupo controle, mas o protocolo terapêutico utilizado nos grupos A, B, C e D não apresentou eficácia medicamentosa (Tabela 1).

As doses de 3,5 e 7 mg kg⁻¹ de aceturato de diminazeno (grupos A e B), administradas em dose única no dia zero, não controlaram a infecção, pois o flagelado retornou à circulação após 25 e 37 dias, respectivamente. No entanto, a dose de 7 mg kg⁻¹ proporcionou um maior intervalo entre aplicações e conseqüente redução no número destas, sendo usadas somente duas doses no período de 60 dias. Os ratos dos grupos A e B, tratados com aceturato, apresentaram uma longevidade 84,2 e 70,6 dias, respectivamente (Tabela 1). DOYLE et al. (2007) testaram a eficácia do

aceturato na dose de 3,5 mg kg⁻¹ em ratos infectados experimentalmente com *T. evansi*, sendo observada uma longevidade dos machos de 28,8 dias após tratamento. Neste estudo, os resultados poderiam ser semelhantes se os ratos do grupo A não fossem tratados no dia 25, quando a parasitemia retornou (Tabela 1), pois animais tratados com aceturato de diminazeno podem apresentar resíduos do medicamento até 21 dias depois de administrados, o que explica a recidiva (MILLER et al., 2005).

Outros trabalhos apresentaram resultados satisfatórios no controle da infecção por *T. evansi* em ratos, quando utilizadas as posologias de 10 e 20 mg kg⁻¹ de aceturato de diminazeno (ELAMIN et al., 1982). ODIKA et al. (1995) avaliaram a eficiência da droga na dose de 7 mg kg⁻¹ e em associações com cloridrato de lítio e dexametasona em ratos infectados por *Trypanosoma brucei*, sendo concluído pelos autores que o aceturato, quando associado ao cloridrato de lítio, é mais eficaz no combate à tripanossomose. A associação de aceturato de diminazeno com difluorometilornitina também é efetiva no tratamento de *T. brucei* em ratos (ONYEYILI & ONWUALU, 1991). Os trabalhos citados anteriormente apresentaram bons resultados farmacológicos, tanto no uso individual como nas associações. Entretanto, neste estudo, as doses administradas para os grupos A e B não tiveram a mesma eficácia, pois, após alguns dias, houve reincidência da parasitemia, sendo necessárias novas doses para manter o animal vivo.

A administração de dipropionato de imidocarb na dose única de 2 e 4 mg kg⁻¹ nos grupos C e D propiciou o controle da parasitemia, embora tenham sido necessárias sete e cinco doses no período de 60 dias, respectivamente. Nesses grupos, verificou-se que na dose de 4 mg kg⁻¹ ocorreu um maior intervalo entre aplicações, possivelmente devido à maior quantidade de resíduos do medicamento na circulação (Tabela 1).

Tabela 1 - Número e intervalo entre doses, longevidade e parasitemia final de ratos medicados, nas diferentes concentrações de aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb contra *Trypanosoma evansi* em ratos infectados experimentalmente, durante 60 dias

Drogas	Grupos	Doses mg kg ⁻¹	Número de doses	Intervalo entre doses	Longevidade (dias)	Parasitemia final (flagelados/campo)
Diminazeno	A	3,5	3 ^a	25 ^a	84,2 ^a	195,6 ^a
	B	7,0	2 ^b	37 ^b	70,6 ^b	201,0 ^a
Imidocarb	C	2,0	7 ^c	7 ^c	64 ^c	210,8 ^a
	D	4,0	5 ^d	11 ^d	77,6 ^b	198,8 ^a
Controle	I	0,0	0 ^e	0 ^e	5,2 ^d	136,2 ^b

Obs: Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de TUKEY.

As drogas aceturato de diminazeno (grupos E e F) e dipropionato de imidocarb (grupos G e H), administradas por cinco dias consecutivos, apresentaram diferença estatística significativa entre os princípios ativos utilizados, mas não entre as doses. Nos ratos dos grupos E e F, não se observou o parasito na circulação, sendo estes sacrificados após 90 dias do tratamento (Tabela 2). Os resultados obtidos sugerem que essa terapia pode ser utilizada na cura de outras espécies animais como cavalos, bovinos e caninos.

Em experimentos com aceturato de diminazeno na dose de 3,5mg kg⁻¹ no tratamento de búfalos e camelos infectados por *T. evansi*, observou-se controle da infecção, no entanto, houve reincidência da parasitemia após alguns meses (LUN et al., 1991; MAINA et al., 2003). Já bovinos infectados por *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* e *T. brucei* depois de medicados com esse princípio ativo, foram considerados curados da enfermidade (MAGONA et al., 2004). No presente estudo, o medicamento quando administrado por cinco dias consecutivos, manteve os animais livres do parasito na circulação. Entretanto, com uma dose única da droga, os ratos apresentaram reincidência da doença, no primeiro protocolo, com aceturato de diminazeno, assim como ocorreu nos camelos e búfalos (LUN et al., 1991; MAINA et al., 2003).

Os animais medicados com dipropionato de imidocarb nos grupos G e H apresentaram uma longevidade de 31,4 e 32,8 dias, respectivamente. Dados semelhantes aos dados deste trabalho foram observados em camundongos parasitados por *T. brucei*, em que se utilizou imidocarb na dose de 10mg kg⁻¹ por três dias consecutivos e obteve-se uma longevidade de 30 dias, superior ao grupo que não foi tratado (NATHAN et al., 1979).

Em camundongos infectados experimentalmente por *Leishmania amazonensis*,

flagelado da mesma família do *T. evansi*, o dipropionato de imidocarb na dose de 34mg kg⁻¹, via subcutânea, foi eficaz no combate deste protozoário (RODRIGUES et al., 2006). Esta droga também apresenta bons resultados no combate de *Babesia sp.* em cavalos, cães e roedores, e *Anaplasma marginale* em bovinos (VIAL & GORENFLOT, 2006; COETZEE et al., 2006).

Neste estudo, os roedores que morreram em decorrência da enfermidade (grupo controle) e ineficácia dos medicamentos (grupos A, B, C, D, G e H) apresentaram parasitemia final, entre 136,2 e 210,8 tripomastigotas-campo, sendo observada diferença estatística entre os grupos tratados e grupo controle (Tabela 1 e 2). SILVA et al. (2007) verificaram, em ratos infectados via oral com *T. evansi*, parasitemia semelhante ao do grupo controle do presente estudo (125 tripomastigotas-campo).

Na histopatologia não foram observadas alterações renais e hepáticas relacionadas à tripanossomose ou aos medicamentos administrados. Entretanto, outros autores reportam alterações inflamatórias, necrose e substituição de células hepáticas por células inflamatórias mononucleares no fígado, infiltração de linfócitos, hemorragias interlobular e glomerulite nos rins de ratos infectados por *T. evansi*. (BISWAS et al., 2001; HAROUN et al., 2003). Apesar de não terem sido observadas alterações hepáticas e renais neste trabalho, a literatura considera o dipropionato de imidocarb nefrotóxico e hepatotóxico quando utilizado em doses elevadas ou por vários dias consecutivos (ADAMS, 1981).

CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento, o aceturato de diminazeno foi eficaz no controle da tripanossomose causada pelo *T. evansi* em *R. norvegicus* apenas quando utilizado por cinco dias

Tabela 2 - Avaliação da longevidade e parasitemia final de ratos infectados por *Trypanosoma evansi*, medicados com diferentes doses de aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb, por cinco dias consecutivos, a partir do dia zero.

Drogas	Grupos	Doses (mg kg ⁻¹)	Longevidade (dias)	Parasitemia final (flagelados/campo)
Diminazeno	E*	3,5	90 ^a	0,0 ^a
	F*	7,0	90 ^a	0,0 ^a
Imidocarb	G	2,0	31,4 ^b	208,8 ^b
	H	4,0	32,8 ^b	193,8 ^b
Controle	I	0,0	5,2 ^c	136,2 ^c

*Ratos eutanasiados após 90 dias.

Obs: Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de TUKEY.

consecutivos. Ao contrário, o dipropionato de imidocarb não foi eficaz para o controle desta enfermidade em nenhuma posologia. Nenhum dos medicamentos empregados causou lesões hepáticas ou renais nos animais tratados.

REFERÊNCIAS

ADAMS, L.G. Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. **Research in Veterinary Science**, v.31, p.54-61, 1981.

ANDRADE, S.F.; SANTARÉM, V.A. Endoparasitoides e ectoparasitoides. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. Roca: São Paulo, 2002. p.437-476.

BRANDER G.C. et al. **Veterinary applied pharmacology & therapeutics**. 5.ed. Toronto: Ballière Tindall/Saunders, 1991. 624p.

BISWAS, D. et al. Histopathology of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* infection in bandicoot rat. I. Visceral organs. **Experimental Parasitology**, v.99, p.148-159, 2001.

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

CARREIRA, J.C. **Sanguessugas podem transmitir o mal de cadeiras, doença de eqüinos que tem grande importância econômica no Brasil**. 2005. Capturado em 22 dez. 2005. Online. Disponível na Internet: http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/abr05/toxo_plasmose_fer.htm.

COETZEE, J.F. et al. Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb, and oxytetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale* infections in cattle. **Veterinary Therapeutics**, v.7, n.4, p.347-360, 2006.

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

DOYLE, R.L. et al. Eficácia de medicamentos no controle da infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em ratos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.1, p.67-71, 2007.

ELAMIN, E.A. et al. The efficacy of beronil (diminazene aceturate) against *Trypanosoma evansi* infection in mice. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.5, n.4, p.259-265, 1982.

FARIAS, N.A. Doenças parasitárias - Babesiose eqüina. In: CORREA, F.R. et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. Pelotas: UFPel, 1998. p.356-360.

HAROUN, E.M. et al. A preliminary comparative study on the efficacy of quinapyramine sulphate/chloride and melarsoprol in rats, experimentally infected with *Trypanosoma*

evansi. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v.6, p.215-221, 2003.

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

KUBIAK, G.V.L.; MOLFI, A. **Tripanosomiase eqüina (mal das cadeiras)**. Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná. Curitiba: Tip. João Haupt, 1954. 51p. (Boletim n.33).

LUCA, R.R. et al. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996. 259p.

LUN, Z.R. et al. Cymelarsan in the treatment of buffaloes naturally infected with *Trypanosoma evansi* in South China. **Acta Tropica**, v.49, n.3, p.233-236, 1991.

MAGONA, J.W. et al. Protective efficacy of isometamidium chloridate and diminazene aceturate against natural *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle under a suppressed tsetse population in Uganda. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.71, n.3, p.231-237, 2004.

MAINA, N. et al. Efficacy of Trypan® (diminazene aceturate) in camels infected with *Trypanosoma evansi*. **Journal of Camel Practice and Research**, v.10, n.1, p.51-55, 2003.

MAHMOUD, M.M.; GRAY, A.R. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Bslbiani, 1888. A review of recent research. **Tropical Animal and Health Production**, v.12, p.35-47, 1980.

MILLER, D.M. et al. The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.76, p.146-150, 2005.

NATHAN, H.C. et al. Curative effects of the antiprotozoals, amicarbalide and imidocarb on *Trypanosoma brucei* infection in mice. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.26, n.4, p.657-660, 1979.

ODIKA, I.E. et al. The chemotherapeutic efficacy of diminazene aceturate and lithium chloride against relapse infection of *Trypanosoma brucei brucei* in rats. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.46, n.2, p.99-102, 1995.

ONYEYILI, P.A.; ONWUALU, J.E. Efficacy of DFMO and diminazene aceturate in the treatment of late stage *Trypanosoma brucei brucei* infection in rats. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.42, n.2, p.143-145, 1991.

PEREGRINE, A.S.; MAMMAN, M. Pharmacology of Diminazene: a review. **Acta Tropica**, v.54, p.185-203, 1993.

RODRIGUES, F.H. et al. Effect of imidocarb and levamisole on the experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania*

- (Leishmania) *amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, v.139, n.1-3, p.37-46, 2006.
- SILVA, R.A.M.S. et al. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects. **Ciência Rural**, v.25, n.2, p.233-238, 1995.
- SILVA, R.A.M.S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia diagnóstico e controle, EMBRAPA. 2002. Online. Capturada em 15/01/2005. Disponível na Internet: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/Livro015>, 2002.
- SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assisat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.
- SILVA, A.S. et al. Métodos de contenção e confecção de esfregaço sangüíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos e camundongos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.13, n.2, p.83-87, 2006.
- SILVA, A.S. et al. Infecção via oral por *Trypanosoma evansi* em animais de laboratório. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.897-900, 2007
- VENTURA, R.M. et al. Molecular and morphological studies of brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: The total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. **Journal of Parasitology**, v.86, n.6, p.1289-1298, 2000.
- VIAL, H.J.; GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1-2, p.147-160, 2006.