

ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE NO CÉREBRO E CEREBELO DE RATOS WISTAR INOCULADOS COM *Trypanosoma evansi*.

Acetylcholinesterase activity in the brain and cerebellums of *Trypanosoma evansi* infected wistar rats.

SILVA, C.B.¹; WOLKMER, P.²; FRANCISCATO, C.³; TRAESEL, C.K.^{2*},
SILVA, A.S.²; SCHMIDT, C.¹; CARGNELUTI, J.¹, PAIM F.C.¹, LOPES, S.T.A.⁴

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) é um hemoprotozoário flagelado conhecido por causar infecção em vários hospedeiros mamíferos. O parasita tem distribuição geográfica ampla, sendo responsável por causar doença significativa em animais de áreas de clima tropical (LUN & DESSER, 1995; SILVA et al., 2002).

A infecção por *Trypanosoma evansi* causa alterações multifatoriais e diversos sinais clínicos são descritos nos hospedeiros, como anemia, elevação da temperatura corporal, a perda da condição física, a fraqueza e alterações neurológicas (NGERANWA et al., 1993).

As alterações neuroquímicas associadas às tripanossomíases com manifestações neurológicas e psiquiátricas vêm sendo estudadas. Foi demonstrado que a infecção aguda por *Trypanosoma cruzi* em ratos resulta em alterações na atividade da colina acetiltransferase e da acetilcolinesterase (AChE) (BRENNESSEL et al., 1985). Relatou-se também aumento na concentração da dopamina no tronco encefálico e norepinefrina no hipocampo, cerebelo, estriado e tronco encefálico de ratos infectados com *Trypanosoma brucei brucei* (AMOLE et al., 1989).

As colinesterases são enzimas presentes em tecidos colinérgicos e não colinérgicos assim como no plasma e outros fluídos corporais. São divididas em duas classes, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989). A BChE, também chamada de pseudocolinesterase, é mais ativa no fígado, intestinos, coração, rins e pulmões, hidrolisando preferencialmente a butirilcolina. (COKUGRAS, 2003). A AChE possui papel regulatório na neurotransmissão colinérgica, sendo responsável pela hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina. (DAVE et al., 2000).

A enzima AChE foi classificada em diferentes formas moleculares: formas globulares e assimétricas. As formas globulares de AChE estão presentes no cérebro e tem sido relatado que essas formas da enzima estão distribuídas de forma distinta nos neurônios (RIEGER, 1976; MASSOULIE, 1993; TAYLOR, 1994).

Distúrbios neurológicos são descritos no estágio final da doença em animais infectados por *Trypanosoma evansi* (RODRIGUES et al., 2005). Sinais de déficit sensorial, desorientação, agitação e agressão foram descritos em recente relato de infecção por *T. evansi* em humanos (JOSHI et al., 2005). No

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n. 1000, Hospital Veterinário, sala 107, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: patiwol@hotmail.com. Autor para correspondência.

³ Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Toxicologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

* Apresentador

entanto pouco se sabe sobre o efeito da infecção por *T. evansi* nas atividades neuroquímicas dos hospedeiros. Sendo assim, o objetivo deste experimento foi avaliar a atividade da acetilcolinesterase no cérebro e cerebelo em ratos da linhagem Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quinze ratos da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem Wistar, todos machos com 90 dias de idade pesando entre 250g a 290g, provenientes do Biotério Central de UFSM. Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura e umidade controlada (25°C e 80% UR), com livre acesso à água e ao alimento (ração comercial para roedores) durante todo o experimento. O isolado do *Trypanosoma evansi* foi proveniente de cães infectados naturalmente do município de Uruguaiana, RS (COLPO et al., 2005), propagado por passagens em ratos e conservados em nitrogênio líquido.

Os animais foram divididos, de maneira aleatória, em três grupos (controle, grupo teste 1 - T₁ e grupo teste 2 - T₂) compostos por cinco ratos. Os animais pertencentes aos grupos teste T₁ e T₂ foram inoculados pela via intraperitoneal com 0,2 ml de sangue contendo 10⁴ *T. evansi*, proveniente de um rato infectado experimentalmente. O grupo controle recebeu 0,2 ml de solução fisiológica pela via intraperitoneal (animais não infectados).

Após a eutanásia dos animais, a qual foi realizada no grupo teste T₁ no 3^o dia pós-infecção (dpi) e no grupo teste T₂ e grupo controle no 5^o dia pós-infecção (dpi), foi coletada uma alíquota de sangue intracardiaca para avaliação da parasitemia em câmara de Neubauer, em diluição (1:400) com solução fisiológica. Cérebro e cerebelo foram coletados, pesados e homogeneizados separadamente em solução tampão Tris-HCl 10 mmol, pH 7.2 com sacarose 160 mmol (1:10, p/v). As amostras foram congeladas a -20°C até o momento das análises enzimáticas.

A atividade da AChE de homogeneizado de cérebro e cerebelo foi determinada pelo método de ELLMAN et al. (1961) modificado por PEREIRA et al. (2004). O meio de ensaio contendo DTNB 1.04 mmol e tampão fosfato de potássio 24 mmol pH 7,2, foi incubado por 2 minutos a 30°C com 25 µL da amostra e a reação iniciada com adição de acetiltiocolina (ATC) 0,83 mmol L⁻¹. O produto da reação foi determinado em 412 nm durante 2 min. A atividade foi expressa em µmol de ATC hidrolisada h⁻¹ mg de proteína⁻¹. A concentração de proteína das amostras do homogeneizado de cérebro e cerebelo foi determinada pelo método de azul Coomassine (BRADFORD, 1976), utilizando-se a albumina sérica bovina como padrão.

Todas as análises foram avaliadas em duplicata ou triplicata. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão (m±ep), foram analisados pela análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguidas pelo teste de raio múltiplo de Duncan utilizando o programa SPSS/PC (Statistical Package for Social Sciences). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando P = 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n. 1000, Hospital Veterinário, sala 107, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: patiwol@hotmail.com. Autor para correspondência.

³ Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Toxicologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

* Apresentador

Ratos Wistar são considerados modelos apropriados para estudos com *Trypanosoma evansi* por apresentarem a parasitemia típica dos tripanossomos (WOLKMER, et al. 2007). O *T. evansi* foi detectado no sangue periférico de todos os ratos 24h após a inoculação intraperitoneal do parasito e o grau de parasitemia periférica diária aumentou de forma progressiva. A média de parasitas foi de 10^4 e 10^5 por μL de sangue no 3° e no 5° dpi, respectivamente. Sinais clínicos como apatia e fraqueza foram observados a partir do 4° dpi e no 5° dpi dois animais apresentaram quadro convulsivo. A infecção pelo *T. evansi* não alterou o peso (Tabela 1)

Tabela 1 - Pesos de cérebro e cerebelo de ratos Wistar no 3° e 5° dia pós-infecção com *Trypanosoma evansi*, grupos T₁ e T₂ respectivamente, comparados com o grupo controle (não infectados).

Grupo	Cérebro (g)	Cerebelo (g)
Controle	1,29 ± 0,02	0,28 ± 0,012
T ₁	1,28 ± 0,03	0,28 ± 0,005
T ₂	1,32 ± 0,02	0,29 ± 0,009

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão, n=5

Pode-se observar uma tendencia a alteração da atividade da AChE de cérebro e cerebelo ($P \approx 0,06$; Figura 1). Provavelmente devido ao curto tempo de infecção em ratos, pois estes animais não sobrevivem mais de sete dias parasitados. A AChE é uma importante enzima regulatória que controla o impulso nervoso colinérgico, tanto nas sinapses colinérgicas cerebrais quanto nas musculares (TAYLOR & RADIC, 1994). As AChEs regulam o efeito do neurotransmissor acetilcolina (ACh), pois se o mesmo permanecesse ligado por longo tempo aos receptores causaria uma superestimulação do sistema colinérgico, levando a sinais como: agitação, fraqueza muscular, miose, hipersalivação, sudorese, insuficiência respiratória, inconsciência, confusão mental, convulsão e morte (PATRICK, 2001). Ainda tem-se correlacionado sua participação no crescimento e adesão celular (DARBOUX et al., 1996), neurogênese (LAYER, 1990), sinaptogênese (LAYER, 1991) e hematopoiese (LEV-LEHMAN et al., 1994). Contudo, o efeito da infecção pelo protozoário na atividade da acetilcolinesterase (AChE) merece estudo mais aprofundado.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n. 1000, Hospital Veterinário, sala 107, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: patiwol@hotmail.com. Autor para correspondência.

³ Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Toxicologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

* Apresentador

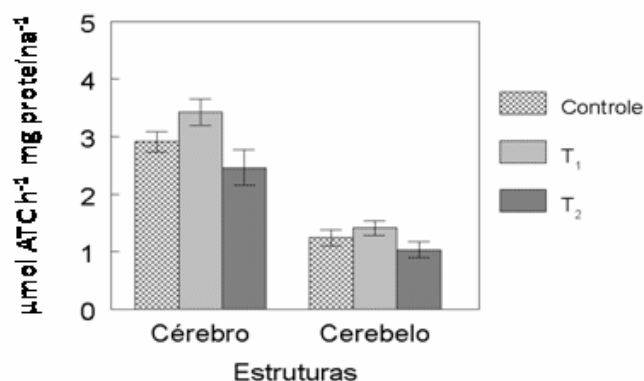


Figura 1 – Efeito da infecção por *Trypanosoma evansi* em ratos Wistar na atividade de acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e cerebelo avaliadas no 3° (T₁) e 5° (T₂) dia pós-inoculação e comparados com o grupo controle (não infectados). Os resultados são apresentados em média e erro padrão (teste de Duncan: P<0,05; n=5).

CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar submetidos à infecção experimental pelo parasito *Trypanosoma evansi* não demonstram alterações significativas da atividade da acetilcolinesterase no cérebro e cerebelo.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (CCR/UFSM), nº23081.005984/2008-23, de acordo com legislação vigente e os Princípios Éticos publicados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

REFERÊNCIAS:

AMOLE, B. et al. Neurochemical measurements in the brains of mice infected with *Trypanosoma brucei brucei* (TREU 667). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.83, n.3, p.225-232, 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

BRENNESSEI, D.J. et al. Acetylcholinesterase levels in skeletal muscle of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.34, n.3, p.460-464, 1985.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n. 1000, Hospital Veterinário, sala 107, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: patiwol@hotmail.com. Autor para correspondência.

³ Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Toxicologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

* Apresentador

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v.260, n.3, p.625-634, 1989.

COKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, v.28, n.2, p.54-61, 2003.

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

DARBOUX, I. et al. The structure-function relationships in *Drosophila neurotactin* show that cholinesterasic domains may have adhesive properties. **EMBO Journal**, v.15, n.18, p.4835-4843, 1996.

DAVE, K.R. et al. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. **Section C Journal of Biosciences**, v.55, n.1-2, p.100-108, 2000.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p.88-95, 1961.

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

LAYER, P.G. Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. **BioEssays**, v.12, n.9, p.415-420, 1990.

LAYER, P.G. Cholinesterases during development of the avian nervous system. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.11, n.1, p.7-33, 1991.

LEV-LEHMAN, E. et al. Antisense inhibition of acetylcholinesterase gene expression causes transient hematopoietic alterations in vivo. **Gene Therapy**, v.1, n.2, p.127-135, 1994.

LUN, Z.R.; DESSER, S.S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? **Parasitol Today**, v.11, p.131-133, 1995.

MASSOULIE, J.; et al. **Progress Neurobiol.** v.41, n.1, p.31-91, 1993.

NGERANWA J.J et al. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* in small east African goats. **Research Veterinary Science**, v.54, n.3, p.283-289, 1993

PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Second edition, Oxford, 2001. Chap. 15, 432.

PEREIRA, M.E. et al. 5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. **Toxicology Letter**, v.146, n.3, p.269-274, 2004.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n. 1000, Hospital Veterinário, sala 107, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: patiwol@hotmail.com. Autor para correspondência.

³ Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Toxicologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

* Apresentador

RIEGER, F.; VIGNY, M. J. **Neurochem.** v.27, p.121-129, 1976.

RODRIGUES, A. et al. Surto de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.239-249, 2005.

SILVA, R.A.M.S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia Diagnóstico e Controle, **EMBRAPA**. Capturado em 07 de ago. 2008. On line. Disponível na Internet:<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/Livro015>, 2002.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. **Annual Ver. Pharmacol. Toxicol.** 1994, p. 34, 281

WOLKMER, P. et al. Resposta eritropoética de ratos em diferentes graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p.1682-1687, 2007.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n. 1000, Hospital Veterinário, sala 107, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: patiwol@hotmail.com. Autor para correspondência.

³ Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Toxicologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

* Apresentador