

# ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE NA INFECÇÃO AGUDA POR *Trypanosoma evansi* EM RATOS WISTAR

## Butyrylcholinesterase activity on *Trypanosoma evansi* acute infected wistar rats

SCHMIDT, C.<sup>1</sup>; WOLKMER, P.<sup>2</sup>; SILVA, A.S.<sup>2</sup>; FRANCISCATO, C.<sup>3</sup>; TRAESEL, C.K.<sup>2</sup>; DORNELES T.<sup>1\*</sup>; PAIM F.C.<sup>1</sup>; PAGNONCELLI, M.<sup>1</sup>; SILVA, C.B.<sup>1</sup>; LOPES, S.T.A.<sup>4</sup>

## INTRODUÇÃO

As tripanossomíases são causadas por espécies do gênero *Trypanosoma*, que pertencem ao filo Euglenozoa, da classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina. A característica principal desses protozoários é a presença de um cinetoplasto localizado na base do flagelo, que contém o DNA mitocondrial (VICKERMAN, 1976). Os tripanossomas patogênicos de importância na pecuária estão classificados na seção Salivaria, dos quais apenas o *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma evansi* foram encontrados na América do Sul (SILVA et al., 2002).

*Trypanosoma evansi* é um parasita comum nos trópicos, que causa uma doença séria e de grande importância econômica em animais domésticos (OME et al., 2007). Afeta muitas espécies de animais domésticos e selvagens (FRANKE et al., 1994). Sua transmissão é essencialmente mecânica. O protozoário é transferido de um hospedeiro mamífero a outro por insetos picadores, principalmente tabanídeos e *Stomoxys sp.*, e por morcegos hematófagos (HOARE, 1972). Existe também a possibilidade de transmissão por carrapatos (CAMARGO et al., 2004).

As colinesterases são enzimas presentes em tecidos colinérgicos e não colinérgicos assim como no sangue e outros fluidos corporais. São divididas em duas classes de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidade aos substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual: AChE e a butirilcolinesterase BChE (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989). A AChE, é responsável pela hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina. A AChE está amplamente distribuída no sistema nervoso central, músculos e membrana de eritrócitos (DAVE et al., 2000). A butirilcolinesterase é uma enzima que atua na butirilcolina, mas também hidrolisa a acetilcolina. Possui alta atividade no fígado, intestinos, coração, rins e pulmões. A BChE sérica é sintetizada no fígado e liberada para o plasma (COKUGRAS, 2003).

A butirilcolinesterase está envolvida em diferentes atividades enzimáticas semelhante à acetilcolinesterase. O papel da acetilcolinesterase na neurotransmissão está bem definido, porém a real função da BChE ainda não foi totalmente esclarecido. Ambas as enzimas possuem fórmula molecular similar com diferente distribuição tecidual. A sua atividade tem sido avaliada nos processos de detoxificação de organofosforados, na regulação da transmissão colinérgica, na inativação de algumas drogas como cocaína,

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

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

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

<sup>4</sup> Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

\* Apresentador

aspirina ou na inativação de outras substâncias como heroína (COKUGRAS, 2003).

Animais infectados por *Trypanosoma evansi* desenvolvem anemia (WOLKMER et al., 2007) e sinais clínicos de distúrbio neurológico são descritos no estágio final da doença (RODRIGUES et al., 2005). Em recente relato da primeira infecção por *T. evansi* em humanos foi descrito sinais de déficit sensorial, desorientação, agitação e agressão (JOSHI et al., 2005). Contudo não há estudos quanto ao efeito da infecção por *T. evansi* nas atividades neuroquímicas dos hospedeiros. Sendo assim, o objetivo deste experimento foi avaliar se a infecção aguda por *T. evansi* altera a atividade de butirilcolinesterases em ratos Wistar.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 15 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos com 90 dias (230-270 g) oriundos do Biotério Central da UFSM. Os animais foram mantidos em gaiolas, com temperatura e umidade controlada (25°C e 80% UR) e livre acesso à água e ao alimento (ração comercial para roedores).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de cinco. O grupo controle recebeu 0,2 ml de solução fisiológica, pela via intraperitoneal (animais não inoculados). Os grupos teste 1 (T<sub>1</sub>) e teste 2 (T<sub>2</sub>) foram inoculados pela mesma via com 0,2 ml de sangue contendo 10<sup>4</sup> *T. evansi*, proveniente de um rato infectado experimentalmente. A parasitemia individual foi avaliada diariamente pela pesquisa microscópica do esfregaço de uma gota de sangue coletada da cauda de cada animal. As lâminas foram coradas por Panótico Rápido® e observadas em microscópio óptico de luz no aumento de 1.000 vezes, estipulando-se a média de tripanossomos em dez campos homogêneos focados aleatoriamente.

Os animais foram anestesiados em câmara éter etílico 99% para coleta de sangue, por punção cardíaca no 3° (T<sub>1</sub>) ou 5° dia pós infecção (T<sub>2</sub> e controle). O sangue foi coletado em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%. As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 min a 1.000 g, e o plasma foi congelado até o momento das análises. A atividade enzimática da BChE plasmática foi determinada pelo método de ELLMAN et al. (1961). O sistema contendo tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4; DTNB 0,30 mmol L<sup>-1</sup> e 50 µL de plasma foi incubado por 2 min. a 30°C e a reação foi iniciada pela adição de butiriltocolina (BTC) 1 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro por 2 min a 412 nm. As amostras foram analisadas em duplicata ou triplicata. A atividade enzimática foi expressa em µmol de BTC hidrolisada h<sup>-1</sup> mL de plasma<sup>-1</sup>.

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão (m±ep) e 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

O *T. evansi* foi detectado no sangue periférico de todos os ratos 24h após a inoculação intraperitoneal do parasito. O grau de parasitemia aumentou progressivamente (Figura 1). Sinais clínicos como apatia e fraqueza foram observados a partir do 4º dpi, demonstrando que esta linhagem de ratos possui extrema suscetibilidade a infecções por *T. evansi*, que produz uma síndrome aguda.

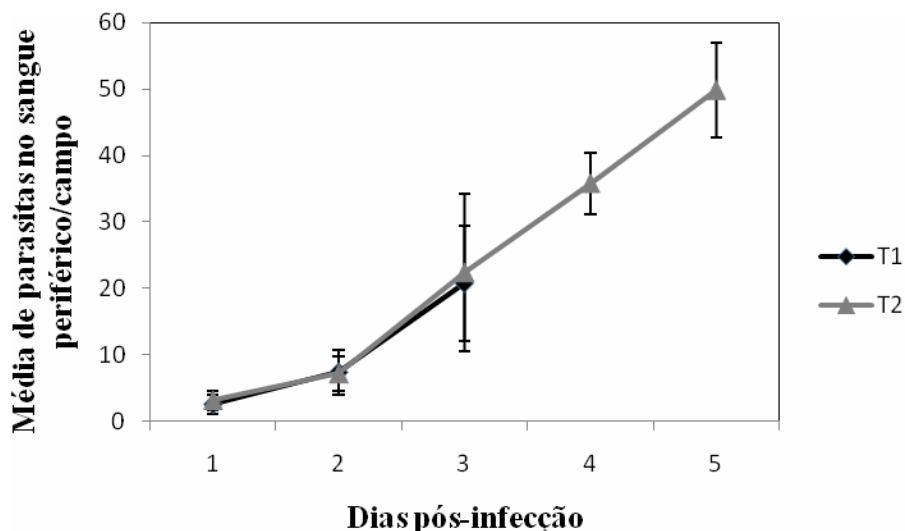


Figura 1 – Variação da média diária da parasitemia avaliada em esfregaço de uma gota de sangue da cauda de ratos Wistar, inoculados com *Trypanosoma evansi*. A eutanásia foi realizada no 3º e 5º dia pós-inoculação, grupos T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> respectivamente.

Os animais do grupo T<sub>1</sub> apresentaram redução na atividade da BChE plasmática (Figura 2). O papel da BChE na neurotransmissão não está bem definido, porém sabe-se que esta enzima tem pequeno papel na hidrólise da acetilcolina e butirilcolina, e a redução na sua atividade poderia estar interferindo na transmissão do impulso nervoso. Como a BChE plasmática tem sua síntese no fígado (WESCOE et al., 1947), a diminuição da atividade sintética hepática trará como consequência redução na atividade da enzima (SINGH et al., 1976; LEMBERG & MACCHI, 1981). Estudos realizados em diversas espécies de animais infectados com *T. evansi* demonstraram que a doença cursa com lesão hepática (AQUINO et al., 2002; HERRERA et al., 2002). Outros fatores que podem estar envolvidos com a redução da BChE é a anemia (PATINKIN et al., 1994) e infecções agudas (WHITTAKER, 1980). Assim, a redução da atividade da BChE na infecção por *T. evansi* possivelmente esteja envolvida com lesão hepática, anemia e até mesmo pela presença da infecção aguda no hospedeiro. Segundo WHITTAKER (1980), a redução de 25% da atividade da enzima em condição de doença poderia levar a morte.

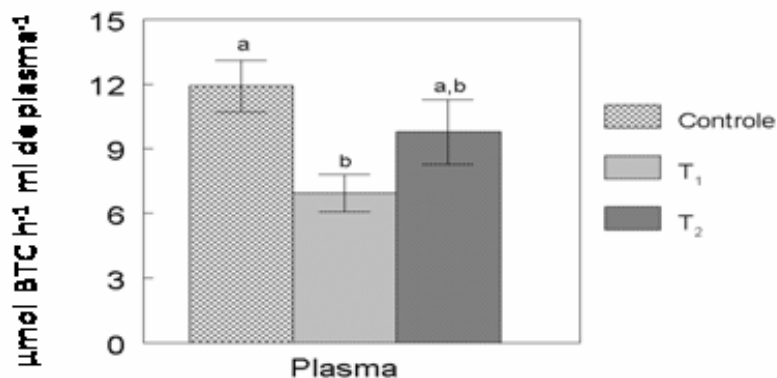


Figura 2 – Efeito da infecção por *Trypanosoma evansi* em ratos Wistar na atividade da butirilcolinesterase (BChE) plasmática, sendo avaliadas no 3° (T<sub>1</sub>) e 5° (T<sub>2</sub>) dia pós-inoculação e comparados com o grupo controle (não infectados). Os resultados são apresentados em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística (teste de Duncan: P<0,05; n=5).

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a infecção aguda por *T. evansi* em ratos Wistar reduz a atividade da butirilcolinesterase plasmática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUINO, L.P.C.T. et al. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.1, p.8-18, 2002.
- CAMARGO, R.E. et al. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its crossreactivity with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1, p.67-81, 2004.
- 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.
- 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.
- FRANKE, C.R. et al. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, v.58, p.159-169, 1994.
- HERRERA, H.M. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. **Acta Tropica**, v.81, n.3, p.203-210, 2002.

HOARE, C.A. **The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. 749p.

JOSHI, P.P. et al. Human Trypanosomosis 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.

LEMBERG, A.; MACCHI, M.C. Usefulness of serum pseudocholinesterase isoenzymes in acute and chronic liver diseases and neoplasms (experimental and clinical studies). **Acta Gastroenterologica Latinoamericana**, v.11, n.1, p.125-132, 1981.

OMER, O.H.; MOUSA, H.M.; AL-WABEL, N. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.142-145, 2007.

PATINKIN, D. et al. Antisense inhibition of butyrylcholinesterase gene expression predicts adverse hematopoietic consequences to cholinesterase inhibitors. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.14, n.5, p.459-473, 1994.

RODRIGUES, A. et al. Surtos 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.

SINGH, D.S. et al. Serum cholinesterase in hepatic disorders. **Journal of the Indian Medical Association**, v.66, n.3, p. 49-51, 1976.

WESCOE, W.C. et al. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **American Journal of Physiology**, v.149, p.549-551, 1947.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, v.35, n.2, p.174-197, 1980.

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.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W.H.R.; EVANS, D.A. **Biology of the kinetoplastida**. London/New York/San Francisco: Academic, 1976. p.1-34.