

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA – PPGBTOX**

**AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS, ENZIMÁTICAS E
COMPORTAMENTAIS EM RATOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *Trypanosoma evansi* E
UTILIZAÇÃO DA CURCUMINA COMO POSSÍVEL
AGENTE TERAPÊUTICO**

TESE DE DOUTORADO

Patrícia Wolkmer

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS, ENZIMÁTICAS E
COMPORTAMENTAIS EM RATOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *Trypanosoma evansi* E
UTILIZAÇÃO DA CURCUMINA COMO POSSÍVEL AGENTE
TERAPÊUTICO**

Patrícia Wolkmer

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, Área de concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinthia Melazzo A. Mazzanti

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Wolkmer, Patricia
AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS, ENZIMÁTICAS E
COMPORTAMENTAIS EM RATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
COM Trypanosoma evansi E UTILIZAÇÃO DA CURCUMINA COMO
POSSÍVEL AGENTE TERAPÊUTICO / Patricia Wolkmer.-2013.
146 p.; 30cm

Orientador: Cinthia Melazzo A. Mazzanti
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica,
RS, 2013

1. Trypanosoma evansi 2. memória 3. ansiedade 4.
glutamato 5. acetilcolinesterase I. Mazzanti, Cinthia
Melazzo A. II. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA – PPGBTOX**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado:

**AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS, ENZIMÁTICAS E
COMPORTAMENTAIS EM RATOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *Trypanosoma evansi* E UTILIZAÇÃO
DA CURCUMINA COMO POSSÍVEL AGENTE TERAPÊUTICO**

elaborada por
Patrícia Wolkmer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a Cinthia Melazzo A. Mazzanti (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Prof^a. Dr^a Marina Prigol, (UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a Fernanda Silveira Flôres Vogel, (UFSM)

Prof^a. Dr^a Marta Lizandra Rego Leal, (UFSM)

Dr^a Roberta Schmatz, (UFSM)

Santa Maria, 20 de maio de 2013.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho e ao meu marido os quais fazem com que o amor seja a fonte de inspiração para minha vida pessoal e profissional.

A minha família pelo amor, carinho, apoio, dedicação integral e ensinamentos que me proporcionaram. Por não ter medido esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, proporcionando coragem e força necessária para vencer os obstáculos que surgissem em meu caminho.

A professora Cinthia M. A. Mazzanti pela orientação, amizade, constante incentivo, ensinamentos, conselhos, exemplo de otimismo e caráter e acima de tudo, pelo seu exemplo contagiante de dedicação para o ensino e pesquisa.

A professora Sonia T. dos Anjos Lopes pela co-orientação durante o doutorado, constante incentivo, amizade, generosidade, aos diversos anos de ensinamentos, a confiança e também pelas conversas e escutas pacientes e conselheiras.

As minhas colegas e amigas Cássia Bagolin e Francine Paim as quais, a muitos anos, fazem parte da minha vida acadêmica e pessoal. Obrigada pela amizade, dedicação e apoio para realização deste e dos outros trabalhos.

Aos integrantes do Laboratório de Patologia Clínica (estagiários, residentes, funcionários e pós graduandos) desta universidade, que ao longo dos anos passaram ou ainda fazem parte da equipe. São tantas pessoas que me ajudaram que fica difícil citar nomes. A todos, obrigada pela convivência, ajuda e a troca de experiências. Vocês foram fundamentais para realização deste trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Parasitologia Veterinária em especial aos professores Silvia Gonzalez Monteiro e Aleksandro Schaefer pelo auxílio e ensinamentos com *Trypanosoma evansi*.

A equipe do Laboratório ENZITOX, em especial a Prof Maria Rosa C. Schetinger e Gustavo Thomé por toda atenção e disponibilidade.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, fica expresso aqui a minha gratidão. À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa e aos professores da Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica desta instituição pela oportunidade de realização de mais uma etapa na minha formação.

A CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica – PPGBTOX

AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS, ENZIMÁTICAS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Trypanosoma evansi* E UTILIZAÇÃO DA CURCUMINA COMO POSSÍVEL AGENTE TERAPÊUTICO

AUTORA: PATRICIA WOLKMER
ORIENTADORA: CINTHIA MELAZZO A. MAZZANTI

Data e Local: Santa Maria, 20 de maio de 2013.

Com este trabalho, buscou-se compreender os mecanismos da patogenia do *Trypanosoma evansi* no sistema nervoso central (SNC), periférico e imunológico. Para isso, foram avaliados os efeitos da infecção por *T. evansi* sobre o desempenho comportamental de ratos, relacionando-os com alterações neuroquímicas do sistema glutamatérgico e com as atividades de importantes enzimas cerebrais como a $\text{Ca}^{+2}\text{ATPase}$, a $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e a acetilcolinesterase (AChE). Avaliou-se também, a atividade da AChE no *T. evansi* usando um protocolo de bioquímica, buscando discutir algumas possibilidades de interação entre a presença desta enzima no parasita e suas possíveis relações com o hospedeiro. Também, foi investigado o efeito *in vivo* da curcumina como agente tripanocida, a fim de contribuir na busca de novas terapias. Com estes propósitos, foram realizadas varios estudos, sendo: no artigo I buscou-se avaliar se a infecção pelo protozoário altera o sistema colinérgico. Para isso, foram utilizados ratos experimentalmente infectados com *T. evansi* e avaliada a atividade da AChE no cérebro total, no cerebelo e no sangue e a atividade da butirilcolinesterase plasmática nos dias 3 e 5 pós infecção (pi); no artigo II tripanossomas foram isolados por coluna de dietilaminoetilcelulose para realizar ensaios enzimáticos da atividade da AChE no parasito; no artigo III doses diárias de Curcumina (20 ou 60 mg / kg) diluída em óleo de milho foram administradas diariamente por via oral (gavagem) como tratamento preventivo (30 ou 15 dias pré-infecção) e como tratamento durante quinze dias pi. Os animais foram avaliados quanto a parasitemia, as citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) plasmáticas e a atividade sanguínea da AChE; no manuscrito I foram avaliadas as alterações comportamentais (memória e ansiedade), a captação de glutamato, atividade da AChE e das ATPases (Ca^{+2} e Na^+ , K^+) nas estruturas encefálicas nos dias 5 e 30 de ratos infectados com *T. evansi*. Com estes estudos, pode-se concluir que ratos infectados com *T. evansi* apresentam déficit cognitivo, provavelmente causados por alterações nos parâmetros do metabolismo energético (ATPases) e nos sistemas colinérgico e glutamatérgico, sugerindo que as alterações observadas durante testes comportamentais provavelmente indicam uma disfunção neuroquímica. Também foi demonstrado que é possível detectar bioquimicamente a atividade da AChE no *T. evansi* e esta deve ser responsável pela hidrólise da acetilcolina no parasita. Quando os animais infectados foram tratados com curcumina demonstrou-se que o pré-tratamento com este composto induz efeitos imunomodulatórios, alterando os parâmetros inflamatórios tais como as citocinas e a atividade da AChE sanguínea. Desta forma, sugere-se que a curcumina pode ser utilizada como um suplemento alimentar em áreas endêmicas de tripanossomíase, uma vez que reduziu a carga parasitária e a mortalidade em ratos infectados com *T. evansi*, contribuindo assim com novas alternativas de tratamento.

Palavras-chave: glutamato, acetilcolinesterase, memória, ansiedade, Na^+ , K^+ATPase , $\text{Ca}^{+2}\text{ATPase}$, citocinas

ABSTRACT

Doctor Thesis
Post Graduate Course on Biological Sciences:
Toxicological Biochemistry – PPGBTOX
Federal University of Santa Maria (RS, Brazil)

NEUROCHEMICAL, ENZYMATIC AND BEHAVIORAL ASSESSMENT OF *TRYPANOSOMA EVANSI* EXPERIMENTALLY INFECTED RATS AND THE USE OF CURCUMIN AS A POSSIBLE THERAPEUTIC AGENT

AUTHOR: PATRICIA WOLKMER
ADVISER: CINTHIA MELAZZO MAZZANTI
Date and Local: Santa Maria, May 20th, 2013.

The pathogenesis of *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) infection on central and peripheral nervous system (CNS) and immunologic system it is not completely understood. This study was conducted to investigate the effects of infection by *T. evansi* on the behavioral performance of rats, relating them to neurochemical alterations of the glutamatergic system and activity of important enzymes such as Ca^{2+} ATPase, Na^+ / K^+ ATPase and acetylcholinesterase (AChE) in the brain. Furthermore, we evaluated the activity of AChE in the *T. evansi*, using a biochemical protocol and discussed some possibilities for the interaction between the presence of this enzyme in the parasite and its possible relation with the host. Also, we investigated the in vivo effect of curcumin as an antitrypanosomal agent to contribute in the search for new therapies. To this end, we conducted a series of studies, as follow that are presented as scientific articles: in the Article I are presented data from rats experimentally infected with *T. evansi* and in which the activity of AChE in total brain, cerebellum and blood and plasma butyrylcholinesterase activity on days 3 (T3) and 5 (T5) post infection (pi) were evaluated. In the Article II trypanosomes were isolated by Dietil Amino Etil-celulose column to perform enzymatic assays of AChE activity in the parasite. Article III presents the results of daily oral administration of Curcumin (20 or 60 mg / kg) as a preventive treatment (for 30 or 15 days pre-infection) or as curative treatment (for 15 days pi) for *T. evansi* infection in rats. The animals were evaluated for parasitemia, proinflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) in plasma. Also blood AChE activity was studied. In the manuscript I were evaluated behavioral changes (memory and anxiety), glutamate uptake, activity of AChE and ATPases (Ca^{+2} and Na^+ , K^+) in brain structures of *T. evansi* infected rats (5 and 30 dpi). Together these studies suggest that rats infected with *T. evansi* have cognitive impairment, probably caused by changes on energy metabolism (ATPases) and in the cholinergic and glutamatergic systems. That way, alterations observed during behavioral tests probably indicate the progression of clinical disease as a result of neurochemical dysfunction. It was also demonstrated that it is possible to biochemically detect the AChE activity in the *T. evansi* and this could cause the hydrolysis of acetylcholine in the parasite. It was also demonstrated that pretreatment with curcumin induces immunomodulatory effects, altering inflammatory cytokines and activity of AChE in rats infected with *T. evansi*. The treatments reduced parasitic load and mortality. Therefore, curcumin should be considered as a feeding supplement in trypanosomiasis endemic areas.

Palavras-chave: glutamate, acetylcholinesterase, memory, anxiety, Na^+ / K^+ ATPase, Ca^{+2} ATPase, cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esfregaço sanguíneo periférico de um humano demonstrando a presença de <i>T. evansi</i>	27
Figura 2 – Relação filogenética postulada entre três espécies intimamente relacionadas.....	29
Figura 3 – Esquema representativo do <i>Trypanosoma evansi</i>	30
Figura 4 – Variação antigênica do tripanossoma criando recidivas da parasitemia	31
Figura 5 – Transmissão e multiplicação (fissão binária) do <i>T. evansi</i>	32
Figura 6 – Esquema representativo da síntese, liberação e captação do glutamato e excitabilidade neuronal.	36
Figura 7 – Esquema representativo da síntese, liberação e hidrólise da acetilcolina.	39
Figura 8 – Hidrólise da acetilcolina no sítio ativo da acetilcolinesterase	40
Figura 9 – Representação esquemática das formas moleculares de acetilcolinesterase	42
Figura 10 – Frações moleculares da acetilcolinesterase nas células sanguíneas ..	43
Figura 11 – Atividade eferente do nervo vago leva a liberação de acetilcolina.....	43
Figura 12 – Esquema representativo da via colinérgica anti-inflamatória	47
Figura 13 – Esquema da produção das citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, células natural killer (NK) e células dendríticas	50
Figura 14 – Estrutura química, rizoma e extrato da curcumina	54

ARTIGO I

Figure 1 - Parasitemia of peripheral blood of rats infected with <i>Trypanosoma evansi</i> and euthanized at 3rd (T3 group) and 5th (T5 group) day post-infection. The results are presented as mean \pm SEM (n = 5).	60
Figure 2 - Acetylcholinesterase (AChE) activity in cerebrum and cerebellum (A); blood AChE activity (B) and plasma butyrylcholinesterase (BChE) activity (C) of rats infected with <i>Trypanosoma evansi</i> and euthanized at 3rd (T3 group) and 5th (T5 group). The specific activities were expressed as μ mol ATC hydrolyzed/h/mg of protein (A) μ U/l mol Hb and (B) and μ mol BTC hydrolyzed/h/mL of plasma (C). The results are presented as mean \pm SEM (n = 5). Different letters mean significant statistical differences. (Duncan's multiple range test P < 0.05).....	60

ARTIGO II

Figure 1 - Biochemical detection of acetylcholinesterase (AChE) in trypomastigotes forms of <i>T. evansi</i> . Relationship between AChE activity and protein concentration of the parasite (n=9).	66
--	----

ARTIGO III

Figure 1 - Effect of oral curcumin pre-treatment and treatment on the parasitemia (A) and survival rate (B) of <i>Trypanosoma evansi</i> infected rats. Curcumin was	
--	--

administered daily by oral gavage. All rats were infected by *T. evansi* at same day. The treatment of the groups continued until the day of euthanasia (15 days after inoculation). (UC) uninfected control group that received the vehicle (corn oil); (TRYP) infected control group that received the vehicle (corn oil); (Cur) curcumin; (Pretreat) pretreatment; (Treat) treatment; (pi) post infection. Values represent mean±SE, * represents statistical difference between TRYP and groups that receive curcumin ($P < 0.05$, n= 8-4 per group)..... 72

Figure 2 - Effect of oral curcumin pre-treatment and treatment on the proinflammatory cytokines of *T. evansi*-infection in Wistar rats. (A) interleukin – 1; (B) interleukin – 6; (C) tumor necrosis factor alpha; (D) interferon-gamma. Curcumin was administered daily by oral gavage. All rats were infected by *T. evansi* at same day. The treatment of the groups continued until the day of euthanasia (15 days after inoculation). (UC) uninfected control group that received the vehicle (corn oil); (TRYP) infected control group that received the vehicle (corn oil) and curcumin in the doses of 20 and 60mg/Kg. Values represent mean±SE, ++ represents statistical difference between UC and TRYP groups ($P < 0.001$); represents statistical difference between TRYP and groups that receive curcumin ($P < 0.05$, n= 8-4 per group)..... 73

Figure 3 - Effect of oral curcumin pre-treatment and treatment on the interleukin – 10 (A) and acetylcholinesterase activity in total blood (B) of *Trypanosoma evansi* infected rats. Curcumin was administered daily by oral gavage. All rats were infected by *T. evansi* at same day. The treatment of the groups continued until the day of euthanasia (15 days after inoculation). (UC) uninfected control group that received the vehicle (corn oil); (TRYP) infected control group that received the vehicle (corn oil) and curcumin in the doses of 20 and 60mg/Kg. Values represent mean±SE, + represents statistical difference between UC and TRYP groups and * represents statistical difference between TRYP and groups that receive curcumin ($P < 0.05$, n= 8-4 per group)..... 74

ARTIGO IV

Figure 1 - Inhibitory avoidance: Infection with *T. evansi* at day 4 pi (T5) impairs memory in adult rats. Data are the median ± interquartile range for 15 -26 animals in each group. * $P < 0.05$ compared with control group. Performance as three replicas and was evaluated by three different analyzers 110

Figure 2 - Elevated plus-maze: Infection with *T. evansi* at day 29 pi (T30) decreases the percentage of time spent on the open arms by adult rats tested in the elevated plus-maze. Data are the mean + SEM for 16-26 animals in each group. * $P < 0.05$ compared with control group. Performance as three replicas and was evaluated by three different analyzers..... 111

Figure 3 - Evaluation of L-[3H]glutamate uptake assays carried out in slices of cortex and hippocampus rats infected by *T. evansi* at days 5 (T5) and 30 (T30) pi. Results are expressed as mean ± S.E.M. * $P < 0.05$ compared to the control group (n=8 per group)..... 112

Figure 4 - Evaluation of acetylcholinesterase activity in cortex, striatum and hippocampus of rats infected by *T. evansi* at days 5 (T5) and 30 (T30) pi.

	Results are expressed as mean \pm S.E.M. * P < 0.05 compared to the control group (n=8 per group).....	113
Figure 5 - Evaluation of Na ⁺ , K ⁺ -ATPase activity in cortex, striatum and hippocampus of rats infected by <i>T. evansi</i> at days 5 (T5) and 30 (T30) pi. Results are expressed as mean \pm S.E.M. * P < 0.05 compared to the control group (n=8 per group).....		114
Figure 6 - Evaluation of Ca ⁺² -ATPase activity in cortex, striatum and hippocampus of rats infected by <i>T. evansi</i> at days 5 (T5) and 30 (T30) pi. Results are expressed as mean \pm S.E.M. * P < 0.05 compared to the control group (n=8 per group).....		115

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

- Table 1 – Hematological values of rats infected with *Trypanosoma evansi* and euthanized at 3rd (T3 group) and 5th (T5 group) day post-infection. 60
- Table 2 – Weights of cerebrum and cerebellum of rats infected with *Trypanosoma evansi* and euthanized at 3rd (T3 group) and 5th (T5 group) day post-infection..... 60

ARTIGO III

- Table 1 – Effect of oral administration of vehicle (corn oil) and curcumin (20 or 60 mg/kg) daily, during 45 days on cytokines and AChE activity (mean \pm S.E.M.) of rats (n=5)..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrometro
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChR	Receptor de acetilcolina
AChRα7	Subunidade alfa 7 do receptor de acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
AP	Área postrema
AMPA	α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico
APOL1	Apolipoproteína L-1
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHE	Barreira hemato-encefálica
BChE	Butirilcolinesterase
Ca ⁺²	Cálcio
COX-2	Ciclooxigenase -2
ChAT	Colina acetiltransferase
DEAE	Dietilaminoetil
DMN	Núcleo motor dorsal do nervo vago
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
H ⁺	Hidrogênio
HMGB1	Proteína do tipo <i>high mobility group box 1</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
Ig	Imunoglobulina
iGluR	Receptores ionotrópicos de glutamato
K ⁺	Potássio
KA	Acido caínico
kDNA	DNA do cinetoplasto
mRNA	RNA mensageiro
mGluR	Receptores metabotrópicos de glutamato
mAChR	Receptor muscarínico de acetilcolina

Na ⁺	Sódio
NA	Núcleo ambíguo
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NTS	Núcleo do tracto solitário
NK	<i>Natural killer</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
Pi	Pós infecção
PGE2	Prostaglandina E2
SNC	Sistema nervoso central
<i>T.</i>	<i>Trypanosoma</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VSG	Glicoproteína variável de superfície

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	23
1 INTRODUÇÃO	25
1. 1 Objetivos.....	56
2 ARTIGO I.....	57
ABSTRACT	58
1. INTRODUCTION	58
2. MATERIAL AND METHODS.....	59
2.1. <i>Animals</i>	59
2.2. <i>Trypanosome infection</i>	59
2.3. <i>Parasitemia estimation</i>	59
2.4. <i>Collection and preparation of blood and brain samples</i>	59
2.5. <i>Hematology</i>	59
2.6. <i>Enzyme assay</i>	59
2.7. <i>Protein determination</i>	59
2.8. <i>Statistical analysis</i>	59
3. RESULTS	59
3.1. <i>Parasitemia and course of the infection</i>	59
3.2. <i>Hematological changes</i>	60
3.3. <i>Enzyme changes</i>	60
4. DISCUSSION.....	60
REFERENCES	61
3 ARTIGO II.....	63
ABSTRACT	64
1. INTRODUCTION	64
2. MATERIAL AND METHODS.....	65
2.1. <i>Chemicals</i>	65
2.2. <i>Trypanosome strains</i>	65
2.3. <i>Isolation of trypomastigotes forms</i>	65
2.4. <i>AChE activity in the parasite</i>	65
2.5. <i>Protein determination</i>	65
2.6. <i>Ethics committee</i>	65
3. RESULTS AND DISCUSSION	65
REFERENCES	66
4 ARTIGO III.....	69
ABSTRACT	70
1. INTRODUCTION	70
2. MATERIAL AND METHODS.....	71
2.1. <i>Reagents</i>	71

2.2. <i>Animals</i>	71
2.3. <i>Experimental design</i>	71
2.4. <i>Etiological agent and inoculation</i>	71
2.5. <i>Parasitemia estimation</i>	71
2.6. <i>Collection and preparation of blood samples</i>	71
2.7. <i>Cytokines</i>	71
2.8. <i>Determination of AChE activity in whole blood</i>	71
2.9. <i>Statistical analysis</i>	71
3. RESULTS	71
3.1. <i>Parasitemia</i>	71
3.2. <i>Cytokine profile</i>	72
3.3. <i>Activity of AChE in whole blood</i>	72
4. DISCUSSION	72
REFERENCES	74
ACKNOWLEDGMENTS	74
5 MANUSCRITO I	77
ABSTRACT	79
1. INTRODUCTION	80
2. MATERIAL AND METHODS	82
2.1. <i>Reagents</i>	82
2.2. <i>Animals</i>	82
2.3. <i>Experimental design</i>	83
2.4. <i>Inoculation</i>	83
2.5. <i>Parasitemia estimation</i>	83
2.6. <i>Behavioral assessment - assessment of cognitive performance</i>	83
2.6.1. <i>Inhibitory avoidance</i>	84
2.6.2. <i>Open field</i>	84
2.6.3. <i>Elevated plus maze test</i>	84
2.6.4. <i>Foot shock sensitivity test</i>	85
2.7. <i>Uptake assay</i>	86
2.8. <i>Biochemical assessment</i>	86
2.8.1. <i>Estimation of acetylcholinesterase (AChE) activity</i>	87
2.8.2. <i>Na⁺, K⁺-ATPase activity measurement</i>	87
2.8.3. <i>Ca⁺²-ATPase activity measurement</i>	88
2.9. <i>Statistical analysis</i>	89
3. RESULTS	89
3.1. <i>Parasitemia</i>	89
3.2. <i>Behavioral tests</i>	90
3.2.1. <i>Memory and learning - Inhibitory avoidance</i>	90
3.2.2. <i>Anxiolytic activity - elevated plus-maze test of rats</i>	90
3.2.3. <i>[³H]Glutamate uptake</i>	91
3.3. <i>Activity of AChE in brain</i>	91
3.4. <i>ATPases</i>	91

4. DISCUSSION.....	91
5. ACKNOWLEDGMENTS.....	97
REFERENCES	97
6 DISCUSSÃO	117
7 CONCLUSÃO	123
8 PERSPECTIVA	125
REFERÊNCIAS.....	127

APRESENTAÇÃO

Essa tese de Doutorado está organizada seguindo a estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses (MDT) 2012. Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma artigos e manuscrito, os quais encontram-se nos itens Artigos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se nos próprios artigos e manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão, Conclusões e Perspectivas, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos e manuscrito contidos neste trabalho. As referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução e Discussão.

Os artigos e manuscrito estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram publicados ou submetidos, e apresentados em ordem cronológica do publicação:

Artigo 1: *Experimental Parasitology* (fator de impacto: 2,122)

Artigo 2: *Experimental Parasitology* (fator de impacto: 2,122)

Artigo 3: *Parasitology International* (fator de impacto: 2,132)

Manuscrito 1: *Parasitology* (fator de impacto: 2,961)

Todos os trabalhos descritos nesta tese foram desenvolvidos no Laboratório de Análises Clínicas Veterinária (LACVet) em conjunto com Departamento de Química da UFSM, sob a coordenação da Profa. Cinthia M. Mazzanti e Sonia T. dos Anjos Lopes, em associação com os laboratórios coordenados pelas professoras Maria Rosa C. Schetinger, Cristina W. Nogueira e Maribel A. Rubin

1 INTRODUÇÃO

Tripanossomas são protozoários hemoparasitas de uma grande variedade de espécies de animais e geralmente são transmitidos por um hospedeiro invertebrado intermediário. Cerca de 500.000 pessoas em 36 países da África subsaariana sofrem de tripanossomíase africana que é causada por diversos tripanossomas, entre eles *Trypanosoma brucei gambiense* ou *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Além deste, a doença de Chagas, outra forma da tripanossomíase humana, afeta mais de 8 milhões de pessoas no mundo, sobretudo na América Latina. As taxas de novas infecções e mortalidade não mostram nenhum sinal de declínio (AKSOY e RIO, 2005; SCHMUNIS, 2013). Além de sua importância para a saúde humana, estas infecções podem causar prejuízo financeiro, pois a doença pode ser fatal em animais de produção como bovinos, equinos, suínos e outros animais (AKSOY et al., 2003; SALIM et al., 2011; HABILA et al., 2012).

O *Trypanosoma evansi* pertence ao subgênero *Trypanozoon*, um grupo de tripanossomas que têm uma grande diversidade de hospedeiros mamíferos e é uma doença importante, pois o agente está presente em praticamente todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo (HERRERA et al., 2004; MEKATA et al., 2009). Embora a doença causada por tripanossomas já ocorresse há muitos séculos, a primeira associação entre o parasito e a enfermidade foi descrita por Griffith Evans em 1881 na Índia, que observou tripanossomas no sangue de equinos e camelos. Evans acreditou que a fonte primária da infecção para os animais fosse as águas poluídas. Mais tarde, Steel (1885) encontrou o mesmo agente no sangue de mulas (HOARE, 1972). No Brasil, a doença causada por *T. evansi* ocorreu a partir da importação de cavalos da Europa. Foi inicialmente observada na Ilha de Marajó, entre 1827 e 1830, onde iniciaram epizootias graves em equinos da região. Da Ilha de Marajó a doença se espalhou pela América do Sul, estendendo-se pela Guiana, Bolívia, Venezuela e Colômbia (HOARE, 1972).

A doença causada por *T. evansi* é conhecida por “Surra”, no entanto pode apresentar diversas denominações regionais como “el debab” na África, “su-auru” na Rússia, “murrina” no Panamá, “mal das cadeiras” no Brasil, entre outras. Sua ocorrência em várias localidades também deu origem a diferentes denominações específicas para *T. evansi*, entre eles: *T. cameli* na Somália, *T. soudanense* na

África, *T. aegyptum* no Egito, *T. hippicum* na América do Sul e Central, *T. venezuelense* na Venezuela e *T. equinum* na América do Sul (WOO, 1977). Acreditava-se que estes tripanossomas constituíam diferentes espécies até que em um estudo biométrico em 22 populações de tripanossomas, isolados de diferentes hospedeiros e localidades, concluiu-se que, apesar da grande variação nas medidas entre as cepas estudadas, todas as formas pertenciam a uma única espécie, o *T. evansi* (HOARE, 1956).

A doença é endêmica em diversas partes do mundo, como por exemplo, na Ásia onde o parasita afeta principalmente camelos (PATHAK et al., 1993; POURJAFAR et al., 2012). Em estudo epidemiológico feito no Sudão, que possui a segunda maior população de camelos do mundo (estimada em mais de 4 milhões de animais), foi observada prevalência da infecção do parasita de 5,4% em exame parasitológico e 31,3% através de ELISA (ELAMIN et al., 1998; SALIM et al., 2011). No Brasil, *T. evansi* afeta principalmente equinos e a prevalência varia de uma região para outra (DAVILA e SILVA, 2000; HERRERA et al., 2004). A doença é enzoótica no Pantanal mato-grossense, onde assume grande importância, pois esses animais são amplamente usados para o manejo de bovinos (FRANKE et al., 1994; AQUINO et al., 1999; HERRERA et al., 2004).

Surtos esporádicos acontecem em algumas regiões do Pantanal, podendo ocorrer com morbidade alta em certas sub-regiões e estar ausentes em outras (DAVILA et al., 1999). A tripanossomíase no Pantanal afeta equinos (FRANKE et al., 1994; SILVA et al., 1995; DAVILA et al., 1999; SEIDL et al., 2001), cães (FRANKE et al., 1994; HERRERA et al., 2004), capivaras (NUNES e OSHIRO, 1990; HERRERA et al., 2004), quatis (NUNES e OSHIRO, 1990; HERRERA et al., 2001; HERRERA et al., 2011), bovinos, búfalos, pequenos mamíferos, marsupiais e tatus (HERRERA et al., 2001; HERRERA et al., 2004). Embora os achados clínicos e laboratoriais indiquem que capivaras são os principais reservatórios de *T. evansi*, bovinos, cães e quatis, pelo amplo contato com equinos, também devem ser considerados como reservatórios eficientes (FRANKE et al., 1994; HERRERA et al., 2011). A alta soroprevalência em equinos sugere que esses animais estão mais expostos à infecção por *T. evansi* do que as outras espécies (HERRERA et al., 2004). Relatos de animais infectados por *T. evansi* no Rio Grande do Sul são recentes, em cães (COLPO et al., 2005, FRANCISCATO et al., 2007) e equinos (CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005), contudo o número de relatos vem crescendo em

diversas espécies (ZANETTE et al., 2008; DA SILVA et al., 2010). O surgimento destes e de outros casos sugere que maiores estudos sobre o agente e a doença, bem como diagnóstico devem ser aprofundados em áreas não endêmicas desta enfermidade.

Humanos sempre foram considerados refratários à infecção por *T. evansi*, até que em 2005 foi relatado o primeiro caso. Um homem de 45 anos, fazendeiro, da região central da Índia, apresentou febre intermitente associada a déficit sensitivo. Foram realizados esfregaços sanguíneos periféricos que demonstraram numerosos tripanossomatídeos em sua circulação (Figura 1). Análises sorológicas e moleculares confirmaram a infecção natural por *T. evansi*. O paciente apresentava picos intermitentes de parasitemia (atingindo 106 parasitos/ml) associados a episódios febris durante cinco meses (JOSHI et al., 2005). Após o relato, foi realizado sorologia de 1.806 moradores da mesma localidade na Índia e constataram que 22,7 % da população era soropositiva para *T. evansi* (SHEGOKAR et al., 2006).

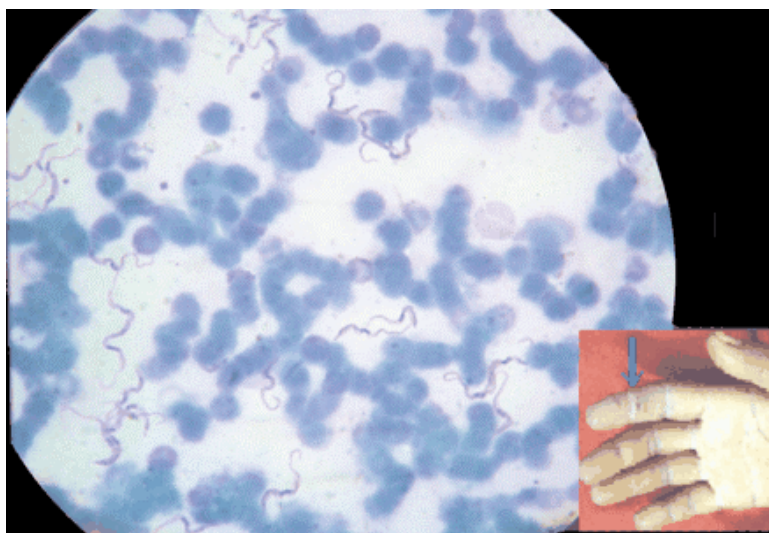


Figura 1 - Esfregaço sanguíneo periférico de um humano demonstrando a presença de *T. evansi*. Corado com Giemsa, aumento de 1000X. A seta indica o local da punção para a confecção do esfregaço. FONTE: Joshi et al., 2005.

A infecção por *T. evansi* em humanos não é comum, pois os mesmos possuem em seu plasma sanguíneo uma apolipoproteína ligada a lipoproteínas de alta densidade que é considerada um fator tripanolítico, chamado apolipoproteína L-1

(APOL1). A APOL1 entra no protozoário por endocitose e promove a formação de poros na membrana lisossomal, induzindo o rompimento destes compartimentos e morte celular (VANHAMME et al., 2003). Em contrapartida, já foi descrita uma proteína que confere resistência a APOL1, a proteína associada à resistência ao soro (SRA), expressa por um dos tripanossomos africanos causadores da doença do sono, o *T. brucei rhodesiense* (XONG et al., 1998). Isso torna o *T. evansi* susceptível ao plasma humano, ou seja, à APOL1 (HAWKING, 1978; OTTO et al., 2010). Uma análise molecular do gene da APOL1 do primeiro caso de infecção humana demonstrou uma rara mutação nos dois alelos, que levava a formação de dois “stop códons” no meio da fase aberta de leitura do gene, impedindo então a expressão da APOL1 funcional neste paciente, o que provavelmente foi determinante para o desenvolvimento da infecção (VANHOLLEBEKE et al., 2006).

A transmissão do *T. evansi* ocorre de maneira mecânica, por insetos sugadores de sangue, de um hospedeiro infectado para outro hospedeiro, especialmente por Tabanídeos (*Tabanus*, *Stomoxys*, *Atylotus* e *Lyperosia*). No entanto, os vetores podem variar em diferentes condições, por exemplo, mutucas e mosca-de-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) são considerados os vetores mais eficientes para a transmissão do parasita na China e na Indonésia (LUCKINS, 1988; LUN et al., 1993). Na África, a mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.), como outras moscas sugadoras de sangue, pode atuar como um vetor mecânico nas áreas onde ambos (*T. evansi* e estas moscas) ocorrem. Em geral, quanto menor o intervalo entre as duas alimentações, maiores são as possibilidades de transmissão bem sucedida, uma vez que os tripanossomas têm um tempo de sobrevivência limitado no aparelho bucal do vetor (LUCKINS, 1988). Na América do Sul e Central, o *T. evansi* também pode ser transmitido por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), que servem como vetores e hospedeiros reservatórios (HOARE, 1965; (SILVA-ITURRIZA et al., 2013). Nos hemisférios Oriental e Ocidental foi demonstrada a infecção de canídeos (lobos e raposas) pela ingestão de animais infectados (WOO, 1977), sendo que o parasita pode ficar viável no hospedeiro por mais de 14h pós morte (MANDAL et al., 2013).

Diferentes fases de desenvolvimento não são observadas nos vetores acima mencionados, pois o *T. evansi* não passa por nenhum ciclo de desenvolvimento, existindo apenas na forma tripomastigota. Acredita-se que ausência da fase procíclica e sua adaptação à diversos vetores deve-se à perda de genes do

maxicículo no DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasita que ocorreu durante o processo de evolução a partir do *T. brucei* (LAI et al., 2008) (Figura 2).

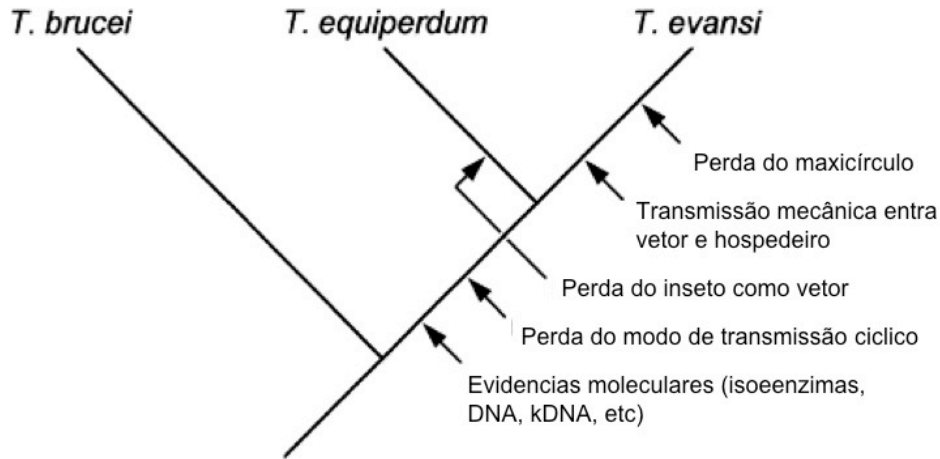


Figura 2 - Relação filogenética postulada entre três espécies intimamente relacionadas. Fonte: Adaptado de Brun 1998

A hipótese que o *T. evansi* surgiu a partir do *T. brucei* o qual possui dois estágios: no vetor, moscas tsé-tsé do gênero *Glossina*, apresenta-se na forma procíclica, a qual tem a capacidade de sobreviver no inseto e realizar recombinação do kDNA; nos hospedeiros mamíferos possui uma morfologia mais alongada, que causa a doença, chamada de forma tripomastigota (BESTEIRO et al., 2005). Acredita-se que tenha ocorrido uma mutação do *T. brucei* que causou a perda da heterogeneidade e problemas na replicação com perda do kDNA, o que tornou inviável a sobrevivência do parasito nas moscas tsé-tsé. Desta forma, a ausência de cinetoplasto bloqueou a forma procíclica, mantendo os tripanossomatídeos exclusivamente na forma tripomastigota, única encontrada no *T. evansi* (JENSEN et al., 2008; LUN et al., 2010). Essa ausência do cinetoplasto conferiu ao *T. evansi* a perda da dependência do vetor tsé-tsé para completar seu ciclo, e visto que as moscas do gênero *Glossina* possuem uma distribuição limitada a certas regiões da África, este protozoário pode avançar para outras regiões através da transmissão exclusivamente mecânica (LUN e DESSER, 1995), sendo considerado atualmente o tripanossoma patogênico com maior distribuição mundial. O *Trypanosoma equiperdum* originou-se deste mesmo processo de perda do cinetoplasto do *T. brucei* (JENSEN et al., 2008; LUN et al., 2010).

O *T. evansi* é geralmente monomórfico, tendo um pequeno cinetoplasto subterminal. Entretanto, existem formas acinetoplásticas em que o DNA cinetoplástico circular é ausente. Estes exemplares são encontradas em cepas silvestres como resultados de mutação ou após tratamento com tripanocidas (aceturato de diminazeno). Formas acinetoplásticas também são reportadas após longo tempo em cultura *in vitro* e criopreservação (ZWEYGARTH et al., 1990). As cepas brasileiras são comprovadamente acinetoplásticas (VENTURA et al., 2000). As formas encontradas na corrente sanguínea são basicamente lancetadas e o corpo é alongado e achatado. Um flagelo livre está sempre presente. Há uma membrana ondulante bem desenvolvida e a extremidade posterior pode ser arredondada ou afilada (Figura 3). Seu tamanho varia de 15 a 33 μm , com média de 24 μm (HOARE, 1972).

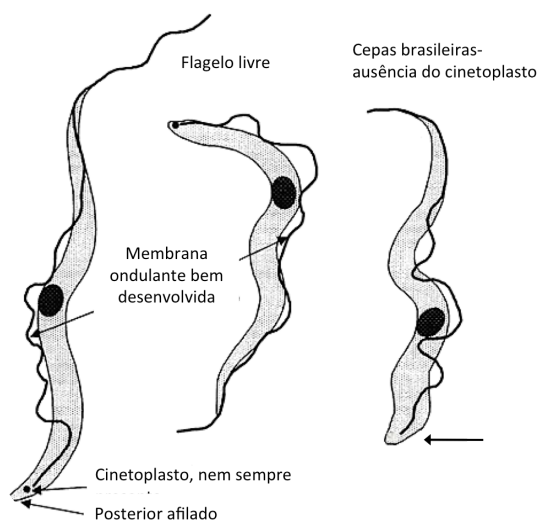


Figura 3 – Esquema representativo do *Trypanosoma evansi*.
 Fonte: <http://www.fao.org/docrep/006/X0413E/X0413E02.htm>

Apesar do amplo conhecimento sobre a etiologia da doença causada pelo *T. evansi*, há poucos estudos detalhados sobre o metabolismo intracelular do parasita. Portillo et al. (2011), demonstraram a presença do receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) e Mijares et al. (2011) localizaram a presença da acetilcolinesterase (AChE) nos glicossomos de *T. evansi*. Com a presença do receptor, alterações metabólicas podem ocorrer no parasita após estimulação colinérgica. A acetilcolina (ACh) também tem sido detectada em muitos organismos unicelulares (incluindo protozoários ciliados). A onipresença da via colinérgica no reino animal poderia ser

parte de um mecanismo para acessar Ca^{+2} intracelular através da ativação da fosfolipase C, aumentando a concentração de Ca^{+2} (KIMURA et al., 2003; PORTILLO et al., 2011) sendo, a regulação da concentração de cálcio essencial para a vida destes parasitos (DOCAMPO e MORENO, 1996).

Além disso, foi detectada a presença da cisteína proteinase em *T. evansi* (YADAV et al., 2011), uma das proteinases liberadas por tripanossomas vivos e mortos que acarretam imunossupressão no hospedeiro infectado, contribuindo imensamente na patogênese da doença. Outro aspecto interessante sobre o *T. evansi* é sua capacidade de mudar periodicamente sua glicoproteína variante de superfície (VSG), o que acarreta recidivas de parasitemias. Conforme os anticorpos são produzidos, há eliminação do clone corrente, mas sucessivos novos padrões de antígenos de superfície são gerados para evadir a resposta do hospedeiro (Figura 4) (HERRERA et al., 2004; JIA et al., 2011; MANNA et al., 2013). Essa capacidade do tripanossoma de evadir o mecanismo de defesa imunológica do hospedeiro é uma das questões mais importantes e intrigantes nos estudos de interações parasita-hospedeiro (ZAMBRANO-VILLA et al., 2002).

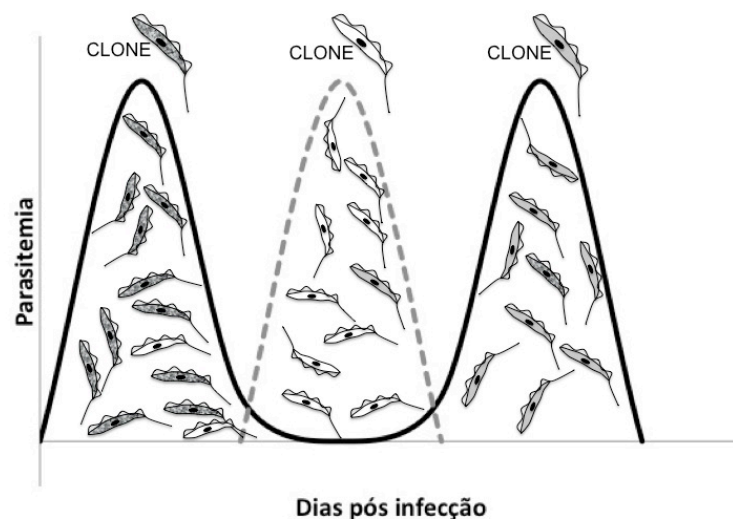


Figura 4 - Variação antigênica do tripanossomas criando recidivas da parasitemia. FONTE: Desenvolvida pelo autor(a).

Os tripanossomas presentes nos vasos sanguíneos de hospedeiros vertebrados estão na forma tripomastigota e são disseminados de maneira passiva por vetores (insetos hematófagos), durante o repasto sanguíneo (SUMBA et al., 1998). No hospedeiro, os tripanossomas multiplicam-se no local da picada por fissão binária longitudinal (BRUN et al., 1998) e invadem a corrente sanguínea e o sistema linfático, causando febre recorrente e induzindo uma resposta inflamatória (Figura 5) (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). O aumento gradual da parasitemia está diretamente associado com respostas febris, que são seguidas por períodos aparasitêmicos e afebris, podendo durar de um dia a uma semana, e podem ser separados por intervalos de vários dias a um mês através da infecção (MAUDLIN et al, 2004).

A patogenicidade dos tripanossomas no hospedeiro varia de acordo com a espécie animal e cepa do tripanossoma, fatores inespecíficos afetando o animal como outras infecções e estresse, e condições epizootiológicas locais (QUEIROZ et al., 2000; QUEIROZ et al., 2001). Isto reflete nos períodos recorrentes de febre e de parasitemia que podem ocorrer durante o curso da doença. A infecção também pode levar a perda da condição física do animal e agravamento dos sinais clínicos.

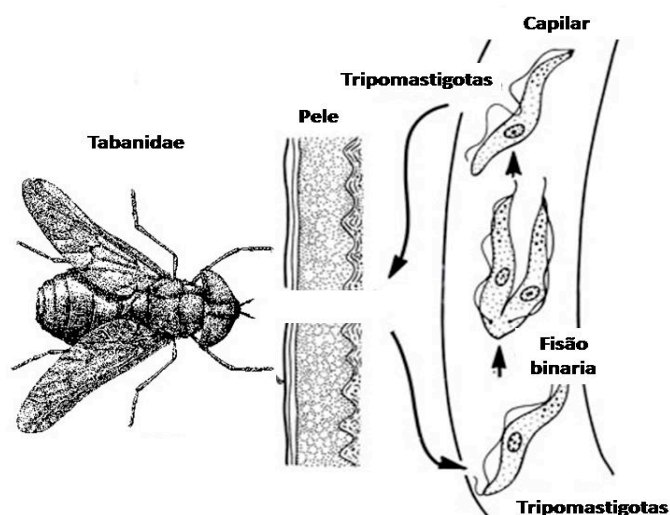


Figura 5 – Transmissão e multiplicação (fissão binária) do *T. evansi* (Modificado de GARDINER et al., 1988).

Outro sinal clínico importante é a anemia progressiva que ocorre por hemólise extravascular desencadeada pela resposta imune contra o parasita (OMER et al, 2007, MAUDLIN et al, 2004;. JATKAR e PUROHIT, 1971), que resulta em uma reação auto-imune contra os eritrócitos (RICKMAN e COX, 1983). Outro mecanismo importante na produção de anemia é atribuído à atividade dos tripanossomas circulantes, através da produção de neuraminidase, que resulta na clivagem do ácido siálico na superfície do eritrócito, tornando-os mais propensos à fagocitose pelo sistema retículo endotelial (SHEHU et al., 2006).

A produção de radicais livres também está estreitamente envolvida na patogênese do *T. evansi*. Em estudo realizado por Wolkmer et al. (2009), em que ratos foram experimentalmente infectados pelo flagelado, concluiu-se que os danos oxidativos causados na membrana dos eritrócitos podem ser uma das causas de anemia na fase aguda da doença. Além disso, diversos estudos demonstraram uma redução nos níveis séricos de ferro, o que contribui no desenvolvimento da anemia e conseqüentemente influencia na resposta imune do hospedeiro (DA SILVA et al., 2009b; TAYLOR e KELLY, 2010; WOLKMER et al., 2012c; DA SILVA et al., 2013).

Apesar de ser considerado um hemoparasita, *T. evansi* também pode ser encontrado nos líquidos intra e extravasculares (SUDARTO et al., 1990) além de sua presença no sistema nervoso central (SNC). Rodrigues et al., (2009) descreveu a presença de parasitos no parênquima cerebral de equinos naturalmente infectados através de imunohistoquímica, o que pode estar associado as lesões de leucoencéfalomalácia assimétrica, encefalite necrotizante, edema, desmielinização e meningite na medula espinhal dos animais analisados. O modo como o protozoário invadiu o parênquima cerebral não está elucidado, mas provavelmente a presença dele neste local está associada as lesões descritas e aos sinais clínicos neurológicos característicos da doença. A hipótese da presença do parasito no SNC ser um dos fatores desencadeantes dos sinais clínicos neurológicos é sugerida também por Berlin et al. (2009), que relataram a presença de DNA de *T. evansi* no cerebelo, cérebro e medula espinhal de equinos naturalmente infectados. Porém, as lesões no SNC nem sempre estão presentes (DA SILVA et al., 2012a).

Diversos relatos demonstram que animais infectados por *T. evansi* podem apresentar distúrbios neurológicos. Os sinais clínicos comumente descritos são incoordenação, paralisia dos membros posteriores, ataxia, hiperexcitabilidade, andar em círculos e déficit proprioceptivo (TUNTASUVAN et al., 1997; TUNTASUVAN et

al., 2000; BERLIN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009). Além disso, o primeiro relato da infecção por *T. evansi* em humanos descreveu sinais de déficit sensorial, desorientação, agitação e agressão (JOSHI et al., 2005). Ainda não se conhece os mecanismos exatos que levam ao aparecimento dos sinais clínicos de distúrbios neurológicos e motores na tripanossomíase. Porém, em recentes estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, pode se demonstrar que em ratos infectados ocorrem alterações nas concentrações de neurotransmissores (ATP e ADP) e neuromoduladores (adenosina) (DA SILVA et al., 2011a; DA SILVA et al., 2012b). Desta forma a infecção pelo parasita poderia estar interferindo na neurotransmissão, que é um processo dinâmico, sustentado por um ciclo permanente de liberação de neurotransmissores, havendo a liberação de mais de um neurotransmissor em resposta à estimulação. Desta forma, diversos neuromoduladores parecem estar envolvidos na patogenia da tripanossomíase, sendo importante descrever alguns destes sistemas.

Um importante passo para que ocorra a excitabilidade neuronal é a atividade das enzimas $\text{Ca}^{+2}\text{ATPase}$ e $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}\text{ATPase}$, que estão incorporadas à membrana da célula, as quais geram o potencial de membrana através do transporte ativo de íons sódio ou cálcio e potássio no SNC (ERECINSKA e SILVER, 1994). O aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} *in vivo*, é responsável pela liberação de neurotransmissores, desencadeando o processo de transmissão sináptica (GANDHI e ROSS, 1988). A $\text{Na}^{+},\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ exporta íons Na^{+} da célula e importa íons K^{+} , desse modo, permitindo a geração e a manutenção da alta concentração de Na^{+} extracelular e alta concentração de K^{+} intracelular. A manutenção desses gradientes iônicos é fundamental para diversas funções celulares, incluindo a regulação do potencial de repouso e excitabilidade celular (MICHEL et al., 2007; ILLARIONOVA et al., 2010). Esta enzima está presente em praticamente todas as células, incluindo a musculatura esquelética e cardíaca e em alta concentração nas membranas celulares do cérebro (APERIA, 2007), e sua atividade é crucial para o desenvolvimento e função cerebral. A inativação da $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}\text{ATPase}$ leva a uma despolarização parcial da membrana, seguida de uma entrada excessiva de Ca^{+2} nas células neuronais alterando a liberação de neurotransmissores, o que pode resultar em eventos tóxicos, tais como a excitotoxicidade, gerada pelo aumento de glutamato na fenda sináptica, e o prejuízo da memória (HARTMANN et al., 1994).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos e está intimamente relacionado com os processos de aprendizagem e memória, além de outros eventos que envolvem plasticidade neuronal (OZAWA et al., 1998; SEGOVIA et al., 2001; IZQUIERDO et al., 2006), como a resposta cerebral à estímulos externos (SCHMIDT et al., 2008). Além disso, tem uma participação importante no metabolismo geral do corpo humano, pois este neurotransmissor participa de processos bioquímicos de oxidação para geração de energia, síntese de proteínas e formação de diferentes compostos (COYLE e PUTTFARCKEN, 1993). No SNC, particularmente, atua como principal neurotransmissor excitatório, sendo o mediador químico de cerca de 80 a 90% das sinapses excitatórias cerebrais (MCKENNA, 2007). Conseqüentemente, um desequilíbrio na via glutamatérgica é um fator importante na gênese de muitas desordens neurológicas.

O glutamato pode ser sintetizado a partir da glutamina ou do α -cetoglutarato por transaminação (SCHOUSBOE e WAAGEPETERSEN, 2005). O destino do glutamato nas células depende da condição metabólica, podendo seguir para o metabolismo oxidativo através do ciclo do ácido cítrico (TCA) e gerar ATP, ou ser transformado em glutamina. Em situações onde a concentração extracelular de glutamato for menor que 0,2 mM, grande parte do glutamato astrocitário será convertido à glutamina; em concentrações acima de 0,2 mM, a preferência é que o glutamato siga pela via do TCA. A síntese deste neurotransmissor ocorre nos terminais pré-sinápticos e transportada para os terminais nervosos, onde então é convertida em glutamato pela ação da enzima glutaminase (Figura 6). O ciclo glutamato-glutamina entre astrócitos e neurônios tem sido proposto como a maior via de reciclagem do glutamato, que ao ser captado é primeiramente convertido à glutamina, pela ação da glutamina sintetase, que é posteriormente transportada ao neurônio e convertida a glutamato pela ação da glutaminase (DANBOLT, 2001; AMARA e FONTANA, 2002). Uma vez no neurônio, o glutamato é estocado em vesículas, sendo o processo de captação vesicular independente de Na^+ , e sua incorporação é possível devido a um potencial interno de membrana positivo que é gerado por uma H^+ -ATPase vacuolar, a qual media o transporte de H^+ para dentro da vesícula (TABB et al., 1992). O glutamato ainda pode ser obtido a partir do α -cetoglutarato nas reações de transaminação e na aminação redutora do ciclo de Krebs, pela ação da enzima glutamato desidrogenase (MCKENNA, 2007).

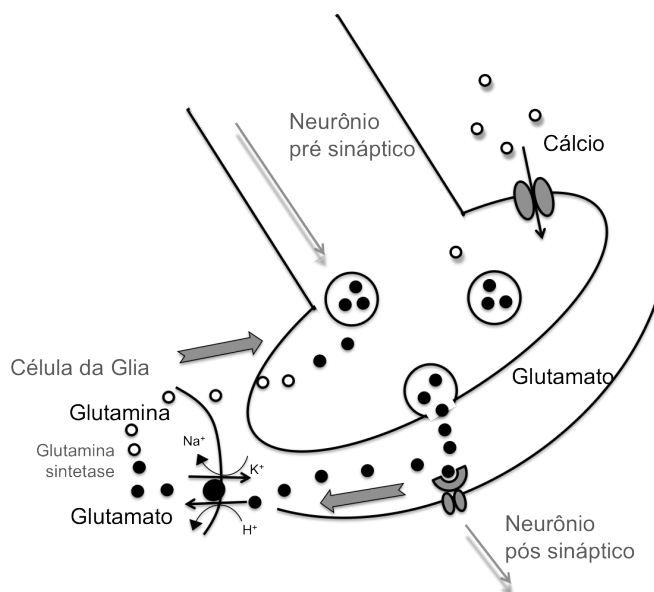


Figura 6 – Esquema representativo da síntese, liberação e captação do glutamato e excitabilidade neuronal. FONTE: Desenvolvida pelo autor(a).

A liberação do glutamato das vesículas dos terminais pré-sinápticos ocorre por exocitose e é Ca^{+2} -dependente, ou seja, quando ocorre despolarização do terminal pré-sináptico, há abertura de canais de cálcio e a entrada desse íon estimula sua liberação vesicular (NICHOLLS e ATTWELL, 1990) e/ou também do “pool” citosólico (NEDERGAARD et al., 2002). O glutamato também pode ser liberado pelos astrócitos através de canais dependentes de cálcio em resposta a um aumento de seus níveis intracelulares mediado por receptores (PASTI et al., 2001), através de canais de ânions orgânicos volume-sensitivos (EGGERMONT et al., 2001) e através de uma reversão no transporte de glutamato (WARR et al., 1999). Uma vez liberado, o glutamato exerce suas funções em seus receptores, presentes nas membranas dos terminais pré e pós-sinápticos e também na membrana das células gliais (OZAWA et al., 1998; NEDERGAARD et al., 2002).

O término de sua ação ocorre através de sua rápida remoção por um processo de captação, visto que não existe nenhum mecanismo enzimático capaz de degradá-lo na fenda (DANBOLT, 2001). Essa remoção é realizada principalmente pelas células astrocitárias através de um sistema de alta afinidade dependente de sódio (ANDERSON e SWANSON, 2000; ATTWELL, 2000; CHEN e SWANSON,

2003). O glutamato é recaptado pelos neurônios e é, em grande parte, transportado para vesículas sinápticas (VAN DEN BERG e GARFINKEL, 1971; DAIKHIN e YUDKOFF, 2000). Em astrócitos, o glutamato, após ser absorvido do meio extracelular, é convertido em glutamina que é então liberada no meio extracelular e reconvertida em glutamato dentro dos neurônios conforme via já descrita (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 1977; LAAKE et al., 1995; OTTERSEN et al., 1998).

A ação do glutamato é realizada através da ativação de seus receptores ionotrópicos e metabotrópicos, os quais geralmente coexistem em uma única sinapse. Essa classificação é baseada em suas características farmacológicas e moleculares (MONAGHAN et al., 1989; WATKINS et al., 1990; YOUNG e FAGG, 1990; OZAWA et al., 1998). Os receptores ionotrópicos (iGluR) são assim denominados, pois são canais que permitem a passagem de um cátion específico quando ativados por um agonista (OZAWA et al., 1998), sendo subdivididos em N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) e ácido caínico (KA), de acordo com a sensibilidade à estes agonistas. Os receptores metabotrópicos (mGluR) pertencem a uma família de receptores que estão acoplados às proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G), promovendo então a modulação de efetores intracelulares que por sua vez ativam e/ou inibem diversos eventos de transdução de sinais (OZAWA et al., 1998).

O glutamato, como mediador de sinapses excitatórias, tem papel fundamental em funções essenciais do SNC; no entanto, um aumento nas concentrações de glutamato na fenda sináptica pode levar à estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos e consequente morte neuronal (excitotoxicidade) (PRICE, 1999; SINGH et al., 2003; FORDER e TYMIANSKI, 2009). A neurotoxicidade do glutamato está intimamente ligada a um aumento de Ca^{+2} intracelular causada pela estimulação excessiva de seus receptores iGluR e mGluR e à subsequente perda da homeostase intracelular do Ca^{+2} . Sendo o receptor NMDA altamente permeável ao Ca^{+2} , sua hiperestimulação tem sido considerada como a principal responsável pela morte celular devido à excitotoxicidade do glutamato (OZAWA et al., 1998; MELDRUM, 2000). Desordens neurológicas nas quais os mecanismos de excitotoxicidade através da estimulação dos receptores glutamatérgicos podem estar envolvidos incluem a isquemia, a hipoglicemia, a hiperglicemia, o trauma, a epilepsia e as doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e Huntington (CHOI,

1988; DANBOLT, 2001; MARAGAKIS e ROTHSTEIN, 2001).

Além do sistema glutamatérgico, outro sistema importante que pode estar envolvido na neuropatologia da infecção por *T. evansi* é o sistema colinérgico. A importância da neurotransmissão colinérgica tem sido significativamente evidenciada, visto sua relação com algumas doenças do SNC (RAKONCZAY, 2003; KIHARA e SHIMOHAMA, 2004; TOMASSINI et al., 2012; WATANABE et al., 2013). As alterações neuropsiquiátricas que envolvem disfunções desse sistema podem ser observadas em quadros patológicos de considerável incidência, como na doença de Alzheimer (FRANCIS et al., 1999; TERRY e BUCCAFUSCO, 2003; WATANABE et al., 2013). Visto que, a infecção pelo *T. evansi* pode levar a distúrbios neurológicos, acredita-se que alterações na neurotransmissão colinérgica possam ter um papel fundamental nos sinais clínicos desenvolvidos pelos animais infectados pelo parasita.

Neste contexto, a acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor das sinapses e junções neuro efetoras colinérgicas tanto no SNC quanto no periférico, possuindo um papel crucial na neurotransmissão. A ACh é sintetizada no citosol do neurônio a partir da acetil coenzima-A e da colina. A acetil coenzima-A tem origem mitocondrial, ao passo que a colina provém da fenda sináptica, extracelular. A colina atravessa a membrana do terminal axônico por um mecanismo de transporte ativo específico (WOOLF, 1991). A combinação da acetil-CoA à colina é catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT). Depois de sintetizada, a ACh é armazenada nas vesículas sinápticas, até que haja um estímulo que as libere (Figura 7) (FINKELSTEIN et al., 2007; ABREU-VILLACA et al., 2011).

O impulso nervoso, ou potencial de ação, ao chegar ao botão sináptico onde estão as vesículas sinápticas, ocasiona uma despolarização da membrana pré-sináptica, aumentando a condutância do cálcio, o que favorece a entrada deste no axônio. A liberação da ACh varia diretamente com a concentração de cálcio. Posteriormente ocorre o “rompimento das vesículas” e o extravasamento do neurotransmissor na fenda sináptica, ocorrendo a fusão com a membrana. A ACh liberada pode difundir-se no espaço extracelular, ser degradada a colina e ácido acético pela AChE, ou ainda, combinar-se com receptores colinérgicos pós e pré-sinápticos (ROSENBERRY, 1975; PRADO et al., 2002; ABREU-VILLACA et al., 2011)

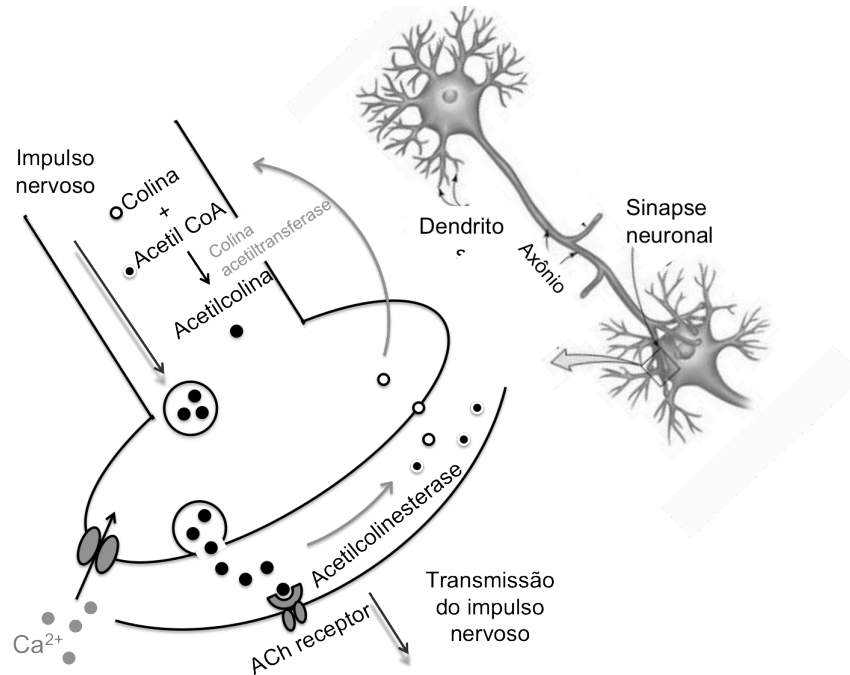


Figura 7 - Esquema representativo da síntese, liberação e hidrólise da ACh. FONTE: Desenvolvida pelo autor(a).

O impulso nervoso, ou potencial de ação, ao chegar ao botão sináptico onde estão as vesículas sinápticas, ocasiona uma despolarização da membrana pré-sináptica, aumentando a condutância do cálcio, o que favorece a entrada deste no axônio. A liberação da ACh varia diretamente com a concentração de cálcio. Posteriormente ocorre o “rompimento das vesículas” e o extravasamento do neurotransmissor na fenda sináptica, ocorrendo a fusão com a membrana. A ACh liberada pode difundir-se no espaço extracelular, ser degradada a colina e ácido acético pela AChE ou ainda combinar-se com receptores colinérgicos pós e pré-sinápticos (ROSENBERRY, 1975; PRADO et al., 2002; ABREU-VILLACA et al., 2011).

Os receptores colinérgicos (AChR) são classificados em nicotínicos (nAChR) e muscarínicos (mAChR), os quais transmitem os sinais por mecanismos diferentes. Os AChR cerebrais atuam em nível pré-sináptico. Porém os nAChR estão distribuídos de modo mais esparsos facilitando a liberação de outros neurotransmissores como a dopamina (RANG et al., 2004). Os nAChR são formados por diversas subunidades α e β ($\alpha 2 - \alpha 10$, $\beta 2 - \beta 4$). As diferentes associações destas

subunidades conferem propriedades estruturais e funcionais distintas aos diferentes subtipos de receptores (DAJAS-BAILADOR & WONNACOTT, 2004).

Logo após exercer sua ação a ACh sofre hidrólise pelas colinesterases, liberando ácido acético e colina (Figura 8). Nessa hidrólise, que ocorre na fenda sináptica, cerca de 50% da colina produzida é recaptada pelo axônio terminal, e, posteriormente, é reutilizada para a biossíntese de ACh (ABREU-VILLACA et al., 2011).

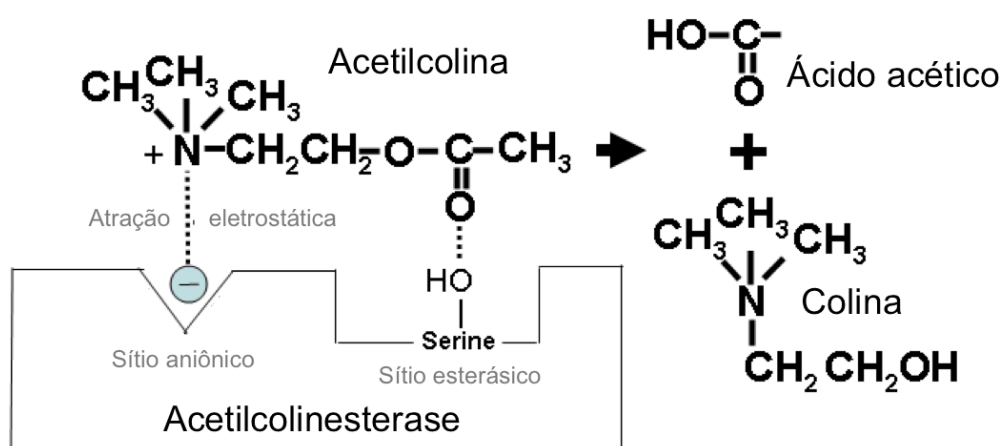


Figura 8 – Hidrólise da acetilcolina no sítio ativo da acetilcolinesterase.
Fonte: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=5>

As enzimas do sistema colinérgico desempenham papel importante na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de outras funções, como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos (MASSOULIE et al., 1993b). A AChE hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil e a butirilcolinesterase (BChE) (pseudo colinesterase – uma enzima menos específica) hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas as colinesterases são amplamente distribuídas no organismo (REID et al., 2013).

A BChE transportada pelo sangue não foi totalmente elucidada. Ela é produzida no fígado e acredita-se que ela possa participar na maturação e/ou degradação de neuropeptídios e xenobióticos, já que têm sido demonstradas outras atividades catalíticas além da atividade esterásica (MASSOULIE et al., 1993b). A atividade da colinesterase no plasma humano é representada principalmente pela

atividade da BChE, enquanto o plasma de ratos contém aproximadamente iguais quantidades das duas enzimas, AChE e BChE (TRAINA e SERPIETRI, 1984). A sua importância é evidenciada pelo estudo com camundongos *knockout* para AChE, no qual foi demonstrado que estes ratos chegavam à idade adulta. Isto indica que a BChE é capaz de compensar a falta de AChE, o que permite a regulação contínua da neurotransmissão colinérgica (MESULAM et al., 2002).

Já a AChE possui um papel regulatório central na neurotransmissão colinérgica, é a enzima responsável pela hidrólise da ACh (ABREU-VILLACA et al., 2011) (Figura 8). A hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor nicotínico da membrana pós-sináptica permitindo a abertura de canais de íons Na^+ , e a consequente despolarização da membrana, o que irá proporcionar um potencial de ação, propagando o impulso. Desta forma, AChE atua prevenindo contínuas passagens de impulsos, o que é vital para um bom funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular. Na transmissão sináptica colinérgica é essencial que a ACh seja degradada rapidamente antes da chegada de um novo impulso elétrico, sendo tal reação mediada pela AChE. Este processo evita a propagação contínua do impulso nervoso, que pode acarretar efeitos comportamentais como hiperatividade, asfixia e morte (ROSENBERRY, 1975; MASSOULIE et al., 1993b; ABREU-VILLACA et al., 2011; REID et al., 2013). Esta enzima é encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular (MASSOULIE et al., 1993b). A AChE, além de amplamente distribuída no SNC, também é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (KAWASHIMA e FUJII, 2004; RAKONCZAY et al., 2005)

A maioria das formas moleculares de AChE são estruturas complexas, que incluem subunidades estruturais, garantindo a fixação da enzima na membrana plasmática ou na matriz extracelular. Esta imobilização justaposta no local onde suas ações são necessárias, como sinapses e placas motoras, também contribui para a eficácia na eliminação dos estímulos, garantindo o fluxo de informação ou o relaxamento muscular (MASSOULIE e BON, 1982; MASSOULIE et al., 1993a; MASSOULIE et al., 1993b). As formas moleculares das colinesterases são semelhantes em suas propriedades catalíticas, mas diferem nos parâmetros hidrodinâmicos e nas suas interações iônicas ou hidrofóbicas. Formas assimétricas

(A) e globulares (G) das colinesterases são distinguidas pela análise das suas estruturas quaternárias (Figura 9).

Formas assimétricas de AChE e BChE existem em todas as classes de vertebrados e, aparentemente, não estão presentes em invertebrados. Essas formas assimétricas interagem com poliânions, como glicosaminoglicanas, amplamente distribuídas na matriz extracelular. Logo, essas interações são responsáveis pela fixação dessas enzimas nas lâminas basais neuromusculares. As formas globulares do tipo G, contudo, são mais distribuídas nos diversos tecidos onde são encontradas colinesterases e estão presentes em vertebrados e invertebrados. Podem se apresentar solúveis, ancoradas à membrana por peptídeos hidrofóbicos (subunidade P), ou ligadas covalentemente à resíduos de fosfatidilinositol. A forma G4, ancorada à membrana pela subunidade P, é predominante nas sinapses do sistema nervoso, em especial no cérebro.

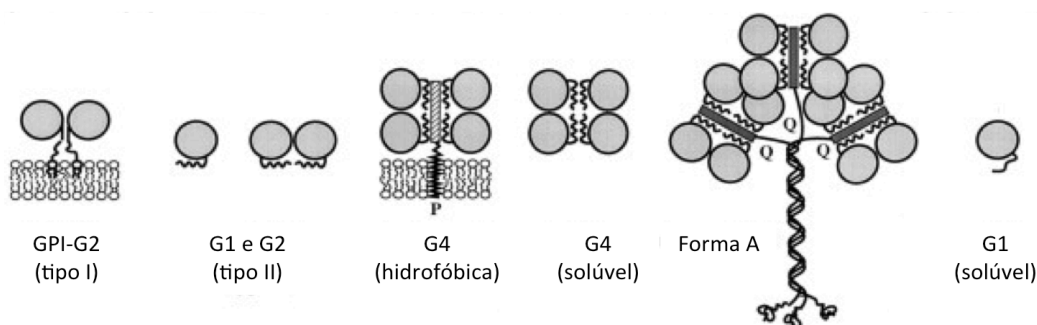


Figura 9 - Representação esquemática das formas moleculares de acetilcolinesterase.

Fonte: adaptado de Massoulié et al., (1993)

A AChE é uma glicoproteína globular encontrada nas sinapses colinérgicas, nas junções musculares, e em células sanguíneas como eritrócitos, linfócitos e plaquetas. Sua forma estrutural divide-se em globular ou assimétrica. A forma globular é composta por monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4) da subunidade catalítica (MASSOULIE et al., 1993b; RAKONCZAY et al., 2005). A unidade G1 está ligada ao citosol, enquanto que G4 à membrana da célula. O tipo G4 é o mais observado no sistema nervoso e muscular (XIE et al., 2000). No sangue, predominam as formas G2 (glóbulos vermelhos, linfócitos e plaquetas)

(Figura 10) e G4 (plasma) (MASSOULIE et al., 1993b; RAKONCZAY et al., 2005). As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, provavelmente para a exportação, ou se apresentam associadas à membrana celular externa através de uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou de um glicofosfolípídio acoplado (TAYLOR & BROWN, 1999).

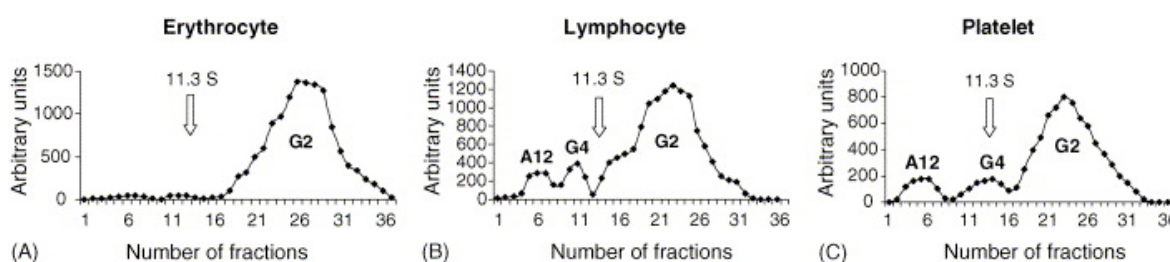


Figura 10 – Frações moleculares da acetilcolinesterase nas células sanguíneas. (A) eritrócito; (B) linfócito e (C) plaqueta. Adaptado de Rakonczay et al., (2005).

A atividade da AChE é controlada pela interação da ACh com seus receptores, sendo que quando a interação é acentuada, aumentam os níveis de AChE. No entanto, a AChE pode ser usada como um marcador da função colinérgica, e mudanças na atividade desta enzima podem indicar alterações na disponibilidade de ACh e do nível de seus receptores (FERNANDES & HODGES-SAVOLA, 1992). A AChE tem sido estudada em diversas patologias (RAKONCZAY et al., 2005; DAS, 2007; DA SILVA et al., 2010b; DA SILVA et al., 2011g) principalmente porque quando a atividade desta enzima é inibida de alguma forma há bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, paralisando as funções vitais devido à sobreposição dos impulsos nervosos, causados pela permanência dos canais de Na^+ abertos (ROSENBERRY, 1975).

Modificações neuroquímicas primárias no sistema colinérgico podem levar a alterações de memória, aprendizagem, atenção e outros processos cognitivos comuns (BLOKLAND, 1995). Além disso, uma estratégia importante de diversos parasitas para aumentar a sua chance de transmissão é através da indução de mudanças de comportamento no hospedeiro infectado que pode afetar positivamente a probabilidade de transmissão a um hospedeiro subsequente

(FLEGR et al., 1996; KAUSHIK et al., 2012; WEBSTER et al., 2012). Os mecanismos precisos pelos quais parasitas alteram o comportamento de acolhimento, particularmente aqueles envolvendo as mudanças mais sutis cognitivas ou sensoriais, vem sendo estudados. Porém, devem envolver interações complexas entre os sistemas endócrino e imunitário, e em combinação com o complemento do cérebro de mamíferos e do SNC (KAUSHIK et al., 2012). Essas alterações são avaliadas pelo desempenho dos animais em vários testes comportamentais que podem ser identificadas, por exemplo, pela coordenação motora, pelo estado de ansiedade e memória dos animais, que são as manifestações finais das funções neurais (GENN et al., 2003; LALONDE et al., 2004).

Por muitos anos têm sido desenvolvido diferentes métodos que permitem quantificar a atividade locomotora. O teste de campo aberto (*open Field*) permite quantificar parâmetros padrão de movimentação relacionados com a frequência de amostragem, a resolução espacial, a distância do deslocamento, o tempo de permanência em cada região do campo e a velocidade do movimento. O labirinto em cruz elevado (LCE ou *pluz maze*) faz parte do rol de testes indicados na avaliação do comportamento de ratos, sendo um procedimento simples e rápido baseado no comportamento espontâneo do animal. O LCE se baseia na avaliação dos animais em explorar ambientes desconhecidos e evitar situações potencialmente perigosas, sendo um dos testes mais empregados no estudo da ansiedade (BOURIN et al., 2007). Já o teste de esquiva inibitória é um teste clássico de comportamento aversivo e é utilizado para avaliar a aprendizagem e memória em ratos (CAHILL et al., 1986).

É importante retomar que no sistema colinérgico, a enzima circulante pode ter papel não-catalítico como sugerido pelas variantes estruturais da AChE que estão amplamente distribuídas pelos tecidos. Tem-se correlacionado sua participação no crescimento e adesão celular (DARBOUX et al., 1996), neurogênese, sinaptogênese (LAYER, 1991; LAYER et al., 1993; LAYER e WILLBOLD, 1994) e hematopoiese (LEV-LEHMAN et al., 1994). A AChE está presente na membrana dos eritrócitos, onde apesar de possuir uma alta atividade, não possui funções enzimáticas. Acredita-se que AChE eritrocitária possui as mesmas propriedades da enzima presente no encéfalo (AL-JAFARI et al., 1995). No entanto, seu exato papel biológico é ainda desconhecido (KAMAL et al., 1999). Uma das funções não enzimática da AChE sanguínea parece estar relacionada com a diferenciação das

células hematopoiéticas (LEV-LEHMAN et al., 1994; SOREQ et al., 1994). Além disso, estudos indicam que esta enzima é um bom marcador de integridade e estado funcional da membrana (RAKONCZAY et al., 2005). Em relação aos linfócitos, sabe-se que estas células possuem todos os componentes necessários para constituir um sistema colinérgico extraneuronal independente envolvido na regulação da função imune (KAWASHIMA e FUJII, 2000).

Uma nova propriedade foi identificada para a AChE e BChE: a atuação dessas enzimas como marcadores inflamatórios (DAS et al., 2005a). A via colinérgica anti-inflamatória é um mecanismo fisiológico que modula as respostas inflamatórias do hospedeiro através de estimulação do nervo vago (BOROVIKOVA et al., 2000; TRACEY, 2002; PAVLOV et al., 2003; CZURA e TRACEY, 2005; PAVLOV e TRACEY, 2005; 2006; TRACEY, 2007; 2009). Esta via é chamada de colinérgica porque a ACh é o principal neurotransmissor, sendo considerado uma molécula anti-inflamatória, pois macrófagos expostos a esse neurotransmissor são eficientemente inibidos em secretar fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina (IL) -1 β , proteína do tipo *high mobility group box 1* (HMGB1) e uma série de outros mediadores inflamatórios (Figura 11) (TRACEY, 2002; 2009).

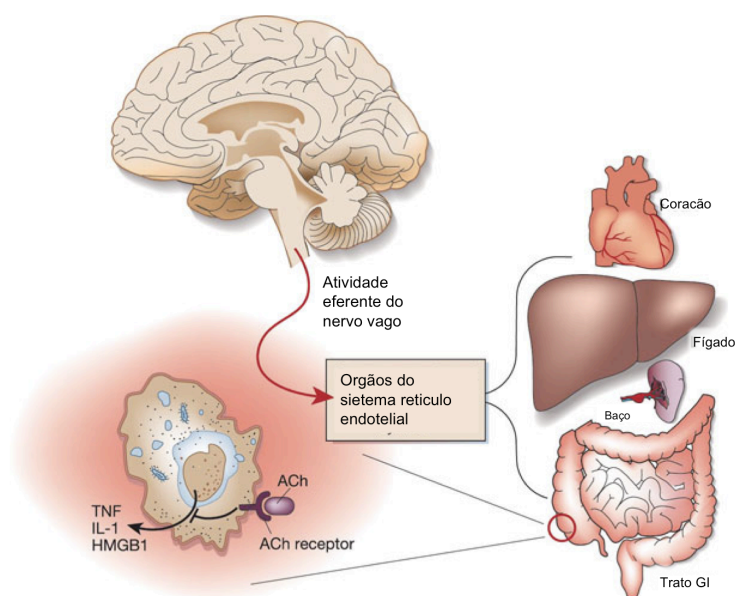


Figura 11: Atividade eferente do nervo vago leva a liberação de acetilcolina (ACh). Isso ocorre nos órgãos do sistema reticuloendotelial, incluindo o fígado, coração, baço e gastrointestinal. Acetilcolina interage com receptores nicotínicos de ACh em macrófagos de tecidos, que inibem a liberação de TNF, IL-1, HMGB1 e outras citocinas (Tracey, 2002).

O nervo vago inerva os principais órgãos do corpo, incluindo os que fazem parte do sistema retículo-endotelial: fígado, pulmões, baço, rins e intestino (TRACEY, 2002; CZURA e TRACEY, 2005; TRACEY, 2009). Fibras aferentes sensoriais vagais são capazes de detectar o processo inflamatório através de suas projeções axonais no sítio da inflamação, transmitindo esse sinal para estruturas cerebrais envolvidas na geração do controle neural da inflamação. As fibras aferentes vagais chegam ao principal local de terminação, o núcleo do trato solitário (NTS) medular, que recebe principalmente sinais de inflamação local. Os neurônios do NTS se projetam para neurônios vagais pré-ganglionares no núcleo motor dorsal do nervo vago (DMN) e núcleo ambíguo (NA), que se comunicam com a área postrema (AP), a qual não possui barreira hemato-encefálica (BHE) (PAVLOV et al., 2003; PAVLOV e TRACEY, 2005; 2006). Projeções bi-direcionais também ocorrem entre o NTS, o hipotálamo e outras estruturas anteriores do cérebro dentro da rede central autônoma. A AP e outros órgãos circunventriculares funcionam como portais para citocinas circulantes sinalizarem para o cérebro a presença de inflamação periférica (PAVLOV e TRACEY, 2005).

Os sinais aferentes transmitidos pelo nervo vago ativam o reflexo inflamatório resultando em uma estimulação eferente. A ACh liberada pelas terminações sinápticas vagais dentro do sistema retículo-endotelial é capaz de interagir especificamente com as subunidade alfa 7 do receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR α 7) de macrófagos e linfócitos, que se localizam nas proximidades. A interação da acetilcolina com nAChR α 7 de macrófagos ocasiona sua desativação, resultando em inibição de secreção de citocinas. Sinais inflamatórios, portanto, são capazes de ativar uma resposta anti-inflamatória que rapidamente previne a produção exacerbada de citocinas inflamatórias (Figura 12). O controle neural de produção e secreção de citocinas provê uma importante alternativa para a regulação humoral por ser rápido, integrado, e não dependente de gradientes de concentração (CZURA e TRACEY, 2005).

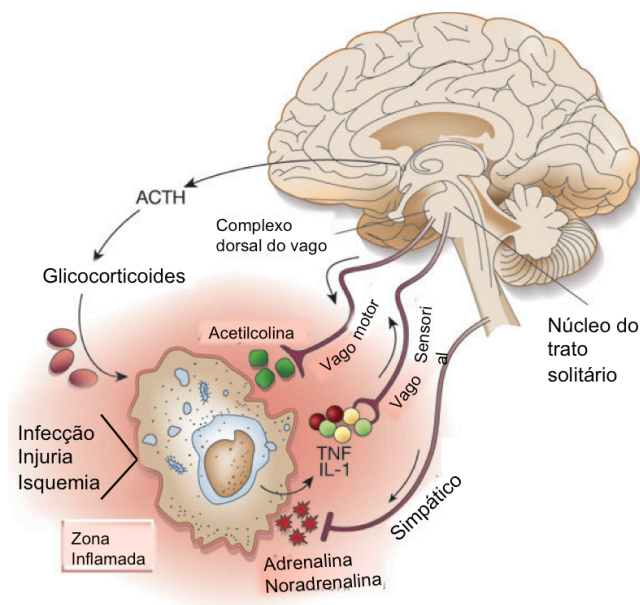


Figura 12 – Esquema representativo da via colinérgica anti-inflamatória (Tracey, 2002).

A inflamação periférica é detectada pelo SNC por meio de dois importantes mecanismos de comunicação: rota humoral e rota neural. Na rota humoral, o $TNF\alpha$ e a $IL-1\beta$ são ativamente transportados através da BHE, enquanto a $IL-1\alpha$ penetra diretamente no cérebro através dos órgãos circumventriculares onde a BHE é inexistente ou descontínua, induzindo ciclooxigenase -2 (COX-2) que processa ácido araquidônico e libera prostaglandina E2 (PGE2). Receptores de PGE localizam-se em áreas cerebrais que possuem importantes funções na resposta inflamatória periférica como ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e o desenvolvimento de febre e anorexia (TRACEY, 2002; CZURA e TRACEY, 2005). As estruturas do complexo dorsal do nervo vago respondem ao aumento de $TNF\alpha$ circulante, alterando a atividade do nervo (TRACEY, 2002; 2009), sendo este o meio predominante para a comunicação do sistema imune com o SNC quando os níveis de citocinas estão bem elevados (CZURA e TRACEY, 2005).

Na rota neural, mesmo quando os níveis de citocinas ainda estão baixos, o SNC é capaz de ser informado sobre o estado da inflamação via sinais neurais aferentes. Esta sinalização é possível devido à inervação vagal nos órgãos e células do sistema retículo-endotelial. A rota neural da inflamação funciona em baixos níveis de detecção, e ativa respostas mesmo quando os agentes inflamatórios estão

presentes nos tecidos em níveis não suficientes para alcançar o cérebro pela circulação sanguínea (TRACEY, 2002; 2007; 2009). Alguns pesquisadores já observaram que a secção vagal impede o surgimento de febre em animais expostos a baixas doses intra- abdominais de IL-1 α ou endotoxina (WATKINS et al., 1995). Ainda não está totalmente claro todo o mecanismo de detecção de mediadores inflamatórios, mas neurônios do nervo vago expressam tanto o mRNA quanto o receptor de IL-1 α (GOEHLER et al., 2000; CZURA e TRACEY, 2005). Estudos eletrofisiológicos também indicaram que o nervo vago pode ser ativado por TNF α e outras citocinas, mecanorreceptores, quimiorreceptores, sensores de temperatura e osmolaridade, os quais podem ser ativados no sítio da inflamação (BERTHOUD e NEUHUBER, 2000; TRACEY, 2002; CZURA e TRACEY, 2005).

Os sinais aferentes humorais e neurais são processados ao chegar ao cérebro, seguido de respostas humorais e neurais coordenadas adequadamente. As fibras aferentes vagais chegam ao NTS e AP, regiões ativadas durante a inflamação periférica (TRACEY, 2002; CZURA e TRACEY, 2005). Em seguida, há ativação de neurônios de segunda ordem no NTS via atividade de glutamato. O NTS forma o ápice no controle vagal que modula a atividade visceral através de dois mecanismos diferentes. Primeiro, os neurônios do NTS inibem os neurônios do DMN, que provê sinais excitatórios colinérgicos para as vísceras. Segundo, os neurônios do NTS também inibem a atividade visceral ativando outros neurônios eferentes do DMN através de vias não adrenérgicas e não colinérgicas (CZURA e TRACEY, 2005).

Tanto o NTS quanto o DMN possuem vasos sanguíneos sem BHE, tornando-se assim importantes órgãos circunventriculares. Isso permite que ambos os núcleos recebam sinalização de mediadores inflamatórios circulantes, como TNF α , IL-1 α e liposacarídeos, em adição à sinalização aferente vagal. A comunicação entre o NTS, DMN, hipotálamo e talvez outras estruturas cerebrais coordenam respostas humorais e neurais que modulam o funcionamento do sistema imune (CZURA e TRACEY, 2005).

Além disso, em recente estudo, Reardon et al., (2013) demonstraram a presença de ChAT, enzima que sintetiza a ACh em células B, macrófagos e células dendríticas. Porém, a expressão da ChAT nas células é temporária, podendo ser reinduzida se houver estímulo apropriado. Demonstrando que a ACh (neural ou não) tem efeito somente no sistema imune inato. Ainda, os autores mostraram que a produção de ACh pelas células B inibe a expressão de moléculas de adesão nas

células endoteliais por meio da ativação de receptores muscarínicos, sem que haja redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias locais, além de controlar o recrutamento local de neutrófilos.

Desta forma, o mecanismo colinérgico pode ter papel chave nas tripanossomíases, pois a resposta a um parasita está diretamente relacionada a um evento imune com componentes da imunidade inata e adquirida (MAGEZ et al., 1999; COEN et al., 2001; HOLLAND et al., 2001; MAGEZ et al., 2006). Sabe-se que a infecção por *T. evansi* estimula a resposta imunológica, levando ao aumento de imunoglobulinas (BARAL et al., 2007) e diversas citocinas tais como a interleucina 1 e 6 (PAIM et al., 2011b) e proteínas de fase aguda (COSTA et al., 2010). Além disso, a infecção por *T. evansi* influencia a atividade da AChE em linfócitos de ratos, indicando alterações na resposta do sistema colinérgico na fase aguda, possivelmente devido a funções imunes realizadas por estas enzimas (DA SILVA et al., 2011c).

Acredita-se que a via colinérgica participe no processo de estimulação dos linfócitos para produzir interferon gamma (IFN- γ) em resposta aos antígenos do parasita, o IFN- γ ativa macrófagos aumentando a sua capacidade de destruir os organismos fagocitados (Figura 13). Os macrófagos ativados induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , que desempenham um papel importante no processo de replicação do parasita, assim como na resposta imunitária do hospedeiro (GAO e PEREIRA, 2002; MAGEZ et al., 2007). As citocinas, em adição às suas funções bem documentadas, são referidas como tendo atividade supressora sobre a eritropoiese (GAFTER et al., 1994; ANDREWS, 2004; MORCEAU et al., 2009) e na infecção por *T. evansi* são agentes relacionados com a anemia associada à inflamação (NOYES et al., 2009; PAIM et al., 2011b).

As citocinas são glicoproteínas que regulam a duração e a intensidade da resposta imune (KOPF et al., 2010). Possuem papel essencial na formação dos sinais locais ou sistêmicos da inflamação, sendo produzidas e liberadas por vários tipos de células em resposta a estímulos desencadeados por agentes infecciosos como vírus, parasitos, bactérias e seus produtos, ou em resposta a outras citocinas, sendo responsáveis pela liberação dos mediadores do processo inflamatório (FELDMANN, 2008; KOPF et al., 2010). São liberadas principalmente por monócitos/macrófagos e linfócitos, mas também podem ser secretadas por células adiposas, células epiteliais, células endoteliais e células da glia (TRAYHURN e

WOOD, 2004). Os monócitos circulantes no sangue e os macrófagos presentes nos tecidos promovem a ativação dos linfócitos T e a secreção de citocinas. São os macrófagos ativados os principais responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias como: IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 (CAVAILLON, 1994).

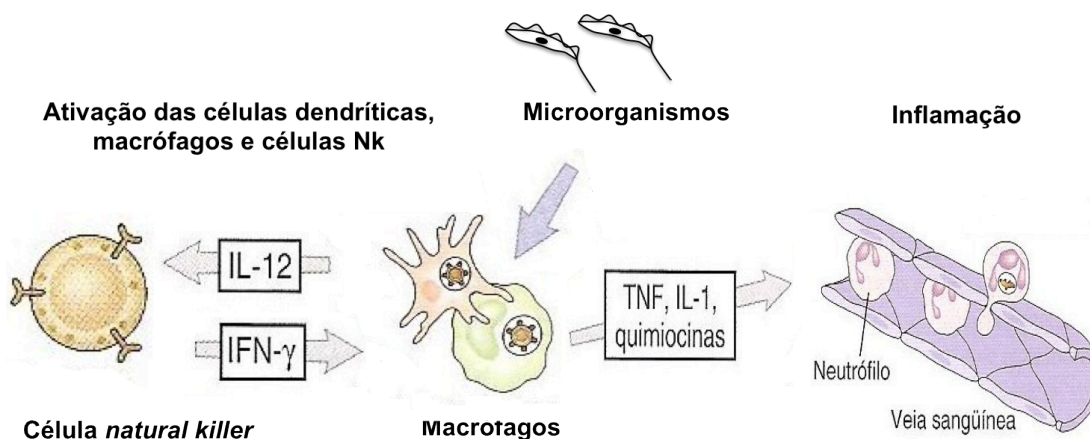


Figura 13 – Esquema da produção das citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, células natural killer (NK) e células dendríticas (Adaptado de ABBAS & LICHTMAN, 2009).

As citocinas são glicoproteínas que regulam a duração e a intensidade da resposta imune (KOPF et al., 2010). Possuem papel essencial na formação dos sinais locais ou sistêmicos da inflamação, sendo produzidas e liberadas por vários tipos de células em resposta a estímulos desencadeados por agentes infecciosos como vírus, parasitos, bactérias e seus produtos, ou em resposta a outras citocinas, sendo responsáveis pela liberação dos mediadores do processo inflamatório (FELDMANN, 2008; KOPF et al., 2010). São liberadas principalmente por monócitos/macrófagos e linfócitos, mas também podem ser secretadas por células adiposas, células epiteliais, células endoteliais e células da glia (TRAYHURN e WOOD, 2004). Os monócitos circulantes no sangue e os macrófagos presentes nos tecidos promovem a ativação dos linfócitos T e a secreção de citocinas. São os macrófagos ativados os principais responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias como: IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 (CAVAILLON, 1994).

A estimulação das células inflamatórias, em resposta ao reconhecimento de antígenos específicos pelos linfócitos T promove o crescimento, a diferenciação e a

ativação de leucócitos que estão envolvidos na resistência ao microrganismo e na lesão tecidual no hospedeiro. Quando estão no local da infecção os neutrófilos e macrófagos reconhecem os patógenos por meio de vários receptores, ingerem-nos para destruição intracelular, secretam citocinas e respondem de outras maneiras para eliminar os patógenos e reparar os tecidos infectados. Os linfócitos T ativados proliferam e passam também a secretar as citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α e IFN- γ , que ativam mais macrófagos, causando ativação vascular e inflamação (ABBAS et al., 2002).

As citocinas podem atuar como mediadoras intercelulares de muitos processos biológicos, como inflamação, fibrose, reparação, angiogênese, regulação da hematopoiese, controle da proliferação e diferenciação celular e ativação da resposta imune celular e humoral (FELDMANN, 2008). Ainda, são atribuídas à inibição da hematopoiese e associadas à anemia de doença crônica. Um aumento nos níveis de citocinas pode ocasionar supressão da eritropoiese e a degradação de hemácias, levando a redução do hematócrito (TANIGUCHI et al., 1997). Baral et al. (2007) e Paim et al. (2011) observaram uma correlação entre a anemia e aumento dos níveis séricos TNF- α em ratos experimentalmente infectados com *T. evansi*.

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que induz o processo inflamatório através da síntese de moléculas de adesão, fatores quimiotáticos para macrófagos e neutrófilos, proteínas de fase aguda e geração de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e IL-6 (TIZARD, 2002). O controle da parasitemia é atribuído ao aumento dos níveis séricos de TNF- α nas tripanossomíases (NAESSENS et al., 2004; BARAL et al., 2007; MAGEZ et al., 2007). Ainda, essa citocina está relacionada à perda de peso nos animais infectados por *T. brucei*, isso se deve ao TNF- α causar supressão da lipase lipoprotéica produzida pelos adipócitos levando à perda de peso progressiva (MAGEZ et al., 1999).

O IFN- γ é apontado como sendo a primeira citocina envolvida na resposta inflamatória e a principal citocina da resposta Th1. Ele é capaz de ativar macrófagos e inibir a replicação intracelular do parasito, sendo produzido logo após a adesão e invasão do parasito na célula hospedeira (MABBOTT et al., 1998; PAULNOCK e COLLIER, 2001). Já a principal atividade da IL-1 é ser reguladora do processo inflamatório. Essa citocina induz a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, estimula os linfócitos na resposta imune e age no hipotálamo causando febre,

letargia e perda de peso (ENDRES et al., 1987; FINCK e JOHNSON, 1997). A IL-1 é uma citocina mediadora da patogênese na tripanossomíases (VINCENDEAU e BOUTEILLE, 2006). Altos níveis de IL-1 foram observados na infecção aguda em ratos experimentalmente infectados por *T. brucei* (SILEGHEM et al., 1989). Em ratos infectados por *T. cruzi* a IL-1 estimula a resposta imune mediada por linfócitos (REED et al., 1989).

Na resposta de fase aguda, a IL-6 também induz a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (CASTELL et al., 1990). Muitas funções biológicas da IL-6 são também desempenhadas por IL-1 e TNF- α . Em sinergismo a IL-1 e a IL-6 promovem a ativação e proliferação de linfócitos T. Esta citocina induz a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e a liberação de IgM, IgG e IgA e, estimula a proliferação de células germinativas hematopoiéticas (HEINRICH et al., 1990; VAN SNICK, 1990). Nas tripanossomíases ocorre aumento dos níveis séricos de IL-6 (PAIM et al., 2011). Em ratos infectados pelo *T. cruzi* foi observado que a deficiência de IL-6 aumenta a suscetibilidade à infecção, com aumento da parasitemia e mortalidade dos animais infectados (GAO e PEREIRA, 2002). Ainda, na infecção por *T. brucei* ocorre aumento dos níveis séricos de IL-6, estando correlacionados ao processo neuro-inflamatório induzido pelo parasito (STERNBERG et al., 2005).

Por outro lado, a IL-10 é um inibidor de macrófagos ativados, tendo um importante papel no controle homeostático das reações da imunidade inata e da imunidade celular. Possui a função de inibir a produção de IL-12 e TNF- α pelos macrófagos ativados, agindo assim como uma molécula anti-inflamatória (FIORENTINO et al., 1991; MOORE et al., 2001). A importância da produção de IL-10 endógena na prevenção de infecções por parasitas foi demonstrada com uma estirpe virulenta de *Toxoplasma gondii*, em que ratos “knock out” para IL-10 apresentaram mortalidade aumentada (sem evidência de maior parasitemia) associada a elevados níveis de IFN- γ , IL-12 e TNF- α (GAZZINELLI et al., 1996). Porém, ainda não se conhece seu exato papel na infecção por *T. evansi*.

Como visto, diversas citocinas podem ser induzidas por uma gama de estímulos. Entre eles, estão os agentes infecciosos. Proteínas, lipídeos e açúcares presentes na superfície de diversos microrganismos induzem a secreção de várias citocinas, que irão desencadear uma resposta inflamatória ou alérgica. Entretanto, geralmente a produção de citocinas durante as infecções é exacerbada e acaba por

desencadear efeitos deletérios ao hospedeiro. Como exemplo, o choque séptico é resultado da produção descontrolada de TNF- α e IL-1 induzida por endotoxinas ou superantígenos presentes na parede de bactérias gram-negativas ou gram-positivas, respectivamente (O'SHEA e MURRAY, 2008; VENET et al., 2008). Desta forma a tripanossomíase pode levar a doenças inflamatórias crônicas que são desencadeadas devido à persistência do estímulo inflamatório. A presença de um antígeno constantemente reconhecido por linfócitos dispara a produção contínua de citocinas como TNF- α e IFN- β . Essa produção contínua acaba por perpetuar o processo inflamatório e pode contribuir para efeitos deletérios no hospedeiro.

Tendo em vista que todas essas síndromes associadas com a infecção causada pelo parasita são muitas vezes fatais, diversas drogas têm sido utilizadas no tratamento da doença causada por *T. evansi* (GILLINGWATER et al., 2007; DA SILVA et al., 2009d; DA SILVA et al., 2011f; TONIN et al., 2011). O tratamento para a “Surra” baseia-se principalmente em quatro drogas: suramina, aceturato de diminazeno, quinapiramina e melarsomina (BRUN et al., 1998). Os problemas observados no emprego destas drogas são a alta toxicidade para o hospedeiro e o surgimento de cepas resistentes, visto que grande parte destes compostos vem sendo utilizados no campo há muitos anos.

Zhang et al. (1993) induziram experimentalmente resistência ao aceturato de diminazeno, melarsomina e suramina em laboratório, demonstrando que o uso indiscriminado destas drogas pode culminar em uma menor sensibilidade dos protozoários aos tratamentos disponíveis. O suramim, fármaco que foi utilizado no primeiro caso humano de infecção com o parasito (JOSHI et al., 2005; JOSHI et al., 2006), demonstrou-se eficiente. Porém, devido ao elevado custo do tratamento, este fármaco tem uso limitado em animais. Recentemente, pesquisadores observaram que vários compostos derivados de diamidina podem ser eficazes contra *T. evansi*, sendo que 31 destes apresentaram alta eficácia contra o protozoário e baixa toxicidade para células de rato em cultura. Em uma ampla avaliação sobre a situação atual de resistência às quatro principais drogas correntemente utilizadas, demonstraram que cepas da Colômbia e do Quênia são resistentes à suramina (a cepa queniana tem uma resistência 200 vezes maior que o padrão), cepas do sudeste da Ásia, Indonésia e Filipinas apresentaram resistência ao aceturato de diminazeno e a cepa colombiana apresentou maior grau de resistência à quinapiramina, seguida por uma cepa brasileira (GILLINGWATER et al., 2007).

Desta forma, os tratamentos alternativos contra a tripanossomíase vêm sendo pesquisados, principalmente pela alta taxa de resistência aos medicamentos e os efeitos colaterais da terapia de rotina (WITOLA et al., 2004; ZHOU et al., 2004; GILLINGWATER et al., 2007; LIAO e SHEN, 2010). A curcumina ($[\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCO}]_2\text{CH}_2$) (Figura 14), um pigmento amarelo, extraído do rizoma da planta *Curcuma longa* L. tem demonstrado ações anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, hipoglicêmica, além de atuar na cicatrização de feridas. Extensos estudos nas últimas três décadas têm indicado o potencial terapêutico da curcumina contra uma ampla gama de doenças (KUHAD e CHOPRA, 2007; AGGARWAL e HARIKUMAR, 2009; VILLAFLORES et al., 2012; SHEHZAD et al., 2013). Além disso, a curcumina tem potencial para interagir diretamente com as numerosas moléculas de sinalização (KUNNUMAKKARA et al., 2008). Estudos sobre a segurança da curcumina e dos seus derivados em diferentes modelos animais demonstraram que, mesmo em altas doses esta substância não é tóxica para animais de laboratório e humanos, permitindo assim avaliar a eficácia da curcumina em ensaios clínicos terapêuticos (AMMON e WAHL, 1991; ABE et al., 1999; MAHESHWARI et al., 2006).

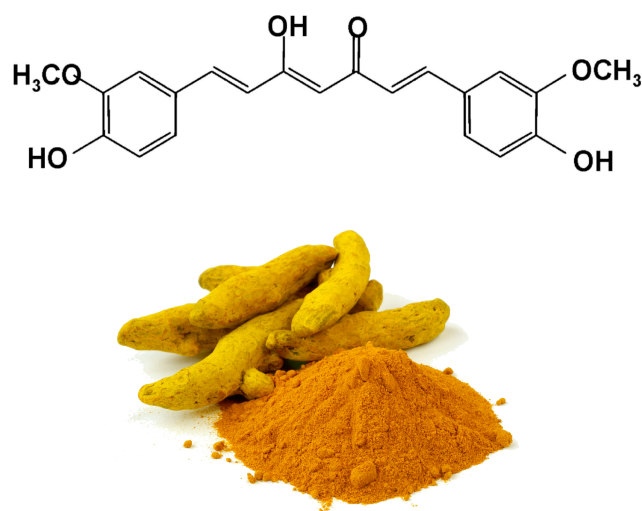


Figura 14 – Estrutura química, rizoma e extrato da curcumina. Adaptado de Kowluru & Kawar (2007)

A curcumina é um composto fenólico que possui baixa massa molecular, e foi caracterizado quimicamente em 1913 como [1,7-bis-(4-hidroxi-3metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5- diona] (LAMPE, MILOBEDZKA, 1913). É encontrada no pó amarelo-

alaranjado extraído da raiz da curcuma ou açafrão-da-índia (*Curcuma longa*) (MAHESHWARI et al., 2006) (Figura 14). Corante rotineiro na indústria alimentícia, ela está presente nos mais diversos produtos, de biscoitos a sorvetes, de sopas a margarinas. Também é a base de condimentos como o *curry*. Na Índia, seguindo a dieta típica do país, as pessoas chegam a consumir aproximadamente dois gramas de curcumina por dia. Nos países ocidentais, onde a quantidade nos alimentos é bem menor, a expectativa de que a curcumina possa melhorar a qualidade de vida e prevenir doenças a transformou num suplemento alimentar (MAHESHWARI et al., 2006; NOGUEIRA, 2010).

Como um agente único pode possuir diferentes efeitos, tem sido um enigma ao longo dos anos, tanto para cientistas quanto para clínicos. No entanto, numerosas evidências indicam que curcumina pode modular as múltiplas moléculas celulares de sinalização (KUNNUMAKKARA et al., 2008). Sua ação tem sido associada a um papel imunomodulador devido à influência que este fitoquímico exerce nas citocinas, nos eicosanóides (moléculas pró-inflamatórias) e nas enzimas proteolíticas e antioxidantes, moléculas envolvidas no processo de inflamação celular. Atua principalmente na mediação da resposta inflamatória, regulando a produção de TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 (ABE et al., 1999; SRIVASTAVA et al., 2011), citocinas importantes na defesa contra *T. evansi* (PAIM et al., 2011).

Além disso, pesquisas têm revelado uma série de ações benéficas na utilização da curcumina devido a suas propriedades antioxidantes e neuroprotetoras, o que a tornaria uma potencial candidata a combater doenças neurológicas (BALA et al., 2006; ZHAO et al., 2008; SETHIA et al., 2009). Sua utilização poderia minimizar ou até mesmo reverter as alterações neurológicas apresentadas pelos animais infectados por *T. evansi*.

Desta forma, este estudo busca compreender melhor a relação hospedeiro-parasita, buscando compreender os mecanismos da patogenia do *Trypanosoma evansi* no sistema nervoso central (SNC), periférico e imunológico. Além de avaliar a curcumina como agente terapêutico, avaliando seu potencial curativo e também preventivo, pois poderia reforçar o sistema imune estimulando o uso como suplemento principalmente nas regiões em que a doença é endêmica.

1.1 Objetivos

Considerando as provas apresentadas e do interesse de compreender melhor os mecanismos patogênicos da infecção pelo *T. evansi*, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial neuropatogênico do tripanossoma, e sua influência sobre os sistemas colinérgico e glutamatérgico. Além disso, buscou-se investigar o uso de curcumina como possível terapias preventiva e/ou curativa contra a infecção.

Assim, os objetivos específicos são:

Artigo 1) avaliar se a infecção por *T. evansi* altera a atividade das colinesterases sanguíneas e encefálicas, utilizando ratos Wistar como modelo experimental.

Artigo 2) medir a atividade da acetilcolinesterase em *T. evansi* usando um protocolo de bioquímica buscando discutir algumas possibilidades de interação entre a presença desta enzima no parasita e sua possível relação com o hospedeiro.

Artigo 3) avaliar o efeito *in vivo* da curcumina como agente tripanocida e compreender seu mecanismo de ação no hospedeiro.

Manuscrito 1) determinar os efeitos da infecção por *T. evansi* sobre o desempenho comportamental de ratos, relacionando-os com alterações neuroquímicas do sistema glutamatérgico e com a atividade das enzimas encefálicas $\text{Ca}^{+2}\text{ATPase}$, $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}\text{ATPase}$ e acetilcolinesterase.

2 ARTIGO I

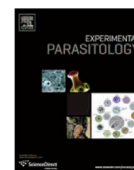
Trypanosoma evansi: CHOLINESTERASE ACTIVITY IN ACUTELY INFECTED WISTAR RATS

Artigo publicado na revista "Experimental Parasitology"



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Trypanosoma evansi: Cholinesterase activity in acutely infected Wistar rats

Patrícia Wolkmer^{a,*}, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes^a, Carina Franciscato^b, Aleksandro Schafer da Silva^c, Carolina Kist Traesel^c, Lucas Carvalho Siqueira^c, Maria Ester Pereira^b, Sílvia Gonzalez Monteiro^d, Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti^a

^aLaboratory of Veterinary Clinical Analysis, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Brazil

^bDepartment of Chemistry, UFSM, Brazil

^cPost-Graduation Program in Veterinary Medicine, UFSM, Brazil

^dDepartment of Microbiology and Parasitology, UFSM, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2009
Received in revised form 26 January 2010
Accepted 27 January 2010
Available online 6 February 2010

Keywords:

Acetylcholinesterase
Butyrylcholinesterase
Protozoa
Rat
Trypanosomiasis

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate cholinesterase activity during the early acute phase of *Trypanosoma evansi* infection in rats. Fifteen male Wistar rats were randomly distributed into three groups ($n = 5$ animals per group): two trypanosome-infected groups (T3 and T5) and uninfected controls (C). The animals were inoculated intraperitoneally with 10^6 trypanosomes. The blood was collected by cardiac puncture on the 3rd (T3) or 5th day post-infection (T5 and C). Cerebrum and cerebellum were removed for the evaluation of acetylcholinesterase (AChE) activity. AChE activity was also evaluated in whole blood and butyrylcholinesterase activity (BUChE) in plasma samples. Parasitemia were progressive increase and parasites were observed in the peripheral blood of all infected animals one day post-inoculation. AChE activity was not altered in cerebrum and cerebellum tissues. AChE activity in blood significantly decreased in the T3 and T5 groups (26.63 and 25.86 mU/l mol Hb) compared with the control (37.84 mU/l mol Hb). In addition BUChE activity in plasma was lower in the T3 (7.01 $\mu\text{mol BTC hydrolyzed/h/mL}$) than the T5 and C groups (9.84 and 12.00 $\mu\text{mol BTC hydrolyzed/h/mL}$). This study therefore, shows that reductions in the activity of cholinesterase occur in acute infection by *T. evansi* in rats and this demonstrates an important change occurring in animals infected by the protozoan and may indicate a potential role the enzymes play in the mechanism of disease.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Trypanosome infections are among the most serious parasitic diseases in humans and animals in Africa and in some parts of Asia and South America. *Trypanosoma evansi* has a wide range of hosts and is pathogenic to most domestic and laboratory animals, causing Surra disease. Several species including horse, camel, cattle, water buffalo, and pig are infected in most enzootic areas, the infection in these animals being usually devoid of clinical symptoms and seldom fatal (Biswas et al., 2001). Consequently these animals serve as reservoirs for *T. evansi* in enzootic areas, especially in India, the Far East, and in Central and South America. *T. evansi* is fatal to various laboratory animals, causing severe disease manifestations (Misra and Choudhury, 1975).

Animals infected with *T. evansi* develop anemia (Wolkmer et al., 2007) and clinical signs of neurological disorder in the final stage

of the disease (Tuntasuvan et al., 1997, 2000; Rodrigues et al., 2005). In the first report of *T. evansi* infection in humans, signs of sensory deficit, disorientation, agitation and aggression were described (Joshi et al., 2005). The signs of neurological disorder may be the result of necrotizing panencephalitis (Rodrigues et al., 2005), leading to alteration in the actions of neurotransmitters. Recently we reported that chronic infection by *T. evansi* influenced cholinesterases of cats seen as changes in the responses of the cholinergic system (Da Silva et al., in press). These changes in enzymes could be related with the neurological disorder of animals infected with *T. evansi*.

This finding is important because acetylcholinesterase (AChE: EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BUChE: EC 3.1.1.8) coupled with the acetylcholine (ACh) receptor, are responsible for the transmission of action potentials across nerve and neuromuscular synapses, a key process in the regulation of the cholinergic neurotransmission (Darvesh et al., 2003). However, the biological role of AChE is not limited to cholinergic transmission. AChE has been implicated in several non-cholinergic actions including cell proliferation (Appleyard, 1994), neurite extension and responses to various insults including oxidative stress (Grisaru et al., 1999). The first evidence of additional functions of AChE protein was based

* Corresponding author. Address: Laboratório Análises Clínicas Veterinária – LACVet, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: patiwol@hotmail.com (P. Wolkmer).

on the high levels of this enzyme observed in non-neuronal tissues such as blood cells, notably erythrocytes and lymphocytes (Kawashima and Fujii, 2000).

Therefore, considering the importance of AChE the aim of this study was to investigate the activity this enzyme in rats acutely infected with *T. evansi*. In addition, since *T. evansi* may be involved in disorders in the central nervous system (CNS), we also investigated the effect of AChE activity in whole blood in order to determine whether the activity of this enzyme in blood reflects its status in the CNS.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiment was conducted using 15 adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*; 250–290 g) that were housed in a room with controlled temperature (23 °C) and relative humidity (70%) and fed with commercial rat pellets with continuous access to water. The rats were randomly divided into three groups ($n = 5$ animals per group), 2 trypanosome-infected groups (T3 and T5) and an uninfected control group (C). The number that follows the group's name refers to the day after infection on which cardiac blood samples were collected (day 0 = day of treatment).

This study was approved by the Committee of Ethics and Animal Welfare of the Rural Science Center of the Federal University of Santa Maria (CCR/UFSM), No. 23081.005984/2008-23 in accordance with existing legislation and the Ethical Principles published by the Brazilian College of Animal Experiments (COBEA).

2.2. Trypanosome infection

Animals of trypanosome-infected groups were inoculated intraperitoneally with 0.2 mL of rat blood containing approximately 10^6 trypanosomes. *T. evansi* was originally isolated from a naturally infected dog (Colpo et al., 2005) and maintained by passages through Wistar rats. This blood stabilate induces an acute infection in rats with a survival period of 4–6 days post-infection (dpi) (Da Silva et al., 2009b). The control group received 0.2 mL of saline solution by intraperitoneal injection.

2.3. Parasitemia estimation

The presence and degree of parasitemia were determined daily for each animal by blood film examination. A drop of blood was collected from the tail, placed on a slide and a thin blood smear was prepared manually. The blood films were stained (Panótico Rápido LB stain, Laborclin, Brazil) and then examined under a light microscope, counting 10 fields at 1000 \times magnification. The parasitemia after euthanasia was also estimated using a Neubauer chamber.

2.4. Collection and preparation of blood and brain samples

The animals were anesthetized with diethyl ether and a blood sample collected by cardiac puncture on the 3rd (T3), and 5th (TC, T5) dpi. Progression of the disease was monitored by hemogram. For determination of AChE activity, the cerebrum and cerebellum were removed, weighed and homogenized (1:10, w/v) in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 with 160 mM sucrose. Blood samples were collected in tubes with sodium heparin and the samples were diluted 1:50 (v/v) in lysis solution (0.1 mmol/L potassium/sodium phosphate buffer containing 0.03% Triton X-100) to determine AChE activity in blood. For plasma BUCHE assays, blood samples were conditioned in tubes containing heparin and the

plasma was obtained by blood centrifugation at 2000g during 10 min. The samples were frozen at -20 °C until analysis.

2.5. Hematology

The packed cell volume (PCV) was measured using the standard microhematocrit method (Centimicro mod. 1–15-Sigma, Germany) according to Schalm et al. (1975). The red blood cell (RBC) count and hemoglobin (Hb) concentration were determined by an automated blood cell counter (CC-550-Celm, São Paulo, Brazil). Red cell indices such as the mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated using a standard formula (Schalm et al., 1975). Blood smears were prepared for microscopic examination.

2.6. Enzyme assay

The activity of AChE in the cerebrum and cerebellum was determined by the method described by Ellman et al. (1961) as modified by Pereira et al. (2004). The mixture assay containing 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoic Acid) (DTNB) 1.04 mM, potassium phosphate buffer 24 mM pH 7.2 and 25 μ L of enzymatic material was pre-incubated for 2 min at 30 °C and the reaction was started with the addition of acetylthiocholine (ATC) 0.83 mM. The product of thiocholine reaction with DTNB was determined at 412 nm in 2 min. The specific activity is expressed as μ mol ATC hydrolyzed/h/mg of protein.

The AChE enzymatic assay in whole blood was determined by the method described by Ellman et al. (1961) as modified by Worek et al. (1999). The incubation system was composed of sodium phosphate buffer 0.063 mM pH 7.4, DTNB 0.316 mM and 0.5 mL of the hemolyzed blood. The increase in absorbance was registered over 2 min at 436 nm. The specific activity of whole blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and hemoglobin concentration and the results were expressed as mU/l mol Hb.

The plasma BUCHE activity was determined as described by Ellman et al. (1961). The BUCHE activity was assayed in a medium containing sodium phosphate buffer 0.1 mM, pH 7.4, DTNB 0.30 mM and 50 μ L of plasma. After 3 min of pre-incubation at 30 °C, the reaction was started with butyrylthiocholine (BTC) 1 mM. The increase in absorbance was registered over 2 min at 412 nm. The specific activity was expressed in μ mol of BTC hydrolyzed/h/mL of plasma.

2.7. Protein determination

Protein concentrations of the homogenates of cerebrum, cerebellum and blood were determined by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as the standard.

2.8. Statistical analysis

All samples were run in triplicate. The results are presented as the mean (\pm SEM). Differences among the means were compared by the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test when appropriated, using the SPSS version 11.5 software program. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Parasitemia and course of the infection

Parasites were observed in the peripheral blood of all infected animals one day post-inoculation, with a progressive increase in parasitemia over time (Fig. 1). The mean parasite count was 10^4

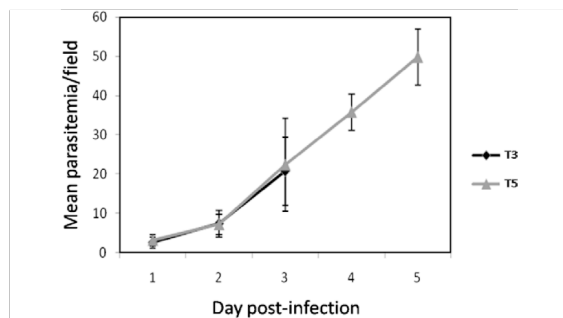


Fig. 1. Parasitemia of peripheral blood of rats infected with *Trypanosoma evansi* and euthanized at 3rd (T3 group) and 5th (T5 group) day post-infection. The results are presented as mean \pm SEM ($n = 5$).

and 10^5 per μL of blood in groups T3 and T5, respectively. Clinical signs such as apathy and weakness were observed in all animals of group T5. Four rats of group T5 also demonstrated neurological signs such as ataxia, tremors and terminal coma. Control groups showed no *T. evansi* trypomastigotes in blood smears and remained clinically healthy during the experimental period.

3.2. Hematological changes

The mean values for the hematological examination are presented in Table 1. Blood was collected to assess the progression of the disease (Feldman et al., 2000). Statistical analysis showed a significant decrease in RBC, PCV, and Hb values in the infected animals. However, there was no significant difference in the mean MCV and MCHC values between infected and uninfected animals, characterizing a normochromic normocytic anemia. A mild degree of anisocytosis and polychromasia was observed in the blood smear examination of the animals of group T5.

3.3. Enzyme changes

Cerebrum and cerebellum weights (Table 2) and the AChE activities (Fig. 2A) were not altered by the infection. However, T5 animals presented a mild reduction of 15.5% and 16.9% in the cerebrum and cerebellum AChE activities, respectively.

One-way ANOVA revealed a significant effect of *T. evansi* infection on blood AChE activity [$F(2,18) = 11.41, p < 0.001$]. The T3 and T5 groups had blood AChE activity lower than the control group (post hoc test; Fig 2B). Significant effect was also observed in plasma BUCHE activity [$F(2,12) = 4.23, P < 0.041$]. The effect was a consequence of the lower BUCHE activity in the plasma of T3 animals. However, the BUCHE activity of the T5 group was not significantly altered (Fig 2C).

Table 1
Hematological values of rats infected with *Trypanosoma evansi* and euthanized at 3rd (T3 group) and 5th (T5 group) day post-infection.

	Groups		
	Control	T3	T5
Erythrocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.16 ± 0.32^a	5.59 ± 0.53^a	4.74 ± 0.59^b
PVC (%)	42.00 ± 1.30^a	37.20 ± 2.28^b	33.00 ± 1.22^c
Hemoglobin (g/dL)	13.40 ± 0.81^a	12.16 ± 0.59^b	10.10 ± 0.55^c
MCV (fL)	68.55 ± 1.95^a	66.82 ± 3.91^a	70.46 ± 8.54^a
MCHC (g/dL)	31.74 ± 1.34^a	32.74 ± 1.69^a	30.59 ± 1.57^a

The results are presented as mean \pm SEM ($n = 5$). Different letters mean significant statistical differences. (Duncan's multiple range test $P < 0.05$.)

PCV: Packed cell volume; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 2
Weights of cerebrum and cerebellum of rats infected with *Trypanosoma evansi* and euthanized at 3rd (T3 group) and 5th (T5 group) day post-infection.

Groups	Cerebrum (g)	Cerebellum (g)
Control	1.29 ± 0.02	0.28 ± 0.012
T3	1.28 ± 0.03	0.28 ± 0.005
T5	1.32 ± 0.02	0.29 ± 0.009

The results are presented as mean \pm SEM, $n = 5$.

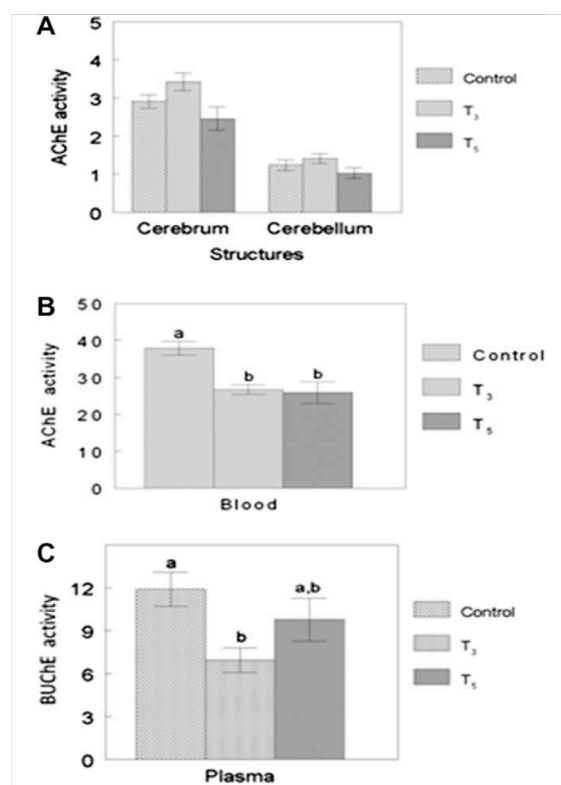


Fig. 2. Acetylcholinesterase (AChE) activity in cerebrum and cerebellum (A); blood AChE activity (B) and plasma butyrylcholinesterase (BUCHE) activity (C) of rats infected with *Trypanosoma evansi* and euthanized at 3rd (T3 group) and 5th (T5 group). The specific activities were expressed as μmol ATC hydrolyzed/h/mg of protein (A) mU/mol Hb and (B) and μmol BTC hydrolyzed/h/mL of plasma (C). The results are presented as mean \pm SEM ($n = 5$). Different letters mean significant statistical differences. (Duncan's multiple range test $P < 0.05$.)

4. Discussion

Rattus norvegicus is a suitable model for the study of the acute *T. evansi* infection (Queiroz et al., 2000). The isolate of *T. evansi* is recognized to be a pathogenic trypanosome and develops an acute and fatal disease in rats if not treated (Da Silva et al., 2009b; Wolkmer et al., 2007, 2009). The detection of parasitemia occurs early (24 h dpi) and is characterized by exponential parasite growth (Fig. 1) along with clinical signs such as apathy, weakness, ataxia and severe anemia. Anemia is a common feature of infections by *T. evansi* and has been associated with significant alterations in bone marrow and in hematological values (Herrera et al., 2001; Aquino et al., 2002; Hilali et al., 2006).

In this study, infected animals showed a significant decrease in RBCs, Hb and PCV, while no changes in MCV and MCHC were ob-

served (Table 1). The analysis of red blood cell indices indicates marked anemia in all infected rats (groups T3 and T5). Anisocytosis was observed in the blood smears, and mild polychromasia in the animals of group T5, suggesting bone marrow regeneration. The same results were obtained in a previous study with *T. evansi*-infected rats (Wolkmer et al., 2007, 2009), where the animals showed an increase in the reticulocyte count and a decrease in the myeloid:erythroid ratio (Wolkmer et al., 2007). This shows that the production of erythrocytes in the bone marrow is not affected, but what occurs is a destruction of erythrocytes in blood circulation. The pathogenesis of anemia still remains unclear. Previous studies have suggested that anemia is a result of red blood cell destruction (Jatkar and Purohit, 1971) by an immunologically-mediated mechanism (Assoku, 1975), associated with the development of antigen–antibody complexes (Audu et al., 1999). The anemia was also attributed to erythrocyte damage by the enzyme trypanosomal neuraminidase and increased levels of lipid peroxidation (Shehu et al., 2006; Wolkmer et al., 2009).

T. evansi infection did not alter either the cerebrum or cerebellum weight (Table 2) or its AChE activity (Fig. 2A). However, decreased blood AChE activity was observed in the T3 and T5 animal groups (Fig. 2B). Several studies have demonstrated the importance of cholinergic peripheral markers in diseases with neurological symptoms for evaluating biochemical processes that occur in the CNS. Blood AChE activity is easily obtained and shows functional and structural properties similar to AChE of the synaptic cleft, which may reflect its status (Thiermann et al., 2005). Decreases in the total blood AChE activity was observed in the T3 and T5 groups, while there was a tendency to decrease the activity of this enzyme in the CNS in the T5 group ($P \approx 0.06$), showing that the AChE activity in the peripheral tissues can be more sensitive to the effects of acute *T. evansi* infection.

Similar results were observed in chronic infection by *T. evansi* in cats demonstrating that infection by *T. evansi* influences cholinesterases, as indicated by changes in the responses of the cholinergic system. However, there was a reduction in AChE activity in the central nervous system evaluated on day 56 post-infection (Da Silva et al., in press). These changes could explain the motor dis-coordination and paralysis seen in animals infected by *T. evansi*. Research with organophosphorus esters indicate correlations between levels of erythrocyte AChE inhibition and symptoms such as muscle fasciculation, convulsions and coma (Lotti, 1995). These symptoms were also observed in animal of the T5 group that had reduced activity of this enzyme. AChE is one of the most efficient biological catalysts known. It plays a key role in cholinergic neurotransmission by hydrolysing the transmitter acetylcholine, thus terminating its action (Soreq and Seidman, 2001; Mesulam et al., 2002). AChE is an important regulatory enzyme that controls the cholinergic nervous impulses, both in brain cholinergic synapses and in the muscle (Taylor and Radic, 1994).

The animals of the T3 group presented reduction in plasmatic BUCHE activity (Fig. 2C). As plasmatic BUCHE is synthesized in the liver (Kutty, 1980), a reduction in hepatic function would result in reduced amounts of the enzyme in the blood (Singh, 1976; Lemberg and Macchi, 1981). Studies in several *T. evansi*-infected animals demonstrated that the disease causes hepatic damage (Herrera et al., 2001; Aquino et al., 2002). The acute infection and the inflammatory processes could also change the BUCHE activity (Whittaker, 1980). By inactivating acetylcholine, BUCHE may enhance inflammation (Undurti, 2007). Thus, the reduction of BUCHE activity in acute infection by *T. evansi* could be related to hepatic damage or to an inflammatory process. Moreover, according to Whittaker (1980), a 25% reduction in the activity of this enzyme in disease might lead to death.

In conclusion, this study shows that reductions in the activity of cholinesterase occur in acute infection with *T. evansi* in rats as well

as in chronic infection with *T. evansi* in cats, demonstrating an important change occurring in animals infected with *T. evansi* which may have a role in the mechanism of disease since these enzymes are essential in nerve impulse transmission. We can also infer that AChE activity in whole blood could be a good peripheral marker as it permits evaluation through a more accessible method than direct evaluation the action of this enzyme in CNS.

References

- Appleyard, M.E., 1994. Non-cholinergic functions of acetylcholinesterase. *Biochemical Society Transactions* 22, 749–755.
- Aquino, L.P.C.T., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Marques, L.C., Castro, M.B., Malheiros, E.B., 2002. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 54, 8–18.
- Assoku, R.K., 1975. Immunological studies of the mechanism of anaemia in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rats. *International Journal for Parasitology* 5, 137–145.
- Audu, P.A., Esievo, K.A., Mohamed, G., Ajanusi, O.J., 1999. Studies of infectivity and pathogenicity of an isolate of *Trypanosoma evansi* in Yankasa sheep. *Veterinary Parasitology* 86, 185–190.
- Biswas, D., Choudhury, A., Misra, K.K., 2001. Histopathology of *Trypanosoma evansi* infection in bandicoot rat. 1. Visceral organs. *Experimental Parasitology* 99, 148–159.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Colpo, C.B., Monteiro, S.G., Stainki, D.R., Colpo, E.T.B., Henriques, G.B., 2005. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. *Ciência Rural* 35, 717–719.
- Da Silva, A.S., Spanevello, R., Stefanello, N., Wolkmer, P., Costa, M.M., Zanette, R.A., Lopes, S.T.A., Santurio, J.M., Schetinger, M.R.C., Monteiro, S.G., in press. Influence of *Trypanosoma evansi* in blood, plasma, and brain cholinesterase of experimentally infected cats. *Research in Veterinary Science*.
- Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Gressler, T.L., Otto, M.A., Bess, F., Tavares, S.K.C., Zanette, R.A., Monteiro, S.M., 2009b. Patogenicidade de um isolado de *Trypanosoma evansi* em ratos inoculados com o parasite em sangue in natura e criopreservado. *Ciência Rural* 49, 1842–1846.
- Darvesh, S., Hopkins, D.A., Geula, C., 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience* 17, 131–138.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95.
- Feldman, B.V., Zinkl, J.G., Join, N.C., 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H., 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry* 264, 672–686.
- Herrera, H.M., Aquino, L.P.C.T., Menezes, R.F., Marques, L.C., Moraes, M.A.V., 2001. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. *Acta Tropica* 81, 203–210.
- Hilali, M., Abdel-Gawad, A., Nassar, A., Abdel-Wahab, A., 2006. Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology* 139, 237–243.
- Jatkar, P.R., Purohit, M.S., 1971. Pathogenesis of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. I. Haematology. *Indian Veterinary Journal* 48, 239–244.
- Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Powar, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., Dani, V.S., Bhargava, A., Jannin, J., Truc, P., 2005. Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 491–495.
- Kawashima, K., Fujii, T., 2000. Extraneural cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology and Therapeutics* 86, 29–48.
- Kutty, K.M., 1980. Biological function of cholinesterase. *Clinical Biochemistry* 13, 239–243.
- Lemberg, A., Macchi, M.C., 1981. Usefulness of serum pseudocholinesterase isoenzymes in acute and chronic liver diseases and neoplasms (experimental and clinical studies). *Acta Gastroenterologica Latinoamericana* 11, 125–132.
- Lotti, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clinical Chemistry* 41, 1814–1818.
- Mesulam, M., Guillozet, A., Shaw, P., 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. *Neuroscience* 110, 627–639.
- Misra, K. K., Choudhury, A., 1975. Experimental infection of *Trypanosoma evansi* (Steel) in rhesus monkey. In: *Proceedings of the 62nd Indian Science Congress Association* 99, p. 167.
- Pereira, M.E., Adams, A.L., Silva, N.S., 2004. 5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicology Letter* 146, 269–274.
- Queiroz, O., Cabello, P.H., Jansen, A.M., 2000. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso–Brazil. *Veterinary Parasitology* 92, 107–118.
- Rodrigues, A., Figuera, R.A., Souza, T.M., Schild, A.L., Soares, M.P., Milano, J., Barros, C.S.L., 2005. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no

- Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 25, 239–249.
- Schalm, O.W., Jain, N.C., Carrol, E.J., 1975. *Veterinary Hematology*, third ed. Lea & Febiger, Philadelphia, p.559.
- Shehu, S.A., Ibrahim, N.D.G., Esievo, K.A.N., Mohammed, G., 2006. Neuraminidase (Sialidase) activity and its role in development of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. *Journal of Applied Sciences* 6, 2779–2783.
- Singh, D.S., 1976. Serum cholinesterase in hepatic disorders. *Journal of the Indian Medical Association* 66, 49–51.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase-new roles for and old actor. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 294–302.
- Taylor, P., Radic, Z., 1994. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34, 281–320.
- Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Zilker, T., Worek, F., 2005. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chemico-Biological Interactions* 157, 345–347.
- Tuntasuvan, D., Mimapan, S., Sarataphan, N., Trongwongsa, L., Intraraksa, R., Luckins, A.G., 2000. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by immunohistochemistry. *Veterinary Parasitology* 87, 223–230.
- Tuntasuvan, D., Sarataphan, N., Nishikawa, H., 1997. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. *Veterinary Parasitology* 73, 357–363.
- Undurti, N.D., 2007. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Medical Science Monitor* 13, 214–221.
- Whittaker, M., 1980. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia* 35, 174–197.
- Wolkmer, P., Da Silva, A.S., Cargnelutti, J.F., Costa, M.M., Traesel, C.K., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2007. Resposta eritropoética de ratos em diferentes graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. *Ciência Rural* 37, 1682–1687.
- Wolkmer, P., Da Silva, A.S., Traesel, C.K., Paim, F.C., Cargnelutti, J.F., Pagnoncelli, M., Picada, M.E., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2009. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology* 165, 41–46.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta* 288, 73–90.

3 ARTIGO II

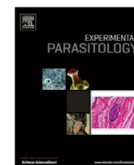
BIOCHEMISTRY DETECTION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN *Trypanosoma evansi* AND POSSIBLE FUNCTIONAL CORRELATIONS

Artigo publicado na revista "Experimental Parasitology"



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Research Brief

Biochemistry detection of acetylcholinesterase activity in *Trypanosoma evansi* and possible functional correlations

Patrícia Wolkmer^{a,*}, Cássia B. da Silva^b, Francine C. Paim^b, Aleksandro S. Da Silva^c, Kaio C.S. Tavares^d, Cícera R. Lazzarotto^d, Heloisa E. Palma^b, Gustavo R. Thomé^a, Luiz C. Milette^d, Maria Rosa C. Schetinger^a, Sonia T.A. Lopes^b, Cinthia M. Mazzanti^a

^a Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^b Department of Small Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

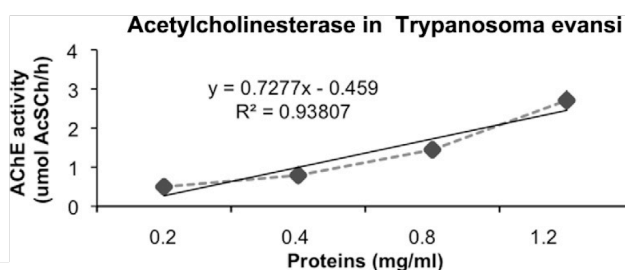
^c Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil

^d Laboratory of Biochemistry of Hemoparasites and Vectors, Universidade Estadual de Santa Catarina, Brazil

HIGHLIGHTS

- ▶ Acetylcholinesterase (AChE) is an important enzyme that hydrolyzes of acetylcholine.
- ▶ AChE is broadly distributed in many species, including parasites.
- ▶ In the present study we could demonstrate, by biochemistry technical, that the *Trypanosoma evansi* expresses the enzyme AChE.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2012
Received in revised form 6 August 2012
Accepted 28 August 2012
Available online 5 September 2012

Keywords:

Trypomastigotes
AChE
Cholinergic

ABSTRACT

Several chemical and immunohistochemical techniques can be used for the detection of acetylcholinesterase (AChE) activity. In this experiment we aimed to detect AChE activity in *Trypanosoma evansi*. For this, the parasites were isolated from the blood of experimentally infected rats using a DEA-cellulose column. Enzymatic activity was determined in trypomastigote forms at 0, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.2 mg/mL of protein concentrations by a standard biochemical protocol. At all concentrations tested, the study showed that *T. evansi* expresses the enzyme AChE and its activity was proportional to the concentration of protein, ranging between 0.64 and 2.70 µmol of AcSch/h. Therefore, we concluded that it is possible to biochemically detect AChE in *T. evansi*, an enzyme that may be associated with vital functions of the parasite and also can be related to chemotherapy treatments, as further discussed in this article.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Trypanosoma evansi is distributed worldwide, infecting domestic and wild animals (Mahmoud and Gray, 1980; Brun et al., 1998; Silva et al., 1995). This intracellular flagellate can be

observed in tissues, blood plasma and body cavity fluids of infected animals leading to an immune response by the host (Sharma et al., 2000). *T. evansi* animals infected develop a range of clinical signs including the increase of body temperature, anemia, loss of physical condition, weakness and neurological dysfunction (Ngeranwa et al., 1993; Wolkmer et al., 2009; Da Silva et al., 2010a). In previous studies, we have demonstrated changes in the cholinergic and purinergic system of rats infected by *T. evansi* (Wolkmer et al., 2010; Da Silva et al., 2010b, 2011a,b). The cholinergic enzyme, acetylcholinesterase (AChE: EC 3.1.1.7) is involved

* Corresponding author. Address: Departamento de Pequenos Animais da UFSM, Faixa de Camobi – Km 9, Campus Universitário, Hospital Veterinário, Sala 103, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8958.
E-mail address: patiwol@hotmail.com (P. Wolkmer).

during neural disease processes and as a part of the host immune response (Wolkmer et al., 2010; Da Silva et al., 2010a; Paim et al., 2011).

The main role of AChE is termination of transmission at cholinergic synapses by rapid hydrolysis of acetylcholine (ACh) (Rosenberry, 1975; Kimura et al., 2003). The action of AChE is not only limited to cholinergic transmission. It has potent effects on cellular adhesion (Johnson and Moore, 1999), neural extension (Layer et al., 1993; Layer and Willbold, 1994) and structural regulation of postsynaptic differentiation (Soreq and Seidman, 2001). The existence of cholinergic anti-inflammatory pathway is well documented (Tayebati et al., 2002; Kawashima and Fujii, 2003; Kimura et al., 2003; Pavlov and Tracey, 2006; Das, 2007). This mechanism is mediated by ACh acting to inhibit the production of tumor necrosis factor, interleukin-1 and macrophage migration inhibitory factor (Borovikova et al., 2000). Signaling of cholinergic anti-inflammatory pathway occurs through the efferent vagus nerve and is initially mediated by nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) on tissue macrophages, which stimulate anti-inflammatory response. Also, AChE is present in lymphocytes regulating immune functions (Kawashima and Fujii, 2003).

Non-neuronal ACh appears to be involved in the regulation of elementary cell functions such as cell mitosis, motion and flagellum activity, as well participating in immune system regulation (Wessler et al., 1998, 2003). The ability of trypanosomes to evade the immune defense mechanism of the host becomes one of the major and puzzling issues in the studies of host–parasite interactions (Zambrano-Villa et al., 2002). The presence of the receptor and some metabolic changes that occur in the parasite after cholinergic stimulation has been reported by Portillo et al. (2011) who demonstrated the presence of nAChR and Mijares et al. (2011) who localized the presence of AChE in glycosomes of *T. evansi*. Acetylcholine has also been detected in many unicellular organisms (including ciliated protozoa). The ubiquity of the cholinergic pathway in the animal kingdom could be part of a mechanism to access intracellular Ca^{2+} via activation of phospholipase C activity, increasing Ca^{2+} concentration (Kimura et al., 2003; Portillo et al., 2011). AChE is involved in multifaceted activities, and serves as a suitable candidate for diagnostic purposes, vaccine development and drug design.

Several chemical and immunohistochemical techniques can be applied for the detection of AChE activity. Biochemical techniques are quick and practical. In this experiment we aimed to measure the AChE activity in *T. evansi* using a biochemical protocol. In addition, we discussed some possibilities of the interaction between the presence of this enzyme in the parasite and the potential relationship with the host.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, tris-(hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Trypanosome strains

Two rats were inoculated intraperitoneally with 0.2 mL of cryopreserved blood containing 10^6 *T. evansi* per microliter. The parasitemia was estimated daily by microscopic examination of blood smears (Da Silva et al., 2009; Wolkmer et al., 2009). Each slide was mounted with blood collected from the tail vein, stained by

the panoptic method, and visualized by optical microscopy. After the 5th day of infection the parasitemia was greater than 100 trypanosomes per microscopic field ($1000\times$). At this time the animals were anesthetized for blood collection, and samples were stored in tubes with anticoagulant.

2.3. Isolation of trypomastigotes forms

Immediately after sample collection trypomastigotes were isolated by chromatography on a Poly-Prep[®] column (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) using DEAE-cellulose resin, according to the technique described by Tavares et al. (2010). The number of parasites purified was measured by counting in a Neubauer chamber. In order to further concentrate the parasites, the samples (2 mL of phosphate-buffered-saline-glucose: PSG + parasite) were centrifuged for 30 min ($14,000g$ at $4\text{ }^\circ\text{C}$). The pelleted trypanosomes were resuspended in Hanks' balanced salt solution (HBSS).

2.4. AChE activity in the parasite

AChE activity in *T. evansi* was obtained by adapting the technique described by Ellman et al. (1961) and modified by Fitzgerald and Costa (1993) used to evaluate the AChE activity in lymphocytes. Briefly, 0.2 mL of samples were added to a solution containing 1.0 mM acetylthiocholine (AcSCh), 0.1 mM, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and 100 mM phosphate buffer (pH 8.0). Immediately before and after incubation for 30 min at $27\text{ }^\circ\text{C}$ the absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. As negative and positive controls HBSS and human lymphocytes were used respectively. Peripheral lymphocytes were isolated using Ficoll Hypaque density gradient as described by Böyum, (1998). AChE was calculated from the quotient between trypanosome AChE activity and protein content and the results were expressed as μmol of AcSCh/h and μmol of AcSCh/h/mg of protein. The experiment was replicated twice and the samples were measured in triplicate.

2.5. Protein determination

Protein concentration of the trypomastigotes was determined by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as a standard. Protein concentrations of the samples were adjusted to provide 0, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.2 mg/mL.

2.6. Ethics committee

This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Rural Science Center of the Federal University of Santa Maria (CCR/UFSM), N^o. 017/2012 in accordance with existing legislation and the Ethical Principles published by the Brazilian College of Animal Experiments (COBEA).

3. Results and discussion

In this study AChE enzyme was detected biochemically in *T. evansi*. The biochemical method used to evaluate the activity of AChE in lymphocytes through hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (Fitzgerald and Costa, 1993), proved to be effective for quantifying the enzymatic activity in the parasite. Fig. 1 shows that increased protein concentration (parasite) resulted in a higher enzymatic activity ($R^2 = 0.91807$). The mean concentration measured was 2.132 ± 0.3 μmol of AcSCh/h/mg of protein, demonstrating that, at all protein concentrations used, the degradation activity of the enzyme was very similar. The reaction did not occur when

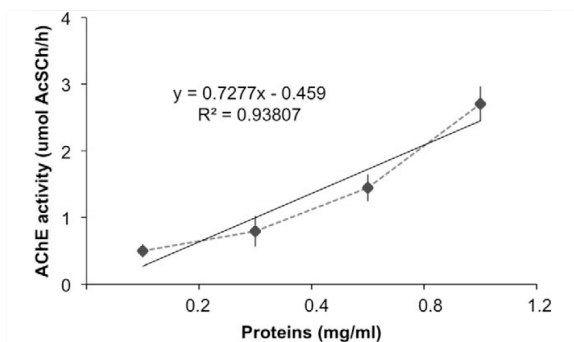


Fig. 1. Biochemical detection of acetylcholinesterase (AChE) in trypanomastigotes forms of *T. evansi*. Relationship between AChE activity and protein concentration of the parasite ($n = 9$).

only HBSS (negative control) was used but enzyme activity was observed when lymphocytes were used (positive control).

AChE is an enzyme broadly distributed in many species, including parasites. Initially it was believed that this enzyme was present only in forms that show motion, such as motile protozoa and hydrozoa, but not in non-motile protozoa or sponges (Seaman and Houlihan, 1951; Karczmar, 2010). The authors suggested that the presence of AChE could be correlated with the motility, since, in nerve activity, the action current is controlled by hydrolysis of ACh by AChE. So, the enzyme is fundamental to the regulation of impulse propagation and thus responsible for flagellar and cilia motion. Researches have however shown that the cholinergic system is also present in non-motile organisms, such as plasmodium and the sponges. In the other hand, there is no evidence that AChE is related to flagellar motion of *Physarum polycephalum* (Jahn and Bovee, 1965). Taking this information together, the possibility arises of a non-neuronal role played by the cholinergic system.

Using a standardized protocol to assess the activity of the enzyme (Ellman et al., 1961 modified by Fitzgerald and Costa, 1993) we were able to detect biochemically the presence of AChE in *T. evansi*, this enzyme has also been demonstrated by ELISA recently (Mijares et al., 2011). Probably, in the parasite, this enzyme is responsible for the regulation of ACh levels. Furthermore, *T. evansi* have other components of cholinergic system including nAChR (Portillo et al., 2011). Within the cell, these receptors mediate activation of phospholipase C activity, resulting in increases in $[Ca^{2+}]$ and inhibition of adenylyl cyclase activity, resulting in decreased cyclic AMP (cAMP) formation (Hulme et al., 1990). Due to its crucial biological role, AChE is the target of a wide repertoire of drugs and poisons, both natural and synthetic. These include organophosphate insecticides and antihelmintics that act as powerful covalent inhibitors of AChE (Levi-Schaffer et al., 1984; Stieger et al., 1986; Soreq and Seidman, 2001; Harder, 2002a,b). nAChR has a wide distribution in the animal kingdom, and its presence in *T. evansi* widens further its distribution in protozoa (Wessler et al., 1998). Cholinergic stimulation of the nAChR is terminated by hydrolysis of ACh by the enzyme. In future studies, it is important to demonstrate ACh within the parasite, as well as the presence of choline acetyltransferase (ChAT) enzyme, which is responsible for the synthesis of ACh from acetyl coenzyme A and choline.

Considering the cholinergic anti-inflammatory pathway, if AChE in *T. evansi* was released under stimulation, the enzyme could be acting as modulator of the host immune system. We have

previously demonstrated alteration of host-AChE activity during parasitic infections (Da Silva et al., 2010a, 2011a; Wolkmer et al., 2010). Parasite-enzymes could interfere with the course of infection by regulation of the immune response to the parasite associated with immune response evasion. The cholinergic system plays a role in the neuro-immune network of mammals with a high degree of integration between cells of the immune system and the cholinergic system (Rinner et al., 1995). This mechanism is regulated by neural signals transmitted via vagus nerve that suppresses the pro-inflammatory cytokine release, specifically via $\alpha 7$ subunit-containing nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$) (Kawashima and Fujii, 2003). ACh acts directly on macrophage and lymphocyte receptors to open a channel in the cell membrane. Binding to ACh results in reduced nuclear factor (NF- κ B) activation, preservation of HMGB1 nuclear localization reduced production of inflammatory cytokines (Das, 2007). Therefore, ACh is partially regulated by autonomic nervous system, and this pathway regulates the release of tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1) and other pro- and anti-inflammatory cytokines from immune cells (Elenkov et al., 2000; Tracey, 2002; Pavlov et al., 2003; Pavlov and Tracey, 2004). Whereas, ACh is an anti-inflammatory molecule (Das, 2007) and parasite AChE could interfere on the levels of ACh on host, changing local and systemic inflammatory events caused by trypanosomes infection, thereby regulating the immune response to the parasite.

In conclusion, the present study evidence that *T. evansi* expresses the enzyme acetylcholinesterase, which probably regulates the concentration of acetylcholine, as it does in mammals. The technique used proves to be adequate for detecting AChE biochemically in the parasite.

References

- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462.
- Böyum, A., 1998. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, isolation on mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 97, 77–89.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brun, R., Hecker, H., Lun, Z.R., 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol.* 79, 95–107.
- Da Silva, A.S., Costa, M.M., Wolkmer, P., Zanette, R.A., Faccio, L., Gressler, L.T., Dorneles, T.E., Santurio, J.M., Lopes, S.T., Monteiro, S.G., 2009. *Trypanosoma evansi*: hematologic changes in experimentally infected cats. *Exp. Parasitol.* 123, 31–34.
- Da Silva, A.S., Spanevello, R., Stefanello, N., Wolkmer, P., Costa, M.M., Zanette, R.A., Lopes, S.T., Santurio, J.M., Schetinger, M.R., Monteiro, S.G., 2010a. Influence of *Trypanosoma evansi* in blood, plasma, and brain cholinesterase of experimentally infected cats. *Res. Vet. Sci.* 88, 281–284.
- Da Silva, A.S., Pierezan, F., Wolkmer, P., Costa, M.M., Oliveira, C.B., Tonin, A.A., Santurio, J.M., Lopes, S.T., Monteiro, S.G., 2010b. Pathological findings associated with experimental infection by *Trypanosoma evansi* in cats. *J. Comp. Pathol.* 142, 170–176.
- Da Silva, A.S., Pimentel, V.C., Jaques, J.A., Wolkmer, P., Tavares, K.C., Lazzarotto, C.R., Miletto, L.C., Schetinger, M.R., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T., Monteiro, S.G., 2011a. Biochemical detection of adenosine deaminase in *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.* 128, 298–300.
- Da Silva, A.S., Monteiro, S.G., Gonçalves, J.F., Spanevello, R., Oliveira, C.B., Costa, M.M., Jaques, J.A., Morsch, V.M., Schetinger, M.R., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T., 2011b. Acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and spinal cord of rats infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* 175, 237–244.
- Das, U.N., 2007. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med. Sci. Monit.* 13, RA214–RA221.
- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., Vizi, E.S., 2000. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 52, 595–638.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Fitzgerald, B.B., Costa, L.G., 1993. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 20, 210–216.
- Harder, A., 2002a. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge and outlook. *Parasitol. Res.* 88, 395–397.
- Harder, A., 2002b. Chemotherapeutic approaches to trematodes (except schistosomes) and cestodes: current level of knowledge and outlook. *Parasitol. Res.* 88, 587–590.
- Hulme, E.C., Birdsall, N.J., Buckley, N.J., 1990. Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 633–673.
- Jahn, T.L., Bovee, E.C., 1965. Movement and locomotion of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 19, 21–58.
- Johnson, G., Moore, S.W., 1999. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 758–762.
- Karczmar, A.G., 2010. Cholinesterases (ChEs) and the cholinergic system in ontogenesis and phylogenesis, and non-classical roles of cholinesterases – a review. *Chem. Biol. Interact.* 187, 34–43.
- Kawashima, K., Fujii, T., 2003. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.* 74, 675–696.
- Kimura, R., Ushiyama, N., Fujii, T., Kawashima, K., 2003. Nicotine-induced Ca²⁺ signaling and down-regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the CEM human leukemic T-cell line. *Life Sci.* 72, 2155–2158.
- Layer, P.G., Weikert, T., Alber, R., 1993. Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res.* 273, 219–226.
- Layer, P.G., Willbold, E., 1994. Cholinesterases in avian neurogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 151, 139–181.
- Levi-Schaffer, F., Tarrab-Hazdai, R., Meshulam, H., Arnon, R., 1984. Effect of phosphonium salts and phosphoranes on the acetylcholinesterase activity and on the viability of *Schistosoma mansoni* parasites. *Int. Immunopharmacol.* 6, 619–627.
- Mahmoud, M.M., Gray, A.R., 1980. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. A review of recent research. *Trop. Anim. Health Prod.* 12, 35–47.
- Mijares, A., Concepcion, J.L., Vielma, J.R., Portillo, R., 2011. Immune detection of acetylcholinesterase in subcellular compartments of *Trypanosoma evansi*. *Parasitol. Res.* 108, 1–5.
- Ngeranwa, J.J., Gathumbi, P.K., Mutiga, E.R., Agumbah, G.J., 1993. Pathogenesis of *Trypanosoma (brucei) evansi* in small East African goats. *Res. Vet. Sci.* 54, 283–289.
- Paim, F.C., Duarte, M.M., Costa, M.M., Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Silva, C.B., Paim, C.B., Franca, R.T., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Krause, A., Lopes, S.T., 2011. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.* 128, 365–370.
- Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2004. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2322–2331.
- Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2006. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochem. Soc. Annu.* 34, 1037–1040.
- Pavlov, V.A., Wang, H., Czura, C.J., Friedman, S.G., Tracey, K.J., 2003. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol. Med.* 9, 125–134.
- Portillo, R., Bruges, G., Delgado, D., Betancourt, M., Mijares, A., 2011. *Trypanosoma evansi*: pharmacological evidence of a nicotinic acetylcholine receptor. *Exp. Parasitol.* 125, 100–105.
- Rinner, I., Felsner, P., Falus, A., Skreiner, E., Kukulansky, T., Globerson, A., Hirokawa, K., Schauenstein, K., 1995. Cholinergic signals to and from the immune system. *Immunol. Lett.* 44, 217–220.
- Rosenberry, T.L., 1975. Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 43, 103–218.
- Seaman, G.R., Houlihan, R.K., 1951. Enzyme systems in *Tetrahymena gelei* S. II. Acetylcholinesterase activity; its relation to motility of the organism and to coordinated ciliary action in general. *J. Cell. Physiol.* 37, 309–321.
- Sharma, D.K., Chauhan, P.P., Agrawal, R.D., 2000. Interaction between *Trypanosoma evansi* and *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet. Parasitol.* 92, 261–267.
- Silva, R.A., Arosemena, N.A., Herrera, H.M., Sahib, C.A., Ferreira, M.S., 1995. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Matogrossense, Brazil. *Vet. Parasitol.* 60, 167–171.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294–302.
- Stieger, A., Cardoso de Almeida, M.L., Blatter, M.C., Brodbeck, U., Bordier, C., 1986. The membrane-anchoring systems of vertebrate acetylcholinesterase and variant surface glycoproteins of African trypanosomes share a common antigenic determinant. *FEBS Lett.* 199, 182–186.
- Tavares, K.C., Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Monteiro, S.G., Miletti, L.C., 2010. Cryopreservation of *Trypanosoma evansi* after DEAE-cellulose purification: evaluation of infective parameters. *Res. Vet. Sci.* 90, 257–259.
- Tayebati, S.K., El-Assouad, D., Ricci, A., Amenta, F., 2002. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 132, 147–155.
- Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853–859.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R., Kirkpatrick, C.J., 2003. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci.* 72, 2055–2061.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., Racke, K., 1998. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol. Ther.* 77, 59–79.
- Wolkmer, P., Da Silva, A.S., Traesel, C.K., Paim, F.C., Cargnelutti, J.F., Pagnoncelli, M., Picada, M.E., Monteiro, S.G., Lopes, S.T., 2009. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* 165, 41–46.
- Wolkmer, P., Lopes, S.T., Franciscato, C., da Silva, A.S., Traesel, C.K., Siqueira, L.C., Pereira, M.E., Monteiro, S.G., Mazzanti, C.M., 2010. *Trypanosoma evansi*: cholinesterase activity in acutely infected Wistar rats. *Exp. Parasitol.* 125, 251–255.
- Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J.C., Ortiz-Ortiz, L., 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 18, 272–278.

4 ARTIGO III

**PRE-TREATMENT WITH CURCUMIN MODULATES ACETYLCHOLINESTERASE
ACTIVITY AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN RATS INFECTED WITH
*Trypanosoma evansi***

Artigo publicado na revista "Parasitology international"



Pre-treatment with curcumin modulates acetylcholinesterase activity and proinflammatory cytokines in rats infected with *Trypanosoma evansi*

Patrícia Wolkmer^{a,*}, Cássia B. da Silva^b, Francine C. Paim^b, Marta M.M.F. Duarte^c, Verônica Castro^b, Heloisa E. Palma^b, Raqueli T. França^b, Diandra V. Felin^b, Lucas C. Siqueira^d, Sonia T.A. Lopes^b, Maria Rosa C. Schetinger^a, Silvia G. Monteiro^e, Cinthia M. Mazzanti^a

^a Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^b Department of Small Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^c Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, Brazil

^d Laboratory of Animal Reproduction, Universidade de Cruz Alta, Brazil

^e Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 August 2012

Received in revised form 20 November 2012

Accepted 21 November 2012

Available online 29 November 2012

Keywords:

T. evansi

Cytokines

Proinflammatory

IL-10

AChE

ABSTRACT

The potent activity against Trypanosomes and health beneficial effects of curcumin (Cur) has been demonstrated in various experimental models. In this study, we evaluated the *in vivo* effect of Cur as trypanocide and as potential anti-inflammatory agent, through the evaluation of immunomodulatory mechanisms in rats infected with *Trypanosoma evansi*. Daily oral Cur was administered at doses of 0, 20 or 60 mg/kg as preventive treatment (30 and 15 days pre infection) and as treatment (post infection). The treatment of the groups continued until the day of euthanasia. Fifteen days after inoculation, parasitemia, plasma proinflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6), anti-inflammatory cytokines (IL-10) and blood acetylcholinesterase activity (AChE) were analyzed. Pretreatment with Cur reduced parasitemia and lethality. Cur inhibited AChE activity and improved immunological response by cytokines proinflammatory, fundamental during *T. evansi* infection. We found that Cur is not so important as an antitrypanosomal activity but as immunomodulator agent. These findings reveal that the preventive use of Cur stimulates anti-inflammatory mechanisms, reducing an excessive inflammatory response.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Trypanosomes (genus *Trypanosoma*) are flagellate protozoa, blood parasites transmitted mainly by hematophagous insects. The infection by *Trypanosoma evansi* presents global distribution and affects several animal species [1–4]. Our research group has collected evidence that *T. evansi* infection is characterized by an overwhelming production of proinflammatory cytokines, such as interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6) [5]. The production of proinflammatory cytokines is beneficial and protects the organism against infections. However, an excessive production of these cytokines can cause organ damage or failure and lethal systemic inflammation that can be more dangerous than the original infection or injury [6–10] as related to anemia development in *T. evansi* infected animals [5].

Recent studies indicate that the vagus nerve can modulate the immune response and control inflammation through an “anti-inflammatory

pathway” [11–17]. The release of acetylcholine (ACh), the main neurotransmitter of the vagus nerve, modulates the production and release of proinflammatory cytokines through acetylcholine receptors. Acetylcholinesterase (AChE) is the enzyme that catalyzes the hydrolysis of ACh, a fundamental process in regulating the cholinergic system [18–20]. Therefore, AChE has been used as a marker of inflammatory process [12,21–23].

Alternative treatments against trypanosomes have been surveyed, mainly by the high rate of drug resistance and collateral effects of routine therapy [24–27]. Curcumin (Cur) (1,7-bis (4-hidroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione), obtained from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae family) rhizomes, has been widely used in indigenous medicine for centuries and has shown a variety of physiological and pharmacological activities [28–30]. Interestingly, researches showed that Cur inhibits the production of various cytokines, including TNF- α and IL-1 [31–33]. Furthermore, recent studies reported that Cur (natural and analogs) has trypanocidal activity against trypanosome species *in vitro* [34].

Therefore, it is important to evaluate the potential preventive and curative effects of Cur in trypanosome infected animals, as an alternative for disease control in endemic areas. In this study we examined the effect *in vivo* of oral Cur on prevention and treatment of *T. evansi* infection in rats. The immunomodulatory role of Cur in inflammatory

* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria Departamento de Pequenos Animais da UFSM, Av Roraima, Campus Universitário, 97105-900, Hospital Veterinário, Sala 103, Santa Maria – RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8958.

E-mail address: patiwol@hotmail.com (P. Wolkmer).

response was also analyzed. That was evaluated by AChE activity and of pro- and anti-inflammatory cytokines in the infection.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Acetylthiocholine iodide, 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris (hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie brilliant blue G, and Cur (curcumin > 80%; curcuminoid content > 94%) were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of highest purity.

2.2. Animals

Male Wistar rats (90–110 days) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. They were housed five to a cage on a natural day/night cycle at a temperature of 21 °C with free access to water and standard chow *ad libitum*. This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Rural Science Center of the Federal University of Santa Maria (CCR/UFSM), No. 017/2012 in accordance with existing legislation and the Ethical Principles published by the Brazilian College of Animal Experiments (COBEA).

2.3. Experimental design

The experimental procedure was divided in two sets of experiments. In both, Cur was diluted with corn oil and administered by oral gavage, daily, not exceeding 0.1 ml/kg body weight. Treatments were administrated once a day (8–9 h a.m.). In the first set, the animals were randomly divided into four groups (5 rats in each group): Control (no gavage); Vehicle (corn oil); Cur 20 mg/kg body weight; and Cur 60 mg/kg body weight, during 45 days.

In the second experimental set, the animals were divided into eight groups (8 rats in each group) where one was kept as an uninfected control group (UC) that received only vehicle (corn oil) and seven trypanosome-infected groups:

- positive control (TRYP) (vehicle);
- pretreatment with Cur 20 mg/kg body weight for 30 days;
- pretreatment with Cur 60 mg/kg body weight for 30 days;
- pretreatment with Cur 20 mg/kg body weight for 15 days;
- pretreatment with Cur 60 mg/kg body weight for 15 days;
- treatment after inoculation with Cur 20 mg/kg body weight for 15 days;
- treatment after inoculation with Cur 60 mg/kg body weight for 15 days.

The choice of Cur dosages was made based in previous studies that described beneficial results (data not shown). All rats were infected by *T. evansi* at same day. The treatment of the groups continued for 15 days after inoculation.

2.4. Etiological agent and inoculation

The etiological agent isolate used here was obtained from a naturally infected dog, maintained in liquid nitrogen at the laboratory of Dr. Sílvia G. Monteiro (Brazil). The rats were inoculated intraperitoneally with 0.2 ml of blood containing 10^6 parasites. The control rats received 0.2 ml of physiological solution by the same route.

2.5. Parasitemia estimation

The presence and degree of parasitemia were determined daily for each animal by blood smear examination. The blood films were stained with Romanovsky and visualized under optical microscope

(1000×) stipulating the average number of trypanosomes in 10 homogeneous random fields (considering erythrocytes).

2.6. Collection and preparation of blood samples

Fifteen days post inoculation (pi) the animals were anesthetized with isoflurane for blood collection by cardiac puncture. Blood samples were stored in tubes with ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA 10%) and the samples were diluted 1:100 (v/v) in lysis solution (0.1 mmol/l potassium/sodium phosphate buffer containing 0.03% Triton X-100) to determine AChE activity in blood. Four ml were allowed to clot to obtain serum for measuring the cytokine levels. Serum was harvested from blood samples after centrifugation of clotted blood at 3500 g for 10 min and stored at –80 °C until analysis.

2.7. Cytokines

Cytokine quantification was assessed by ELISA using commercial kits for rat IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-10 (eBIO-SCIENCE, San Diego, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 96 well microplates were sensitized with the primary antibody at room temperature (RT) for 30 min and then the sample was added and incubated (37 °C temperature, for 30 min). After washing, the secondary antibody conjugated with peroxidase was added and incubated. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader.

2.8. Determination of AChE activity in whole blood

The AChE enzymatic assay in whole blood was determined by the method described by Ellman et al. [35] as modified by Worek et al. [36]. The incubation system was composed of sodium phosphate buffer 0.063 mM pH 7.4, DTNB 0.316 mM and 0.5 ml of the hemolyzed blood. The increase in absorbance was registered over 2 min at 436 nm. The specific activity of whole blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and hemoglobin concentration and the results were expressed as mU/l mol Hb.

2.9. Statistical analysis

The results are presented as the mean (\pm SEM). Differences among the means were compared by the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test when appropriated, using the SPSS program. P values lower than 5% were considered to be statistically different.

3. Results

3.1. Parasitemia

T. evansi could be detected in the blood of all infected rats from 24 to 48 h after inoculation (1–2 parasites/field at 1000×). Throughout the entire experimental period, the parasite circulation levels were significantly lower in all Cur pretreated groups ($P < 0.05$). There was no significant difference at groups that received Cur only after inoculation (treatment groups) compared to TRYP group (Fig. 1A), except for the highest dose (60 mg/kg) just on day 9 pi, which demonstrated a reduction in the number of circulating parasites. These results of parasite levels are reflected in the survival rate (Fig. 1B). Independent of dose used (20 or 60 mg/kg), animals from Cur pre-treated groups presented higher survival rates than the other infected groups that received Cur.

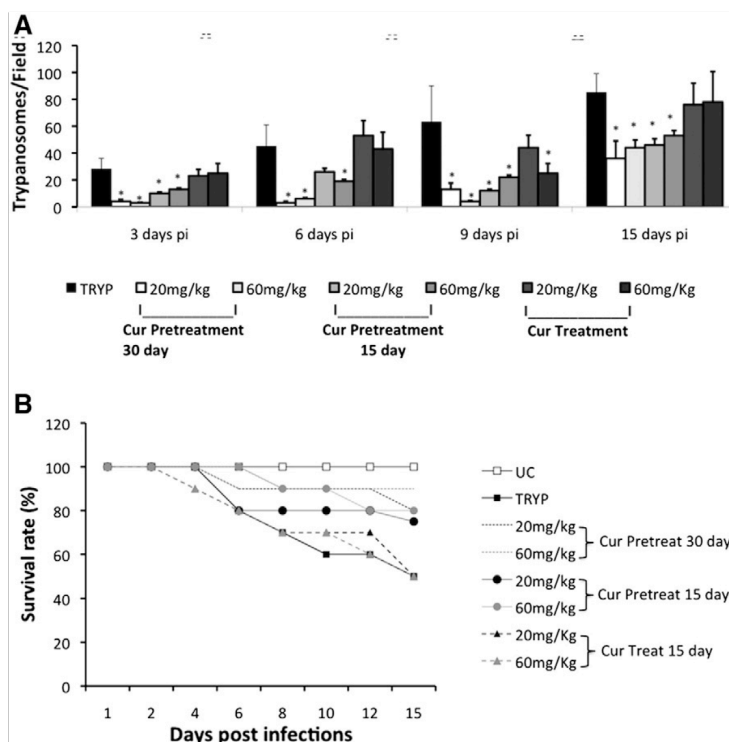


Fig. 1. Effect of oral curcumin pre-treatment and treatment on the parasitemia (A) and survival rate (B) of *Trypanosoma evansi* infected rats. Curcumin was administered daily by oral gavage. All rats were infected by *T. evansi* at same day. The treatment of the groups continued until the day of euthanasia (15 days after inoculation). (UC) Uninfected control group that received the vehicle (corn oil); (TRYP) infected control group that received the vehicle (corn oil); (Cur) curcumin; (Pretreat) pretreatment; (Treat) treatment; (pi) post infection. Values represent mean \pm SE. *represents statistical difference between TRYP and groups that receive curcumin ($P < 0.05$, $n = 8-4$ per group); at 1000 \times magnification.

3.2. Cytokine profile

To investigate the immunomodulation effects of Cur, IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α and INF- γ were quantified in serum 15 days post-infection using sandwich ELISA. The oral administration of Cur *per se* (20 and 60 mg/kg body weight) did not interfere on level of cytokines ($P > 0.05$) (Table 1). The infection by *T. evansi* increased all cytokine levels when compared with the TRYP group to UC group ($P < 0.01$) (Fig. 2). However, when Cur was used as a pretreatment for 30 and 15 days, at both doses (20 and 60 mg/kg body weight), there was a reduction in levels of IL-1, IL-6 TNF- α and INF- γ (Fig. 2) compared with the TRYP group. Additionally, the treatment post infection using the dose of 60 mg/kg also reduced the levels of IL-6 and INF- γ .

However, pretreatment with 60 mg/kg of Cur for 30 days prior to infection of animals increased IL-10 levels ($P < 0.05$). The other Cur treatments did not significantly affect the IL-10 level (Fig. 3A).

3.3. Activity of AChE in whole blood

The Cur treatment *per se* (20 and 60 mg/kg of body weight), in the first experimental set, did not affect AChE activity ($P > 0.05$) (Table 1).

The AChE blood activity was lower at group infected by *T. evansi* than negative control group (vehicle) ($P < 0.05$). Moreover, when Cur (60 mg/kg) was given as pretreatment to the infected animals, there was a greater reduction of enzyme activity (Fig. 3B; $P < 0.05$).

4. Discussion

Our research group has been investigating alternative treatments for therapy of infections caused by *T. evansi* [37–39]. The main reason for these investigations is the fact that the ordinary chemotherapy with diminazene aceturate, dipropionate imidocarb, and suramim, commonly used in the treatment of trypanosomiasis, is ineffective in

Table 1

Effect of oral administration of vehicle (corn oil) and curcumin (20 or 60 mg/kg) daily, during 45 days on cytokines and AChE activity (mean \pm S.E.M.) of rats ($n = 5$).

Groups	IL-1 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	INF- γ (ug/ml)	AChE (mU/1 mol Hb)
Control (no gavage)	55.57 \pm 7.49	67.57 \pm 8.45	78.71 \pm 5.55	110.3 \pm 5.09	136.2 \pm 5.7	39.97 \pm 3.08
Vehicle	49.35 \pm 4.48	59.33 \pm 5.42	80.33 \pm 3.01	89.54 \pm 3.49	118.5 \pm 7.9	37.38 \pm 2.46
Cur 20	53.25 \pm 5.95	62.74 \pm 3.83	87.02 \pm 5.92	103.9 \pm 3.91	109.3 \pm 9.1	40.93 \pm 5.01
Cur 60	52.95 \pm 6.48	64.83 \pm 5.07	85.64 \pm 8.43	111.5 \pm 5.65	124.5 \pm 8.8	42.28 \pm 4.75

Different from all groups ($P < 0.05$). (IL-1) interleukin-1; (IL-6) interleukin-6; (IL-10) interleukin-10; (TNF- α) tumor necrosis factor alpha; (INF- γ) interferon-gamma and (AChE) acetylcholinesterase.

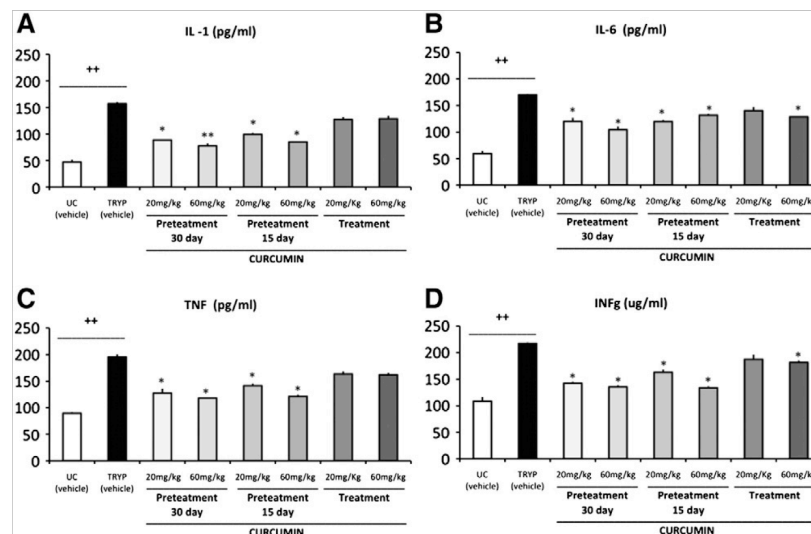


Fig. 2. Effect of oral curcumin pre-treatment and treatment on the proinflammatory cytokines of *T. evansi*-infection in Wistar rats. (A) Interleukin-1; (B) interleukin-6; (C) tumor necrosis factor alpha; (D) interferon-gamma. Curcumin was administered daily by oral gavage. All rats were infected by *T. evansi* at same day. The treatment of the groups continued until the day of euthanasia (15 days after inoculation). (UC) Uninfected control group that received the vehicle (corn oil); (TRYP) infected control group that received the vehicle (corn oil) and curcumin in the doses of 20 and 60 mg/kg. Values represent mean \pm SEM. ** represents statistical difference between UC and TRYP groups ($P < 0.001$); * represents statistical difference between TRYP and groups that receive curcumin ($P < 0.05$, $n = 4-8$ per group).

many cases [24–27]. These drugs have limited effectiveness probably because they do not cross the hematoencephalic barrier, a refuge area to the flagellate [40]. Therefore, research on herbal medicine, immunotherapy and new chemical compounds are needed in attempting to combat *T. evansi*.

The first experimental set was performed to confirm that the use of Cur *per se* and the vehicle (corn oil) does not affect the parameters analyzed. As demonstrated in Table 1 there was no difference among groups ($P > 0.05$). Studies have consistently shown that Cur is relatively nontoxic. Studies using Cur at a dose of 2000 mg/kg revealed no mortalities in mice. Cur was administered to Wistar rats, guinea pigs and monkeys of both sexes at a dose of 300 mg/kg; no pathological or behavioral abnormalities or lethality was observed. Human clinical trials also indicate that Cur is nontoxic when administered up to 10 g/day [28,29,32,33].

The present study investigated the potential application of Cur to prevent or treat, by immunomodulatory mechanism the infections of rats by *T. evansi*. This is based in recent research that have demonstrated that the natural curcuminoids exhibited antitrypanosomal activity *in vitro*. The results of parasitemia analysis presented in Fig. 1 indicate that the Cur pre-treatment (20 or 60 mg/kg) was effective in decreasing parasitemia. However, despite the several researches about Cur as a trypanocidal agent [34,41,42], the Cur treatment post-infection was not effective in reducing the parasite load ($P > 0.05$). The pre-treatment resulted in a slightly higher survival rate. At the doses tested, only the treatment (post infection) was not able to protect infected rats (Fig. 1B). Furthermore, the group that received the highest doses of Cur pre-treatment, for the longer period (60 mg/kg/30 days pi), presented lower mortality.

To elucidate the mechanism induced by Cur in *T. evansi* infection response, this study analyzed the effect of Cur on the main cytokines associated with the regulation of immune responses against the parasite. In Fig. 2, it is possible to observe increased cytokine levels in *T. evansi* infection (TRYP group) compared to uninfected control group (UC). In trypanosomiasis the lymphocytes produce interferon-gamma (IFN- γ) in response to parasite antigens. IFN- γ activates the macrophages increasing their ability to destroy phagocytosed organisms. The activated

macrophages induce the production of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF- α , thus playing an important role in the replication process of the parasite as well as in the host [5,43–46].

Recent studies have demonstrated that the cholinergic anti-inflammatory pathway mechanism regulates the inhibition, the activation of macrophages and the release of cytokines [6,17]. AChE is the enzyme that catalyzes the hydrolysis of the ACh, a fundamental process in regulating the cholinergic system [12,19,23]. As shown in Fig. 3B AChE activity on TRYP group was lower than on UC group, reflecting higher levels of free ACh. Accordingly, ACh is an anti-inflammatory molecule that interacts with nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) on tissue macrophages, to inhibit the release of TNF- α , IL-1, HMGB1 and other cytokines [6,12]. These facts show the important role of AChE in the modulation of the inflammatory response in rats by *T. evansi* infection. In addition, many studies from our laboratory have demonstrated that AChE has an important role in neurotransmission and immunomodulation, and alterations in these activities have been observed in various diseases suggesting an association between AChE and these physiological and pathological parameters [47–51].

The results presented in Fig. 2 indicate that the pre-infection use of Cur, as preventive treatment, resulted in suppression of proinflammatory cytokines when compared to TRYP group. Only the dosage of 60 mg/kg used as pretreatment, increased anti-inflammatory cytokine IL-10 levels and reduced the activity of AChE (Fig. 3), indicating higher levels of free ACh. Therefore, ACh induced the release of humoral anti-inflammatory hormones or cytokines, as demonstrated by IL-10 that regulated negative feedback mechanisms and inhibited proinflammatory cytokine production.

The importance of endogenous IL-10 production in preventing parasite infections was demonstrated in IL-10 knock out (KO) mice infected with an avirulent strain of *Toxoplasma gondii*. The mice IL-10 KO have enhanced mortality (with no evidence of enhanced parasite proliferation) associated to high IFN- γ , IL-12, and TNF- α production; *in vivo* depletion of CD4+ cells protected IL-10 KO mice from mortality [52]. Cur enhanced IL-10 production and IFN receptor (IFNAR) subunit 1 and 2 expression. Cur also can increase IFN- α -induced IL-10 and IFNAR1

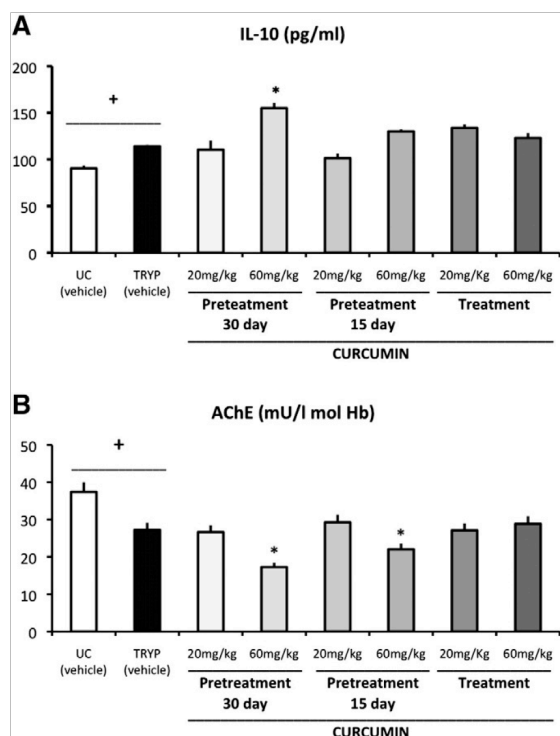


Fig. 3. Effect of oral curcumin pre-treatment and treatment on the interleukin-10 (A) and acetylcholinesterase activity in total blood (B) of *Trypanosoma evansi* infected rats. Curcumin was administered daily by oral gavage. All rats were infected by *T. evansi* at same day. The treatment of the groups continued until the day of euthanasia (15 days after inoculation). (UC) Uninfected control group that received the vehicle (corn oil); (TRYP) infected control group that received the vehicle (corn oil) and curcumin in the doses of 20 and 60 mg/kg. Values represent mean \pm SEM. * represents statistical difference between UC and TRYP groups and * represents statistical difference between TRYP and groups that receive curcumin ($P < 0.05$, $n = 8-4$ per group).

expression. These researchers also demonstrated that pretreatment with Cur decreased IFN- α -induced IFNAR2 expression and failed to modify the level of IFN- α -induced phospho-STAT4 activation. These findings support the distinct roles of Cur when T cells get activated with different stimuli and also confirmed the multifarious targets of Cur in the activated T cells [53].

With these results we suggest that Cur is not so relevant by its antitrypanosomal activity but it is more important as an immunomodulatory product. For centuries it has been known that Cur exhibits anti-inflammatory activity; this agent has been shown to regulate numerous transcription factors, cytokines, protein kinases, adhesion molecules, redox status and enzymes that have been linked to inflammation [28,29,31–33,41,54]. The use of Cur as an anti-inflammatory product could be important since excessive production of cytokines can be dangerous to host as reported associated with anemia and cause of morbidity and mortality in several diseases, including *T. evansi* infection [5,8,10].

Taken together, the results of the present study provide *in vivo* evidence to support the hypothesis that Cur induces immunomodulatory effects altering inflammatory parameters such as cytokine releasing and peripheral acetylcholinesterase inhibitory activities. It is important to highlight the ability of Cur to increase anti-inflammatory cytokine IL-10 levels ameliorating the inflammatory response, potentially deleterious, when the animals are infected by *T. evansi*. We can also suggest that Cur may be used as a feed supplement in trypanosomiasis endemic

areas, since Cur pre-treatment reduced the parasite load and the mortality in rats infected by *T. evansi*.

Acknowledgments

The authors thank FAPERGS and CAPES agencies for supporting this research.

References

- [1] Mahmoud MM, Gray AR. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. A review of recent research. *Tropical Animal Health and Production* 1980;12:35–47.
- [2] Brun R, Hecker H, Lun ZR. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Veterinary Parasitology* 1998;79:95–107.
- [3] Silva RA, Arosemena NA, Herrera HM, Sahib CA, Ferreira MS. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. *Veterinary Parasitology* 1995;60:167–71.
- [4] Dargantes AP, Mercado RT, Dobson RJ, Reid SA. Estimating the impact of *Trypanosoma evansi* infection (surra) on buffalo population dynamics in southern Philippines using data from cross-sectional surveys. *International Journal of Parasitology* 2009;39:1109–14.
- [5] Paim FC, Duarte MM, Costa MM, Da Silva AS, Wolkmer P, Silva CB, et al. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology* 2011;128:365–70.
- [6] Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853–9.
- [7] Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Review of Medicine* 1994;45:491–503.
- [8] Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annual Review of Cell Biology* 1993;9:317–43.
- [9] Tracey KJ, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. *Current Opinion in Immunology* 1989;1:454–61.
- [10] van der Poll T, Lowry SF. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock* 1995;3:1–12.
- [11] Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nature Reviews Immunology* 2009;9:418–28.
- [12] Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Medical Science Monitor* 2007;13:RA214–21.
- [13] Pavlov VA, Tracey KJ. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochemical Society Transactions* 2006;34:1037–40.
- [14] Pavlov VA, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior, and Immunity* 2005;19:493–9.
- [15] Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005;4:673–84.
- [16] Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine* 2003;9:125–34.
- [17] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458–62.
- [18] Fitzgerald BB, Costa LG. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 1993;20:210–6.
- [19] Rosenberry TL. Acetylcholinesterase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 1975;43:103–218.
- [20] Kimura R, Ushiyama N, Fujii T, Kawashima K. Nicotine-induced Ca^{2+} signaling and down-regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the CEM human leukemic T-cell line. *Life Sciences* 2003;72:2155–8.
- [21] da Silva CB, Wolkmer P, Da Silva AS, Paim FC, Tonin AA, Castro VS, et al. Cholinesterases as markers of the inflammatory process in rats infected with *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. *Journal of Medical Microbiology* 2012;61:278–4.
- [22] Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *Journal of Pharmacological Sciences* 2008;106:167–73.
- [23] Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* 2001;2:294–302.
- [24] Liao D, Shen J. Studies of quinapyramine-resistance of *Trypanosoma brucei evansi* in China. *Acta Tropica* 2010;116:173–7.
- [25] Gillingwater K, Buscher P, Brun R. Establishment of a panel of reference *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* strains for drug screening. *Veterinary Parasitology* 2007;148:114–21.
- [26] Witola WH, Inoue N, Ohashi K, Onuma M. RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in *Trypanosoma evansi* confers resistance to diminazene aceturate. *Experimental Parasitology* 2004;107:47–57.
- [27] Zhou J, Shen J, Liao D, Zhou Y, Lin J. Resistance to drug by different isolates *Trypanosoma evansi* in China. *Acta Tropica* 2004;90:271–5.
- [28] Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sciences* 2006;78:2081–7.
- [29] Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica* 1991;57:1–7.
- [30] Jaques JA, Rezer JF, Carvalho FB, da Rosa MM, Gutierrez JM, Goncalves JF, et al. Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. *Physiology and Behavior* 2012;106:664–9.

- [31] Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kappaB, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007;1770:989–96.
- [32] Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacological Research* 1999;39:41–7.
- [33] Ammon HP, Safayhi H, Mack T, Sabieraj J. Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boswellic acids. *Journal of Ethnopharmacology* 1993;38:113–9.
- [34] Changtam C, de Koning HP, Ibrahim H, Sajid MS, Gould MK, Suksamrarn A. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010;45:941–56.
- [35] Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 1961;7:88–95.
- [36] Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta* 1999;288:73–90.
- [37] Gressler LT, Da Silva AS, Machado G, Rosa LD, Dorneles F, Oliveira MS, et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. *Research in Veterinary Science* 2012;93(3):1314–7.
- [38] Da Silva AS, Wolkmer P, Nunes JT, Duck MR, Oliveira CB, Gressler LT, et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to cordycepin. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2011;65:220–3.
- [39] Da Silva AS, Fanfa VR, Otto MA, Gressler LT, Tavares KC, Lazzarotto CR, et al. Susceptibility of mice to *Trypanosoma evansi* treated with human plasma containing different concentrations of apolipoprotein L-1. *The Korean Journal of Parasitology* 2011;49:427–30.
- [40] Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, Barros CS. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. *Veterinary Pathology* 2009;46:251–8.
- [41] Nose M, Koide T, Ogihara Y, Yabu Y, Ohta N. Trypanocidal effects of curcumin in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1998;21:643–5.
- [42] Nagaiyothi F, Zhao D, Weiss LM, Tanowitz HB. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research* 2012;110:2491–9.
- [43] Gao W, Pereira MA. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Parasitology* 2002;32:167–70.
- [44] Magez S, Radwanska M, Drennan M, Fick L, Baral TN, Allie N, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated *Trypanosoma congolense* parasite killing. *Journal of Infectious Diseases* 2007;196:954–62.
- [45] Magez S, Radwanska M, Drennan M, Fick L, Baral TN, Brombacher F, et al. Interferon-gamma and nitric oxide in combination with antibodies are key protective host immune factors during *Trypanosoma congolense* Tc13 Infections. *Journal of Infectious Diseases* 2006;193:1575–83.
- [46] Truyens C, Angelo-Barrios A, Torrico F, Van Damme J, Heremans H, Carlier Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Infection and Immunity* 1994;62:692–6.
- [47] da Silva AS, Monteiro SG, Goncalves JF, Spanevello R, Oliveira CB, Costa MM, et al. Acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and spinal cord of rats infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology* 2011;175:237–44.
- [48] Da Silva AS, Monteiro SG, Goncalves JF, Spanevello R, Schmatz R, Oliveira CB, et al. *Trypanosoma evansi*: immune response and acetylcholinesterase activity in lymphocytes from infected rats. *Experimental Parasitology* 2011;127:475–80.
- [49] da Silva CB, Wolkmer P, Da Silva AS, Paim FC, Tonin AA, Castro VS, et al. Cholinesterases as markers of the inflammatory process in rats infected with *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. *Journal of Medical Microbiology* 2011;61:278–84.
- [50] Wolkmer P, Lopes ST, Franciscato C, da Silva AS, Traesel CK, Siqueira LC, et al. *Trypanosoma evansi*: cholinesterase activity in acutely infected Wistar rats. *Experimental Parasitology* 2010;125:251–5.
- [51] Da Silva AS, Spanevello R, Stefanello N, Wolkmer P, Costa MM, Zanette RA, et al. Influence of *Trypanosoma evansi* in blood, plasma, and brain cholinesterase of experimentally infected cats. *Research in Veterinary Science* 2010;88:281–4.
- [52] Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kuhn R, et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of Immunology* 1996;157:798–805.
- [53] Fahey AJ, Adrian Robins R, Constantinescu CS. Curcumin modulation of IFN-beta and IL-12 signalling and cytokine induction in human T cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007;11:1129–37.
- [54] Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009;41:40–59.

5 MANUSCRITO I

***Trypanosoma evansi* INFECTION IMPAIRS MEMORY, INCREASED ANXIETY
BEHAVIOUR AND ALTERS NEUROCHEMICAL PARAMETERS IN RATS**

Manuscrito aceito na revista "Parasitology"

1 ***Trypanosoma evansi* infection impairs memory, increased anxiety behaviour**
2 **and alters neurochemical parameters in rats**

3

4

5 Patrícia Wolkmer^{*ab}; Francine C. Paim^b; Cássia B. da Silva^b; Bibiana M. Gai^a;

6 Fabiano B. Carvalho^a; Ana Cristina G. de Souza^a; Michelle M. da Rosa^a;

7 Aleksandro S. da Silva^c; Paula R. Pereira^b; Sonia T. A. Lopes^b; Cristina W.

8 Nogueira^a; Maribel A. Rubin^a; Silvia G. Monteiro^c; Cinthia M. Mazzanti^{ab}

9

10

11 ^a Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

12 ^b Department of Small Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

13 ^c Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa
14 Maria, Brazil.

15

16

17 • Correspondence and reprints. Address: Universidade Federal de Santa Maria,
18 Departamento de Pequenos Animais da UFSM. Av Roraima, Campus
19 Universitário, 97105-900, Hospital Veterinário, Sala 103, Santa Maria – RS,
20 Brasil. Fax: +55 55 3220 8958.

21 • E-mail address: patiwol@hotmail.com (Wolkmer, P.)

22

23

23 Abstract

24

25 The aim of this study was to investigate neurochemical and enzymatic changes in
26 rats infected with *Trypanosoma evansi*, and their interference in the cognitive
27 parameters. Behavioral assessment (assessment of cognitive performance),
28 evaluation of cerebral L-[³H]glutamate uptake, acetylcholinesterase (AChE) activity
29 and Ca⁺² and Na⁺, K⁺-ATPase activity were evaluated at 5 and 30 days post infection
30 (pi). This study demonstrates a cognitive impairment in rats infected with *T. evansi*.
31 At day 5 pi memory deficit was demonstrated by the inhibitory avoidance test. With
32 the chronicity of the disease (day 30 pi) animals showed anxiety symptoms. It is
33 possible the inhibition of cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity, AChE and synaptosomal
34 glutamate uptake are involved in cognitive impairment in infected rats by *T. evansi*.
35 The understanding of cerebral host-parasite relationship may shed some light on the
36 cryptic symptoms of animals and possibly human infection where patients often
37 present with other CNS disorders.

38

39 Keywords: trypanosomes; Ca⁺² ATPase; Na⁺, K⁺ ATPase; cognitive dysfunction;
40 memory, anxiety; glutamate uptake.

41

42

43

44

45

46

46 1. Introduction

47

48 Surra is an important disease in a wide geographic region caused by
49 *Trypanosoma evansi*, and infects mainly camels, cattle, buffalos, horses and some
50 wild animals (Brun *et al.*, 1998; al-Qarawi *et al.*, 2001; Berlin *et al.*, 2009; Habila *et*
51 *al.*, 2012). The parasite is spread by mechanical transmission of infected blood
52 through hematophagous insects such as tabanid flies (Brun *et al.*, 1998; Herrera *et*
53 *al.*, 2004). Animals infected with *T. evansi* develop anemia (Dargie *et al.*, 1979;
54 Gutierrez *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2009a; da Silva *et al.*, 2009; Wolkmer *et al.*,
55 2009; Paim *et al.*, 2011b; Habila *et al.*, 2012) and neurological signs in the final stage
56 of the disease (Tuntasuvan *et al.*, 1997; Tuntasuvan *et al.*, 2000; Berlin *et al.*, 2009).
57 In the first report of *T. evansi* infection in humans, sensory deficit, disorientation,
58 agitation and aggression were described (Joshi *et al.*, 2005).

59 Neurological signs might be the result of necrotizing panencephalitis or
60 meningoencephalitis (Berlin *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009), but also, due to
61 alteration in the actions of neurotransmitters (Da Silva *et al.*, 2011a; Paim *et al.*,
62 2011a). The mechanism leading to the onset of neurologic signs in trypanosomiasis
63 is not completely elucidated, however, in recent studies, we have demonstrated that
64 infection by *T. evansi* affects blood and brain acetylcholinesterase (AChE) activity on
65 hosts (Da Silva *et al.*, 2010b; Wolkmer *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2011). Therefore,
66 the study of the activity of this enzyme in animals infected with *T. evansi* might give
67 us some insight on neurotransmission and could, consequently, associate this
68 enzyme with cognitive dysfunction observed in this disorder.

69 It is believed that changes in the cholinergic system activity have a key role in
70 clinical signs developed by animals infected with the parasite. However,

71 neurotransmission is a dynamic process, supported by a permanent cycle of
72 neurotransmitter release, over a neurotransmitter response to stimulation. Little is
73 known about the effect of infection by *T. evansi* in the neurochemical activity of the
74 hosts.

75 The glutamate is considered to be the major mediator of excitatory signals in
76 the mammalian central nervous system (CNS) and is probably involved in most
77 aspects of normal brain function including cognition, memory and learning (Fonnum,
78 1984; Headley and Grillner, 1990; Greenamyre and Porter, 1994; Danbolt, 2001).
79 Despite of their important role in neurotransmission, the toxicity caused by
80 overstimulation of glutamate receptors, "excitotoxicity", has been hypothesized to be
81 a final common pathway of neuronal death in both acute and chronic neurological
82 disease (Choi, 1988; Beal, 1992a, b; Rothman and Olney, 1995; Abril *et al.*, 2004).

83 The enzymes Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{+2} -ATPase are embedded in the cell
84 membrane, responsible for the generation of the membrane potential through the
85 active transport of sodium, potassium and calcium ions in the CNS necessary to
86 maintain neuronal excitability (Erecinska and Silver, 1994). These ions are involved
87 in many neuronal signaling processes such as the control of presynaptic
88 neurotransmitter release, regulation of membrane excitability and directly, as a
89 second and third messenger (Smith *et al.*, 1983; Gandhi and Ross, 1988). The
90 changes in the neuronal homeostasis in animals infected by *T. evansi* could be
91 involved in disturbances of cognitive functions (Hartmann *et al.*, 1994).

92 Therefore, the present investigation was carried out to determine if infection in
93 rats with *T. evansi* induces neurochemical and enzymatic changes and if these are
94 correlated with neurological signs. These changes can be evaluated by animal
95 performance in various behavioral tests that can identify, for example, the

96 coordination, the state of anxiety and memory of the animals, which are the final
97 manifestations of neural functions (Genn et al., 2003; Lalonde et al., 2004; Lapiz-
98 Bluhm et al., 2008).

99

100

101 **2. Materials and methods**

102 **2.1. Reagents**

103 [³H]Glutamic acid (1 Ci/mL) was purchased from Amersham Biosciences.
104 Acetylthiocholine iodide, 5,5'dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris
105 (hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie brilliant blue G, were obtained from
106 Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical
107 grade and obtained from standard commercial suppliers.

108

109 **2.2. Animals**

110 Male Wistar rats (90–110 days) from the Central Animal House of the
111 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. They
112 were housed five to a cage on a natural day/night cycle at a temperature of 21°C with
113 free access to water and standard chow *ad libitum*. This study was approved by the
114 Ethics and Animal Welfare Committee of the Rural Science Center of the Federal
115 University of Santa Maria (CCR/UFSM), N°. 017/2012 in accordance with existing
116 legislation and the Ethical Principles published by the Brazilian College of Animal
117 Experiments (COBEA).

118

119 **2.3. Experimental design**

120 Twenty-two rats were used in each treatment group, that consisted of *T*.

121 *evansi* infected groups (T) and control group (C; non-infected rats). To obtain the
122 total of 22 infected rats, a total of 40 rats were inoculated (a mortality rate of up to
123 50% can be expected). On days 5 (C5, T5) and 30 (C30, T30) pi 11 animals per
124 group were euthanasia with isoflurane in a gas chamber. Behavioral assessments
125 were performance 24h pre-euthanasia.

126

127 **2.4. Inoculation**

128 The rats were inoculated intraperitoneal with 0.2 ml of blood containing 10^6
129 parasites. The control rats received 0.2 ml of physiological solution by the same
130 route. The etiological agent isolate used here is from a naturally infected dog, and
131 maintained in liquid nitrogen at the laboratory from Dr. Silvia G. Monteiro (Brazil).

132

133

134 **2.5. Parasitemia estimation**

135 The presence and degree of parasitemia were determined daily for each
136 animal by blood smear examination. The blood films were stained with Romanowsky
137 (Diff-Quick) and visualized under optical microscope (1000x) determining the
138 average number of trypanosomes in 10 homogeneous random fields (considering
139 erythrocytes).

140

141 **2.6. Behavioral assessment - assessment of cognitive performance**

142 During the behavioral study, only one animal was tested at a time. The
143 behavioral experiments were performed on the 4th and 29th day pi, when Inhibitory
144 avoidance test was always preformed at first. Behavioral assessment was performed
145 in triplicate and was evaluated by three different analyzers.

146 *2.6.1. Inhibitory avoidance*

147

148 Animals were subjected to training and test in a step-down inhibitory
149 avoidance apparatus according to Guerra et al (2006). Briefly, the rats were
150 subjected to a single training session in a step-down inhibitory avoidance apparatus,
151 which consisted of a 25 × 25 × 35 cm box with a grid floor whose left portion was
152 covered by a 7 × 25-cm platform, 2.5 cm high. The rat was placed gently on the
153 platform facing the rear left corner, and when the rat stepped down with all four paws
154 on the grid, a 2-s 0.4-mA shock was applied to the grid. Retention test took place in
155 the same apparatus 24 h later. Test step-down latency was taken as a measure of
156 retention, and a cut-off time of 300 s was established.

157

158 *2.6.2. Open field*

159

160 Immediately after the inhibitory avoidance test session, the animals were
161 transferred to an open-field that was a 40×45 cm arena surrounded by 50 cm high
162 walls, made of plywood. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by
163 black lines. Animals were placed in the rear left corner and left to explore the field
164 freely for 5 min. Line crossings and rearings were counted. This test was carried out
165 to identify motor disabilities, which might influence inhibitory avoidance performance
166 at testing.

167

168 *2.6.3. Elevated plus maze test*

169

170 Anxiolytic-like behavior was evaluated using the task of the elevated plus

171 maze as previously described (Frussa-Filho et al., 1999; Rubin et al., 2004). The
172 apparatus consists of a wooden structure raised to 50 cm from the floor. This
173 apparatus is composed of 4 arms of the same size, with two closed-arms (walls 40
174 cm) and two open-arms. Initially, the animals were placed on the central platform of
175 the maze in front an open arm. The animal had 5 minutes to explore the apparatus,
176 and the time spent and the number of entries in open and closed-arms were
177 recorded. The behavior parameters are expressed in % of number of entries and %
178 of time spent in the open and closed arms. The apparatus was thoroughly cleaned
179 with 30% ethanol between each session.

180

181 2.6.4. *Foot shock sensitivity test*

182

183 Reaction to shock was evaluated in the same apparatus used for inhibitory
184 avoidance, except that the platform was removed. The modified “up and down”
185 method (Rubin et al., 2004) was used to determine the flinch and jump thresholds in
186 naive animals. Animals were placed on the grid and allowed a 3 min adaptation
187 period before starting a series of shocks (1s) delivered at 10 s intervals. Shock
188 intensities ranged from 0.1 to 0.5 mA in 0.1 mA increments. The adjustments in
189 shock intensity were made in accordance to each animal's response. The intensity
190 was raised on one unit when no response occurred and lowered by one unit when a
191 response was made. A flinch response was defined as withdrawal of one paw from
192 the grid floor, and a jump response was defined as withdrawal of three or four paws.
193 Two measurements of each threshold (flinch and/or jump) were made, and the mean
194 of each score was calculated for each animal.

195

196 **2.7. Uptake assay**

197

198 L-[³H]glutamate uptake assays were carried out in slices of cortex and
199 hippocampus of rats according to the method described by Schweigert et al., (2005).
200 Animals (3 rats per group) were decapitated and brains were immediately removed
201 and submerged in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137
202 NaCl, 0.63 Na₂HPO₄, 4.17 NaHCO₃, 5.36 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 1.26 CaCl₂, 0.41
203 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, and 1.11 glucose, adjusted to pH 7.2. Cortex and hippocampus
204 were dissected, and coronal slices (0.4 mm) were obtained using a Mc Illwain tissue
205 chopper. Slices were transferred to multiwell dishes and washed with 1.0 ml HBSS.
206 After 10 min of pre-incubation, the uptake assay was performed by adding 13.3 μM
207 (hippocampus) and 6.6 μM (cortex) L-[³H]glutamate in 300 μl HBSS at 37 °C.
208 Incubation was terminated after 5 min (hippocampus) or 7 min (cortex) by three ice-
209 cold washes with 1 ml HBSS immediately followed by the addition of 0.5 M NaOH,
210 which was kept overnight. An aliquot of 10 μl was removed to protein determination.
211 Unspecific uptake was measured using the same protocol described above, with
212 differences in temperature (4 °C) and media (choline chloride instead of sodium
213 chloride). Na⁺-dependent uptake was considered as the difference between the total
214 uptake and the unspecific uptake. Uptakes were performed in triplicate. Incorporated
215 radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (Wallac 1409). Results
216 were expressed as pM of L-[³H]glutamate uptake/mg protein/min.

217

218 **2.8. Biochemical assessment**

219 Biochemical tests were conducted 24 h after the last behavioral test. The
220 animals were anesthetized and euthanized by decapitation (8 rats per group). The

221 brain structures were removed, separated into cerebral cortex, striatum and
222 hippocampus and placed in a solution of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, on ice. The brain
223 structures were homogenized in a glass potter in Tris-HCl solution and an aliquot
224 was stored for ATPases assay. The homogenate (10%, w/v) was then centrifuged at
225 1,000×g for 15 min and the supernatant so formed was stored at - 80 °C until
226 assessment of acetylcholinesterase activity. Protein was determined by the
227 Coomassie blue method, using bovine serum albumin as standard solution (Bradford,
228 1976).

229

230 *2.8.1. Estimation of acetylcholinesterase (AChE) activity.*

231 The AchE activity was assessed by the method described by Ellman et al.
232 (1961). The reaction mixture (2 ml final volume) contained 100 mM K⁺-phosphate
233 buffer, pH 7.5 and 1 mM 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB). The method is based
234 on the appearance of a yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid-nitrobenzoic, measured by
235 absorbance at 412 nm during 2-min incubation at 25°C. The enzyme (40–50 µg of
236 protein) was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM
237 acetylthiocholine iodide (AcSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and
238 the enzyme activity was expressed in µM AcSCh/h/mg of protein.

239

240 *2.8.2 Na⁺, K⁺-ATPase activity measurement*

241

242 Na⁺, K⁺-ATPase activity was measured as previously described (Wyse et al.,
243 2000) with minor modifications (Carvalho et al., 2012). Briefly, the assay medium
244 consisted of (in mM) 30 Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.1 EDTA, 50 NaCl, 5 KCl, 6 MgCl₂
245 and 50 µg of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM), in a final volume

246 of 350 μL . The reaction was started by adding adenosine triphosphate to a final
247 concentration of 3 mM. After 30 min at 37°C, the reaction was stopped by adding 70
248 μL of 50% (w/v) trichloroacetic acid. Saturated substrate concentrations were used,
249 and reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in
250 the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate
251 (Pi) released was quantified by the colorimetric method, as previously described
252 (Fiske and Subbarow, 1927), using KH_2PO_4 as reference standard. Specific Na^+ , K^+ -
253 ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from
254 the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nM of Pi/min/mg of
255 protein.

256

257 2.8.3 Ca^{+2} -ATPase activity measurement

258

259 Ca^{+2} -ATPase activity was measured as previously described (Rohn et al.,
260 1993) with minor modifications (Trevisan et al., 2009). Briefly, the assay medium
261 consisted of (in mM) 30 Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.1 EGTA, 3 MgCl_2 and 100 μg of
262 protein in the presence or absence of 0.4 CaCl_2 , in a final volume of 200 μL . The
263 reaction was started by adding adenosine triphosphate to a final concentration of 3
264 mM. After 60 min at 37°C, the reaction was stopped by adding 70 μL of 50% (w/v)
265 trichloroacetic acid. Saturated substrate concentrations were used, and reaction was
266 linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for non-
267 enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was
268 quantified by the colorimetric method, as previously described (Fiske and Subbarow,
269 1927), using KH_2PO_4 as reference standard. The Ca^{+2} -ATPase activity was
270 determined by subtracting the activity measured in the presence of Ca^{+2} from that

271 determined in the absence of Ca^{+2} (no added Ca^{+2} plus 0.1 mM EGTA) and
272 expressed in nM of Pi/min/mg of protein.

273

274

275 **2.9. Statistical analysis**

276 Statistical analysis of training and test step-down latencies was carried out by
277 the Kruskal–Wallis test (nonparametric two-way ANOVA) and results median \pm
278 interquartile. Foot shock sensitivity was analyzed by unpaired t test. For the
279 neurochemical analyses, the statistical significance was assessed by analysis of
280 variance (ANOVA) and post hoc Duncan's test was carried out when appropriated. A
281 value of $P < 0.05$ was considered to be significant.

282

283 **3. Results**

284 **3.1 Parasitemia**

285 *T. evansi* was detected in peripheral blood of all infected rats between 24 and
286 48 hours after inoculation. Parasitemia increased progressively in most animals until
287 day 5 pi, when the first peak of parasitemia was observed (mean of 59 ± 20
288 trypanosomes/field) and the group T5 was formed. Six days pi, a reduction in
289 parasitemia was observed in the rats from subgroup T30, ranging from zero to 10
290 parasites/field until day 25 pi. On day 30 pi the second peak of parasitemia was
291 detected, with a mean of 46 ± 22 trypanosomes/field. The control animals remained
292 clinically healthy throughout the experimental period.

293

294

295

296 **3.2. Behavioral tests**

297

298 *3.2.1. Memory and learning - Inhibitory avoidance*

299 Fig. 1 shows the effect of *T. evansi* infection on step-down latencies. Statistical
300 analysis of testing showed difference between groups in the step-down latencies
301 during training trial in *T. evansi* infected rats at 5 days pi (T5) ($P < 0.05$). Group T5
302 showed a memory deficit comparing with control (animals not infected - C5).
303 However, despite of reduction in the step-down latencies, there were no significant
304 differences between groups at 30 days pi (T30). Statistical analysis of training
305 showed no significant difference between groups.

306 Since motivational disparities in the training session may account for differences in
307 inhibitory avoidance at testing, experiments were performed to assess whether
308 trypanosomes affect shock threshold, or locomotor ability of the animals. Statistical
309 analysis of open-field data (one-way ANOVA) revealed that *T. evansi* infected rats
310 did not change the number of crossing ($P > 0.05$) or rearing ($P > 0.05$) responses in a
311 subsequent open-field test session, suggesting that the infection does not cause
312 gross motor disabilities at testing. Moreover, infected rats did not change foot shock
313 sensitivity, as demonstrated by the similar flinch (unpaired *t* test, $P = 0.45$) and jump
314 (unpaired *t* test, $P = 0.57$) thresholds exhibited by the animals. These data suggest
315 that *T. evansi* infection does not cause motor disabilities or modify foot shock
316 sensitivity (data not shown).

317

318 *3.2.2. Anxiolytic activity - elevated plus-maze test of rats*

319 At day 30 pi, rats infected by *T. evansi* (T30) decreased the percentage of time on
320 open arms ($P < 0.01$; Fig. 2), and increased the closed arms entries when compared

321 whit control group (C30). There were no significant differences between groups at
322 day 5 pi (T5 vs C5).

323

324 3.2.3. *L*-[³H]Glutamate uptake

325 *L*-[³H]Glutamate uptake was decreased in cerebral cortex (Fig. 3) of T30 group
326 when compared to control group C30 ($P < 0.05$). No significant change was observed
327 in *L*-[³H]glutamate uptake in both cortex and hippocampus in rats on day 5 pi from *T.*
328 *evansi* group.

329

330 3.3. Activity of AChE in brain

331

332 The results obtained for AChE activity in cerebral cortex, striatum and
333 hippocampus are presented in Fig. 4. As observed, AChE activity was significantly
334 increased in rats infected by *T. evansi* at day 5 pi (T5, $P < 0.05$) compared to the
335 control group (C5). However, at day 30 pi the AChE activity in the T30 group
336 decreased significantly in Striatum ($P < 0.05$) and showed a tendency to reduction on
337 cerebral cortex and hippocampus when compared to C30 group ($P < 0.058$).

338

339 3.4. ATPases

340 *T. evansi* infection decreases the Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex,
341 striatum and hippocampus homogenates. Fig. 5 shows that rats infected have a
342 significant inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity at day 5 pi in cerebral cortex and
343 hippocampus ($P < 0.05$); and at day 30 pi have a significant inhibition in all structures
344 assessed ($P < 0.05$).

345 The total activity of the Ca⁺²-ATPase in the homogenate was higher in

346 cerebral cortex and hippocampus of rats infected by *T. evansi*. This increase was
347 significant on day 5 pi in cerebral cortex and hippocampus and day 30 pi in the
348 cerebral cortex ($P < 0.05$; Fig. 6). The striatum showed no variation.

349

350

351 **4. Discussion**

352

353 This study was conducted to test the contribution of *T. evansi* infection on
354 behavior changes and its relationship with enzymes and glutamate in CNS. The
355 course of infection has a traditional variation in animals regarding the response to the
356 degree of parasitemia (Wolkmer *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2009a; Da Silva *et al.*,
357 2009b; Wolkmer *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2010a; Da Silva *et al.*, 2011b; Da Silva
358 *et al.*, 2011c; Franca *et al.*, 2011; Paim *et al.*, 2011a; Wolkmer *et al.*, 2012a; Wolkmer
359 *et al.*, 2012b). As expected, *T. evansi* was pathogenic to rats and led to a high
360 parasitemia at day 4-6 pi. After this period, a reduction in parasitemia was observed,
361 resembling the presentation of chronic disease at the end of the experimental period.

362 The inhibitory avoidance test is a classic behavioral test with a strong aversive
363 component and is used to evaluate learning and memory in rats and mice (Cahill *et al.*,
364 1986). In our study, we showed for the first time that *T. evansi* infection
365 decreases step-down latency in the inhibitory avoidance test at day 5 pi in rats
366 (Figure 1, C5 group), but did not change locomotor activity, suggesting learning and
367 memory impairment of these animals in early infection. Signals of behavior changes
368 have been reported in animals and human infected by *T. evansi* (Tuntasuvan *et al.*,
369 1997; Tuntasuvan *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2005; Wolkmer *et al.*, 2007; da Silva *et al.*,
370 2011; Da Silva *et al.*, 2011b). Regardless these findings, the involvement of CNS

371 in infection is widely discussed, because brain lesions are rarely observed. Some
372 authors have reported the appearance of lesions in the brain and the presence of the
373 parasite (Berlin et al., 2009; Rodrigues et al., 2009), which can probably lead to or be
374 result of neurochemical changes in infected animals. We previously showed no
375 histological abnormalities in CNS sections of rats infected with *T. evansi*, at days 5,
376 15, 30 pi. Lesions in CNS were only observed after 150 pi, and, it was determined
377 that posterior member paralysis is a consequence of lesions at muscular and
378 peripheral nerve system (Da Silva et al., 2012a). The abnormalities observed during
379 behavioral tests probably indicate the progression of clinical disease as a result of
380 neurochemical dysfunction.

381 The importance of the cholinergic system in learning and memory processes
382 is undeniable, and thus, changes on AChE activity, as well as in the acetylcholine
383 neurotransmitter levels, are associated with cognitive deficits (Das et al., 2005a; Das
384 et al., 2005b). In this study, we found increased AChE activity in all cerebral
385 structures of the *T. evansi* group on day 5 pi. This could be the result of decreasing in
386 membrane-bound Na^+ , K^+ -ATPase concentration, which modifies ion homeostasis
387 and leads to an increase in Ca^{+2} and Na^+ levels within the cell. The concurrent
388 augment of Ca^{+2} and Na^+ concentrations causes a hyperpolarization of neuronal cell
389 membrane and consequently the release of more neurotransmitters such as
390 acetylcholine (ACh). We believe the increased AChE activity might be a
391 compensatory response to these biochemical events. Activation of AChE leads to a
392 rapid degradation of ACh, an important neurotransmitter associated with learning and
393 memory, suggesting that *T. evansi* can promote a dysfunction in the synapse,
394 affecting the modulation of cholinergic neurotransmission.

395 Therefore, studies have shown that Na^+ , K^+ -ATPase might play a relevant role

396 in neuronal and synaptic plasticity (Brunelli et al., 1997; Glushchenko and Izvarina,
397 1997; Scuri et al., 2007) and mediate the modulation of learning and memory
398 (Brunelli et al., 1997; Wyse et al., 2004; Moseley et al., 2007). Our results
399 demonstrated that *T. evansi* infection decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral
400 cortex and hippocampus at day 5 pi. The inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity and
401 expression has been associated in rats with learning and memory impairment of
402 different behavioral tasks (dos Reis et al., 2002; Moseley et al., 2007). This evidence
403 corroborates our results that animals infected with *T. evansi* showed memory deficits,
404 possibly due to changes in the Na⁺, K⁺-ATPase and AChE activities.

405 Also, on day 5 pi occurs an increase in brain Ca⁺²-ATPase activity in rats
406 infected by *T. evansi* that may increase the intracellular Ca⁺², because the enzyme
407 participates in Ca⁺² sequestration in cells (Kraus-Friedmann, 1990; Hartmann et al.,
408 1994; Hanahisa and Yamaguchi, 1998). The increase of Ca⁺²-ATPase activity may
409 raise calcium content in brain tissues. This may have a pathophysiological impact in
410 brain function and disturbances of cognitive functions (Magnoni et al., 1991;
411 Hartmann et al., 1994). *T. evansi* infection increases NTPDase activity (ATP and
412 ADP as substrate) in the cerebral cortex (Oliveira et al., 2011; Da Silva et al., 2012b).
413 In this study, was found increased ATP concentration in serum and cerebral cortex.
414 The increase in ATP level was correlated to the inflammatory response and
415 neurotoxicity, since it is an important neurotransmitter (Edwards et al., 1992; Agresti
416 et al., 2005). In *T. evansi* infection the increased enzymatic activity may be
417 associated with the elevated release of ATP (Oliveira et al., 2011; Da Silva et al.,
418 2012b), which promotes an increase in the levels of intracellular calcium mediated by
419 P2X receptors, and this event could represent a significant damage to the cells

420 (Edwards et al., 1992). Consequently, the disturbance of brain Ca^{+2} homeostasis
421 may play a pivotal role in brain disease.

422 On the other hand, different neurochemical parameters and behavior changes
423 occur with *T. evansi* infected rats at day 30 pi. With the chronicity of the disease,
424 decrease step-down latency in the inhibitory avoidance test was not significant ($P <$
425 0.6), but rats entered the open arm of the elevated maze less frequently and spent
426 less time in it, that indicate an anxiogenic-like behavior in infected animals.

427 On day 30 pi was observed lower glutamate uptake in the cerebral cortex
428 slices of rats, and normal parameters in the hippocampus slices. Considering
429 glutamate uptake by astrocytes is the main process involved in pathophysiological
430 neuroprotection against glutamatergic excitotoxicity, by reducing the extracellular
431 glutamate concentrations below toxic levels, this inhibitory effect caused by *T. evansi*
432 suggests that infection has excitotoxic properties in cerebral cortex. In addition, it is
433 possible that the reduction in glutamate uptake is mediated by the reduction in Na^{+} ,
434 K^{+} -ATPase activity caused by *T. evansi*, leading to increased extracellular glutamate
435 concentrations and promoting excitotoxicity. Thus, a reduction in glutamate uptake
436 and Na^{+} , K^{+} -ATPase activity may act synergistically and cooperate to induce brain
437 damage in animals infected by this protozoon.

438 It is important to note that the inhibited glutamate uptake (mechanism that
439 removes glutamate from the extracellular fluid) leads to an increase in extracellular
440 glutamate levels (Danbolt, 2001). Considering glutamate as the major mediator of
441 excitatory signals and that it is probably involved in most aspects of normal brain
442 function including cognition, memory and learning, (Fonnum, 1984; Collingridge and
443 Lester, 1989; Headley and Grillner, 1990) the inhibited glutamate uptake could be,
444 temporarily, improving the memory in animals infected by *T. evansi* on day 30 pi.

445 An increase of glutamate content in the synaptic cleft can activate glutamate
446 receptors, including the NMDA receptor. The Ca^{+2} currents of NMDA receptor are
447 responsible for production of nitric oxide (NO) by nitric oxide synthase in neurons
448 (Sattler *et al.*, 1999; Prast and Philippu, 2001). Our research group has demonstrated
449 that infection by *T. evansi* increases NO in cerebral cortex and hippocampus of rats
450 20 days after infection (Paim *et al.*, 2011a). It has been shown that nitric oxide can
451 inhibit the activity of the enzyme Na^+ , K^+ -ATPase, either directly by the action of
452 reactive species, or indirectly through cGMP / PKG pathways signaling (Boldyrev *et*
453 *al.*, 2003; Boldyrev *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2012). One possible mechanism
454 related to the decrease of Na^+ , K^+ -ATPase activity in *T. evansi* infected rats is the
455 increase of NO content (Paim *et al.*, 2011a).

456 Neurotransmitter systems have an integrated of communication system in the
457 brain. *T. evansi* infection could affect multiple neurotransmitter systems to influence
458 behavior. The AChE activity measured in CNS has been extensively studied not only
459 because it is involved in the cholinergic neurotransmission (Soreq and Seidman,
460 2001; Silman and Sussman, 2005) but also because the deleterious consequences
461 of its inhibition (Lotti, 1995), and its action as therapeutic target in neurodegenerative
462 diseases (Rakonczay, 2003). Herein and previous studies, we demonstrate that *T.*
463 *evansi* infection increasing the AChE activity on day 30 pi influences cholinesterases,
464 as indicated by changes in the responses of the cholinergic system. This changes
465 could be interfering with cholinergic function and result in disruption of memory and
466 cognitive performance in animals.

467 In conclusion, the present study establishes a cognitive impairment in rats
468 infected with *T. evansi*. Memory deficit was demonstrated by the performance of
469 these animals by inhibitory avoidance test. With the chronicity of the disease animals

470 show anxiety symptoms. The inhibition of cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity, AChE
471 and synaptosomal glutamate uptake could be involved in *T. evansi* cognitive
472 impairment. Additional investigations are necessary to determine the neurochemical
473 mechanisms involved in the effect of *T. evansi* on neurotransmitter systems.

474

475 **5. Acknowledgments.**

476

477 The authors thank **FAPERGS** and **CAPES** agencies for supporting this
478 research.

479

480

481 **References**

482

483 Abril, C., Engels, M., Liman, A., Hilbe, M., Albini, S., Franchini, M., Suter, M. and
484 Ackermann, M. (2004). Both viral and host factors contribute to neurovirulence
485 of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *J Virol*,
486 **78**, 3644-3653.

487 Agresti, C., Meomartini, M. E., Amadio, S., Ambrosini, E., Volonte, C., Aloisi, F. and
488 Visentin, S. (2005). ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration,
489 proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors.
490 *Brain Res Brain Res Rev*, **48**, 157-165.

- 491 Al-Qarawi, A. A., Abdel-Rahman, H. and Elmougy, S. A. (2001). Impairment in the
492 pituitary-thyroid axis of the *Camelus dromedarius* infected with *Trypanosoma*
493 *evansi*. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **108**, 172-174.
- 494 Beal, M. F. (1992a). Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J*,
495 **6**, 3338-3344.
- 496 Beal, M. F. (1992b). Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr Opin*
497 *Neurobiol*, **2**, 657-662.
- 498 Berlin, D., Loeb, E. and Baneth, G. (2009). Disseminated central nervous system
499 disease caused by *Trypanosoma evansi* in a horse. *Vet Parasitol*, **161**, 316-
500 319.
- 501 Boldyrev, A., Bulygina, E., Carpenter, D. and Schoner, W. (2003). Glutamate
502 receptors communicate with Na⁺/K⁺-ATPase in rat cerebellum granule cells:
503 demonstration of differences in the action of several metabotropic and
504 ionotropic glutamate agonists on intracellular reactive oxygen species and the
505 sodium pump. *J Mol Neurosci*, **21**, 213-222.
- 506 Boldyrev, A., Bulygina, E., Gerassimova, O., Lyapina, L. and Schoner, W. (2004).
507 Functional relationship between Na/K-ATPase and NMDA-receptors in rat
508 cerebellum granule cells. *Biochemistry (Mosc)*, **69**, 429-434.
- 509 Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of
510 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
511 *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

- 512 Brun, R., Hecker, H. and Lun, Z. R. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*:
513 distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet*
514 *Parasitol*, **79**, 95-107.
- 515 Brunelli, M., Garcia-Gil, M., Mozzachiodi, R., Scuri, R. and Zaccardi, M. L. (1997).
516 Neurobiological principles of learning and memory. *Arch Ital Biol*, **135**, 15-36.
- 517 Cahill, L., Bironi, J. and Izquierdo, I. (1986). Retrograde memory enhancement by
518 diazepam: its relation to anterograde amnesia, and some clinical implications.
519 *Psychopharmacology (Berl)*, **90**, 554-556.
- 520 Carvalho, F. B., Mello, C. F., Marisco, P. C., Tonello, R., Girardi, B. A., Ferreira, J.,
521 Oliveira, M. S. and Rubin, M. A. (2012). Spermidine decreases Na(+),K(+)-
522 ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the
523 hippocampus of rats. *Eur J Pharmacol*, **684**, 79-86.
- 524 Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.
525 *Neuron*, **1**, 623-634.
- 526 Collingridge, G. L. and Lester, R. A. (1989). Excitatory amino acid receptors in the
527 vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev*, **41**, 143-210.
- 528 Da Silva, A. S., Belle, L. P., Bitencourt, P. E., Perez, H. A., Thome, G. R., Costa, M.
529 M., Oliveira, C. B., Teixeira, M. M., Moretto, M. B., Mazzanti, C. M., Lopes, S.
530 T. and Monteiro, S. G. (2011a). *Trypanosoma evansi*: adenosine deaminase
531 activity in the brain of infected rats. *Exp Parasitol*, **127**, 173-177.
- 532 Da Silva, A. S., Costa, M. M., Wolkmer, P., Zanette, R. A., Faccio, L., Gressler, L. T.,
533 Dorneles, T. E., Santurio, J. M., Lopes, S. T. and Monteiro, S. G. (2009a).

- 534 Trypanosoma evansi: hematologic changes in experimentally infected cats.
535 *Exp Parasitol*, **123**, 31-34.
- 536 Da Silva, A. S., Hoehne, L., Tonin, A. A., Zanette, R. A., Wolkmer, P., Costa, M. M.,
537 Moraes, D. P., Flores, E. M., Santurio, J. M., Lopes, S. T. and Monteiro, S. G.
538 (2009b). Trypanosoma evansi: levels of copper, iron and zinc in the
539 bloodstream of infected cats. *Exp Parasitol*, **123**, 35-38.
- 540 Da Silva, A. S., Monteiro, S. G., Goncalves, J. F., Spanevello, R., Oliveira, C. B.,
541 Costa, M. M., Jaques, J. A., Morsch, V. M., Schetinger, M. R., Mazzanti, C. M.
542 and Lopes, S. T. (2011). Acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in
543 the brain and spinal cord of rats infected with Trypanosoma evansi. *Vet*
544 *Parasitol*, **175**, 237-244.
- 545 Da Silva, A. S., Oliveira, C. B., Bertoncheli, C. M., Santos, R. P., Beckmann, D. V.,
546 Wolkmer, P., Gressler, L. T., Tonin, A. A., Graca, D. L., Mazzanti, A., Lopes,
547 S. T. and Monteiro, S. G. (2011b). Clinical signs and histopathology of brain,
548 spinal cord and muscle of the pelvic limb of rats experimentally infected with
549 Trypanosoma evansi. *Pathol Res Pract*, **208**, 39-44.
- 550 Da Silva, A. S., Oliveira, C. B., Bertoncheli, C. M., Santos, R. P., Beckmann, D. V.,
551 Wolkmer, P., Gressler, L. T., Tonin, A. A., Graca, D. L., Mazzanti, A., Lopes,
552 S. T. and Monteiro, S. G. (2012a). Clinical signs and histopathology of brain,
553 spinal cord and muscle of the pelvic limb of rats experimentally infected with
554 Trypanosoma evansi. *Pathol Res Pract*, **208**, 39-44.
- 555 Da Silva, A. S., Oliveira, C. B., Rosa, L. D., Leal, C. A., Da Cruz, R. C., Thome, G.
556 R., Athayde, M. L., Schetinger, M. R., Monteiro, S. G. and Lopes, S. T.
557 (2012b). Influence of Trypanosoma evansi in adenine nucleotides and

- 558 nucleoside concentration in serum and cerebral cortex of infected rats. *Exp*
559 *Parasitol*, **131**, 80-84.
- 560 Da Silva, A. S., Pierezan, F., Wolkmer, P., Costa, M. M., Oliveiro, C. B., Tonin, A. A.,
561 Santurio, J. M., Lopes, S. T. and Monteiro, S. G. (2010a). Pathological
562 findings associated with experimental infection by *Trypanosoma evansi* in
563 cats. *J Comp Pathol*, **142**, 170-176.
- 564 Da Silva, A. S., Pimentel, V. C., Jaques, J. A., Wolkmer, P., Tavares, K. C.,
565 Lazzarotto, C. R., Miletti, L. C., Schetinger, M. R., Mazzanti, C. M., Lopes, S.
566 T. and Monteiro, S. G. (2011c). Biochemical detection of adenosine
567 deaminase in *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol*, **128**, 298-300.
- 568 Da Silva, A. S., Spanevello, R., Stefanello, N., Wolkmer, P., Costa, M. M., Zanette, R.
569 A., Lopes, S. T., Santurio, J. M., Schetinger, M. R. and Monteiro, S. G.
570 (2010b). Influence of *Trypanosoma evansi* in blood, plasma, and brain
571 cholinesterase of experimentally infected cats. *Res Vet Sci*, **88**, 281-284.
- 572 Da Silva, A. S., Wolkmer, P., Machado Costa, M., Paim, F., Belmonte Oliveira, C.,
573 Adriel Zanette, R., Morais Santurio, J., Dos Anjos Lopes, S. T. and Gonzalez
574 Monteiro, S. (2009). Lipid peroxidation in cats experimentally infected with
575 *Trypanosoma evansi*. *Parasitol Res*, **106**, 157-161.
- 576 Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, **65**, 1-105.
- 577 Dargie, J. D., Murray, P. K., Murray, M., Grimshaw, W. R. and McIntyre, W. I. (1979).
578 Bovine trypanosomiasis: the red cell kinetics of ndama and Zebu cattle
579 infected with *Trypanosoma congolense*. *Parasitology*, **78**, 271-286.

- 580 Das, A., Dikshit, M. and Nath, C. (2005a). Role of molecular isoforms of
581 acetylcholinesterase in learning and memory functions. *Pharmacol Biochem*
582 *Behav*, **81**, 89-99.
- 583 Das, A., Rai, D., Dikshit, M., Palit, G. and Nath, C. (2005b). Nature of stress:
584 differential effects on brain acetylcholinesterase activity and memory in rats.
585 *Life Sci*, **77**, 2299-2311.
- 586 Dos Reis, E. A., De Oliveira, L. S., Lamers, M. L., Netto, C. A. and Wyse, A. T.
587 (2002). Arginine administration inhibits hippocampal Na(+),K(+)-ATPase
588 activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Res*,
589 **951**, 151-157.
- 590 Edwards, F. A., Gibb, A. J. and Colquhoun, D. (1992). ATP receptor-mediated
591 synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, **359**, 144-147.
- 592 Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. and Feather-Stone, R. M. (1961). A
593 new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.
594 *Biochem Pharmacol*, **7**, 88-95.
- 595 Erecinska, M. and Silver, I. A. (1994). Ions and energy in mammalian brain. *Prog*
596 *Neurobiol*, **43**, 37-71.
- 597 Fiske, C. H. and Subbarow, Y. (1927). The Nature of the "Inorganic Phosphate" in
598 Voluntary Muscle. *Science*, **65**, 401-403.
- 599 Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J*
600 *Neurochem*, **42**, 1-11.

- 601 Franca, R. T., Da Silva, A. S., Wolkmer, P., Oliveira, V. A., Pereira, M. E., Leal, M. L.,
602 Silva, C. B., Nunes, M. A., Dressler, V. L., Mazzanti, C. M., Monteiro, S. G.
603 and Lopes, S. T. (2011). Delta-aminolevulinate dehydratase activity in red
604 blood cells of rats infected with *Trypanosoma evansi*. *Parasitology*, **138**, 1272-
605 1277.
- 606 Frussa-Filho, R., Barbosa-Junior, H., Silva, R. H., Da Cunha, C. and Mello, C. F.
607 (1999). Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats
608 exposed to novel environments. *Psychopharmacology (Berl)*, **147**, 168-173.
- 609 Gandhi, C. R. and Ross, D. H. (1988). Characterization of a high-affinity Mg²⁺-
610 independent Ca²⁺-ATPase from rat brain synaptosomal membranes. *J*
611 *Neurochem*, **50**, 248-256.
- 612 Genn, R. F., Tucci, S. A., Thomas, A., Edwards, J. E. and File, S. E. (2003). Age-
613 associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests
614 of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, **27**, 155-161.
- 615 Glushchenko, T. S. and Izvarina, N. L. (1997). Na⁺,K⁺-ATPase activity in neurons
616 and glial cells of the olfactory cortex of the rat brain during the development of
617 long-term potentiation. *Neurosci Behav Physiol*, **27**, 49-52.
- 618 Greenamyre, J. T. and Porter, R. H. (1994). Anatomy and physiology of glutamate in
619 the CNS. *Neurology*, **44**, S7-13.
- 620 Guerra, G. P., Mello, C. F., Sauzem, P. D., Berlese, D. B., Furian, A. F., Tabarelli, Z.
621 and Rubin, M. A. (2006). Nitric oxide is involved in the memory facilitation
622 induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **186**, 150-158.

- 623 Gutierrez, C., Corbera, J. A., Juste, M. C., Doreste, F. and Morales, I. (2006).
624 Clinical, hematological, and biochemical findings in an outbreak of abortion
625 and neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in
626 dromedary camels. *Ann N Y Acad Sci*, **1081**, 325-327.
- 627 Habila, N., Inuwa, M. H., Aimola, I. A., Udeh, M. U. and Haruna, E. (2012).
628 Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. *Res Vet Sci*, **93**,
629 13-17.
- 630 Hanahisa, Y. and Yamaguchi, M. (1998). Increase of Ca²⁺-ATPase activity in the
631 brain microsomes of rats with increasing ages: involvement of protein kinase
632 C. *Brain Res Bull*, **46**, 329-332.
- 633 Hartmann, H., Eckert, A. and Muller, W. E. (1994). Disturbances of the neuronal
634 calcium homeostasis in the aging nervous system. *Life Sci*, **55**, 2011-2018.
- 635 Headley, P. M. and Grillner, S. (1990). Excitatory amino acids and synaptic
636 transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci*,
637 **11**, 205-211.
- 638 Herrera, H. M., Davila, A. M., Norek, A., Abreu, U. G., Souza, S. S., D'andrea, P. S.
639 and Jansen, A. M. (2004). Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal,
640 Brazil. *Vet Parasitol*, **125**, 263-275.
- 641 Joshi, P. P., Shegokar, V. R., Powar, R. M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H. R., Dani,
642 V. S., Bhargava, A., Jannin, J. and Truc, P. (2005). Human trypanosomiasis
643 caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *Am J Trop Med*
644 *Hyg*, **73**, 491-495.

- 645 Kraus-Friedmann, N. (1990). Calcium sequestration in the liver. *Cell Calcium*, **11**,
646 625-640.
- 647 Lalonde, R., Kim, H. D. and Fukuchi, K. (2004). Exploratory activity, anxiety, and
648 motor coordination in bigenic APP^{swe} + PS1/DeltaE9 mice. *Neurosci Lett*,
649 **369**, 156-161.
- 650 Lapiz-Bluhm, M. D., Bondi, C. O., Doyen, J., Rodriguez, G. A., Bedard-Arana, T. and
651 Morilak, D. A. (2008). Behavioural assays to model cognitive and affective
652 dimensions of depression and anxiety in rats. *J Neuroendocrinol*, **20**, 1115-
653 1137.
- 654 Lotti, M. (1995). Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin Chem*,
655 **41**, 1814-1818.
- 656 Magnoni, M. S., Govoni, S., Battaini, F. and Trabucchi, M. (1991). The aging brain:
657 protein phosphorylation as a target of changes in neuronal function. *Life Sci*,
658 **48**, 373-385.
- 659 Moseley, A. E., Williams, M. T., Schaefer, T. L., Bohanan, C. S., Neumann, J. C.,
660 Behbehani, M. M., Vorhees, C. V. and Lingrel, J. B. (2007). Deficiency in
661 Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and
662 anxiety in mice. *J Neurosci*, **27**, 616-626.
- 663 Oliveira, C. B., Spanevello, R., Da Silva, A. S., Souza, V. C., Pimentel, V. C., Thome,
664 G. R., Schetinger, M. R., Lopes, S. T., Leal, D. B. and Monteiro, S. G. (2011).
665 Trypanosoma evansi: Activities of adenine nucleotide degradation enzymes in
666 cerebral cortex of infected rats. *Exp Parasitol*, **128**, 225-229.

- 667 Paim, F. C., Da Silva, A. S., Wolkmer, P., Costa, M. M., Da Silva, C. B., Paim, C. B.,
668 Oliveira, M. S., Silva, L. F., Mello, C. F., Monteiro, S. G., Mazzanti, C. M. and
669 Lopes, S. T. (2011a). Trypanosoma evansi: concentration of 3-nitrotyrosine in
670 the brain of infected rats. *Exp Parasitol*, **129**, 27-30.
- 671 Paim, F. C., Duarte, M. M., Costa, M. M., Da Silva, A. S., Wolkmer, P., Silva, C. B.,
672 Paim, C. B., Franca, R. T., Mazzanti, C. M., Monteiro, S. G., Krause, A. and
673 Lopes, S. T. (2011b). Cytokines in rats experimentally infected with
674 Trypanosoma evansi. *Exp Parasitol*, **128**, 365-370.
- 675 Prast, H. and Philippu, A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog*
676 *Neurobiol*, **64**, 51-68.
- 677 Rakonczay, Z. (2003). Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase
678 and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biol*
679 *Hung*, **54**, 183-189.
- 680 Rodrigues, A., Figuera, R. A., Souza, T. M., Schild, A. L. and Barros, C. S. (2009).
681 Neuropathology of naturally occurring Trypanosoma evansi infection of
682 horses. *Vet Pathol*, **46**, 251-258.
- 683 Rohn, T. T., Hinds, T. R. and Vincenzi, F. F. (1993). Ion transport ATPases as targets
684 for free radical damage. Protection by an aminosteroid of the Ca²⁺ pump
685 ATPase and Na⁺/K⁺ pump ATPase of human red blood cell membranes.
686 *Biochem Pharmacol*, **46**, 525-534.
- 687 Rothman, S. M. and Olney, J. W. (1995). Excitotoxicity and the NMDA receptor--still
688 lethal after eight years. *Trends Neurosci*, **18**, 57-58.

- 689 Rubin, M. A., Berlese, D. B., Stiegemeier, J. A., Volkweis, M. A., Oliveira, D. M., Dos
690 Santos, T. L., Fenili, A. C. and Mello, C. F. (2004). Intra-amygdala
691 administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci*,
692 **24**, 2328-2334.
- 693 Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W. Y., Hafner, M., Macdonald, J. F. and Tymianski, M.
694 (1999). Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide
695 neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, **284**, 1845-1848.
- 696 Schweigert, I. D., De Oliveira, D. L., Scheibel, F., Da Costa, F., Wofchuk, S. T.,
697 Souza, D. O. and Perry, M. L. (2005). Gestational and postnatal malnutrition
698 affects sensitivity of young rats to picrotoxin and quinolinic acid and uptake of
699 GABA by cortical and hippocampal slices. *Brain Res Dev Brain Res*, **154**, 177-
700 185.
- 701 Scuri, R., Lombardo, P., Cataldo, E., Ristori, C. and Brunelli, M. (2007). Inhibition of
702 Na⁺/K⁺ ATPase potentiates synaptic transmission in tactile sensory neurons
703 of the leech. *Eur J Neurosci*, **25**, 159-167.
- 704 Silman, I. and Sussman, J. L. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-
705 classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, **5**, 293-302.
- 706 Smith, S. J., Macdermott, A. B. and Weight, F. F. (1983). Detection of intracellular
707 Ca²⁺ transients in sympathetic neurones using arsenazo III. *Nature*, **304**, 350-
708 352.
- 709 Soreq, H. and Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor.
710 *Nat Rev Neurosci*, **2**, 294-302.

- 711 Trevisan, G., Maldaner, G., Velloso, N. A., Sant'anna Gda, S., Ilha, V., Velho Gewehr
712 Cde, C., Rubin, M. A., Morel, A. F. and Ferreira, J. (2009). Antinociceptive
713 effects of 14-membered cyclopeptide alkaloids. *J Nat Prod*, **72**, 608-612.
- 714 Tuntasuvan, D., Mimapan, S., Sarataphan, N., Trongwongsa, L., Intraraksa, R. and
715 Luckins, A. G. (2000). Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the
716 naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. *Vet*
717 *Parasitol*, **87**, 223-230.
- 718 Tuntasuvan, D., Sarataphan, N. and Nishikawa, H. (1997). Cerebral trypanosomiasis
719 in native cattle. *Vet Parasitol*, **73**, 357-363.
- 720 Wolkmer, P., Da Silva, A. S., Cargnelutti, J. F., Costa, M. M., Traesel, C. K., Lopes,
721 S. T. D. A. and Monteiro, S. G. (2007). Erythropoietic response in
722 *Trypanosoma evansi* infected rats with different parasitaemia intensity *Cienc.*
723 *Rural*, **37**, 1682-1687.
- 724 Wolkmer, P., Da Silva, A. S., Traesel, C. K., Paim, F. C., Cargnelutti, J. F.,
725 Pagnoncelli, M., Picada, M. E., Monteiro, S. G. and Lopes, S. T. (2009). Lipid
726 peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with
727 *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol*, **165**, 41-46.
- 728 Wolkmer, P., Da Silva, C. B., Paim, F. C., Da Silva, A. S., Tavares, K. C., Lazzarotto,
729 C. R., Palma, H. E., Thome, G. R., Miletto, L. C., Schetinger, M. R., Lopes, S.
730 T. and Mazzanti, C. M. (2012a). Biochemistry detection of
731 acetylcholinesterase activity in *Trypanosoma evansi* and possible functional
732 correlations. *Exp Parasitol*, **132**, 546-549.

733 Wolkmer, P., Da Silva, C. B., Paim, F. C., Duarte, M. M., Castro, V., Palma, H. E.,
734 Franca, R. T., Felin, D. V., Siqueira, L. C., Lopes, S. T., Schetinger, M. R.,
735 Monteiro, S. G. and Mazzanti, C. M. (2012b). Pre-treatment with curcumin
736 modulates acetylcholinesterase activity and proinflammatory cytokines in rats
737 infected with *Trypanosoma evansi*. *Parasitol Int*.

738 Wolkmer, P., Lopes, S. T., Franciscato, C., Da Silva, A. S., Traesel, C. K., Siqueira,
739 L. C., Pereira, M. E., Monteiro, S. G. and Mazzanti, C. M. (2010).
740 *Trypanosoma evansi*: cholinesterase activity in acutely infected Wistar rats.
741 *Exp Parasitol*, **125**, 251-255.

742 Wyse, A. T., Bavaresco, C. S., Reis, E. A., Zugno, A. I., Tagliari, B., Calcagnotto, T.
743 and Netto, C. A. (2004). Training in inhibitory avoidance causes a reduction of
744 Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiol Behav*, **80**, 475-479.

745 Wyse, A. T., Streck, E. L., Barros, S. V., Brusque, A. M., Zugno, A. I. and Wajner, M.
746 (2000). Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in
747 cerebral cortex of rats. *Neuroreport*, **11**, 2331-2334.

748

749

750

750

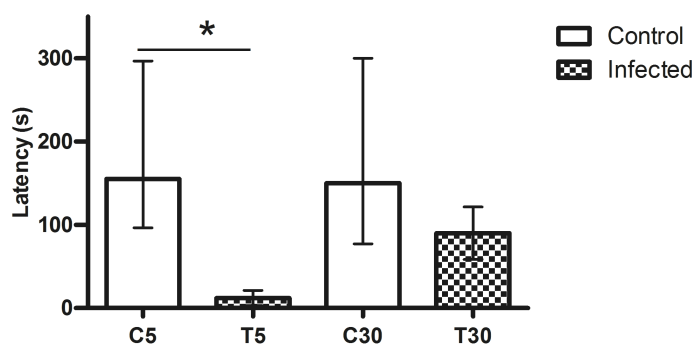
751 Legends

752

753 Figure 1 - Inhibitory avoidance: Infection with *T. evansi* at day 4 pi (T5) impairs754 memory in adult rats. Data are the median \pm interquartile range for 11 animals in755 each group. * $P < 0.05$ compared with control group. Performance as three replicas

756 and was evaluated by three different analyzers

757



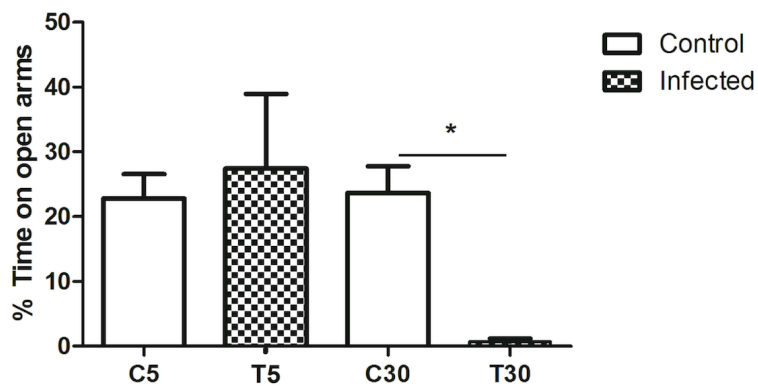
758

759

760

760 Figure 2 – Elevated plus-maze: Infection with *Trypanosoma evansi* at day 29 pi (T30)
761 decreases the percentage of time spent on the open arms by adult rats tested in the
762 elevated plus-maze. Data are the mean + SEM for 11 animals in each group. * P <
763 0.05 compared with control group. Performance as three replicas and was evaluated
764 by three different analyzers

765



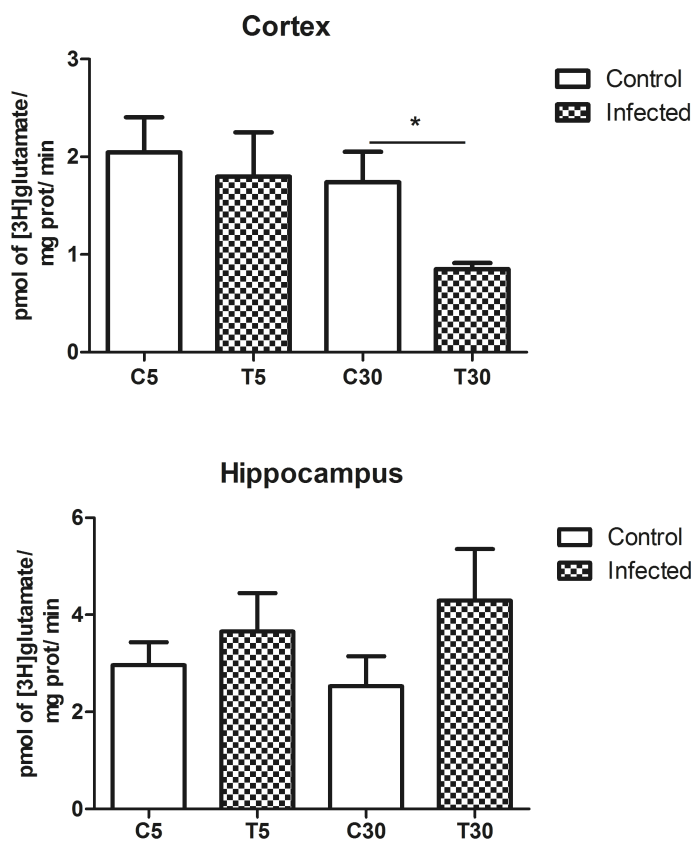
766

767

768

768 Figure 3 - Evaluation of L-[³H]glutamate uptake assays carried out in slices of cortex
769 and hippocampus rats infected by *T. evansi* at days 5 (T5) and 30 (T30) pi. Results
770 are expressed as mean±S.E.M. * P < 0.05 compared to the control group (n=8 per
771 group).

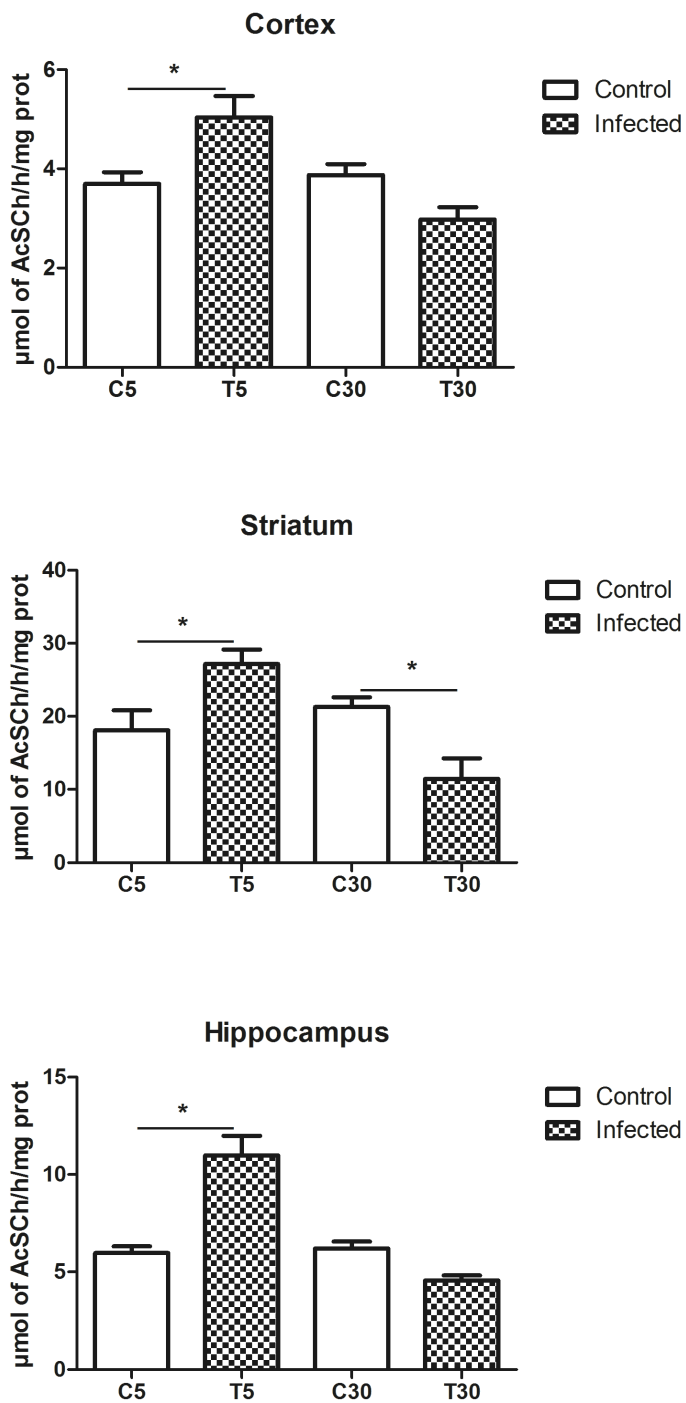
772



773

774

774 Figure 4 – Evaluation of acetylcholinesterase activity in cortex striatum and
775 hippocampus of rats infected by *T. evansi* at days 5 (T5) and 30 (T30) pi. Results are
776 expressed as mean±S.E.M. * P < 0.05 compared to the control group (n=8 per group)

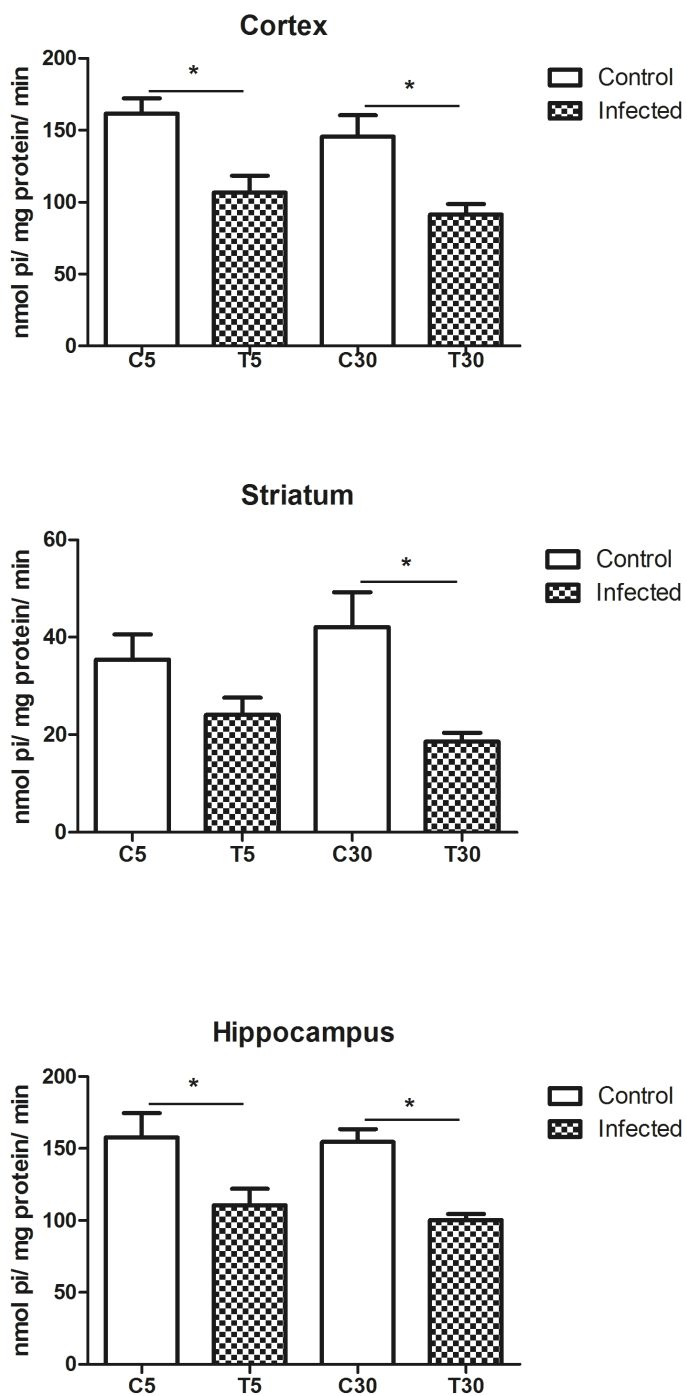


777

778

778 Figure 5 –Evaluation of Na^+ , K^+ -ATPase activity in cortex, striatum and hippocampus
779 of rats infected by *T. evansi* at days 5 (T5) and 30 (T30) pi. Results are expressed as
780 mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ compared to the control group (n=8 per group)

781

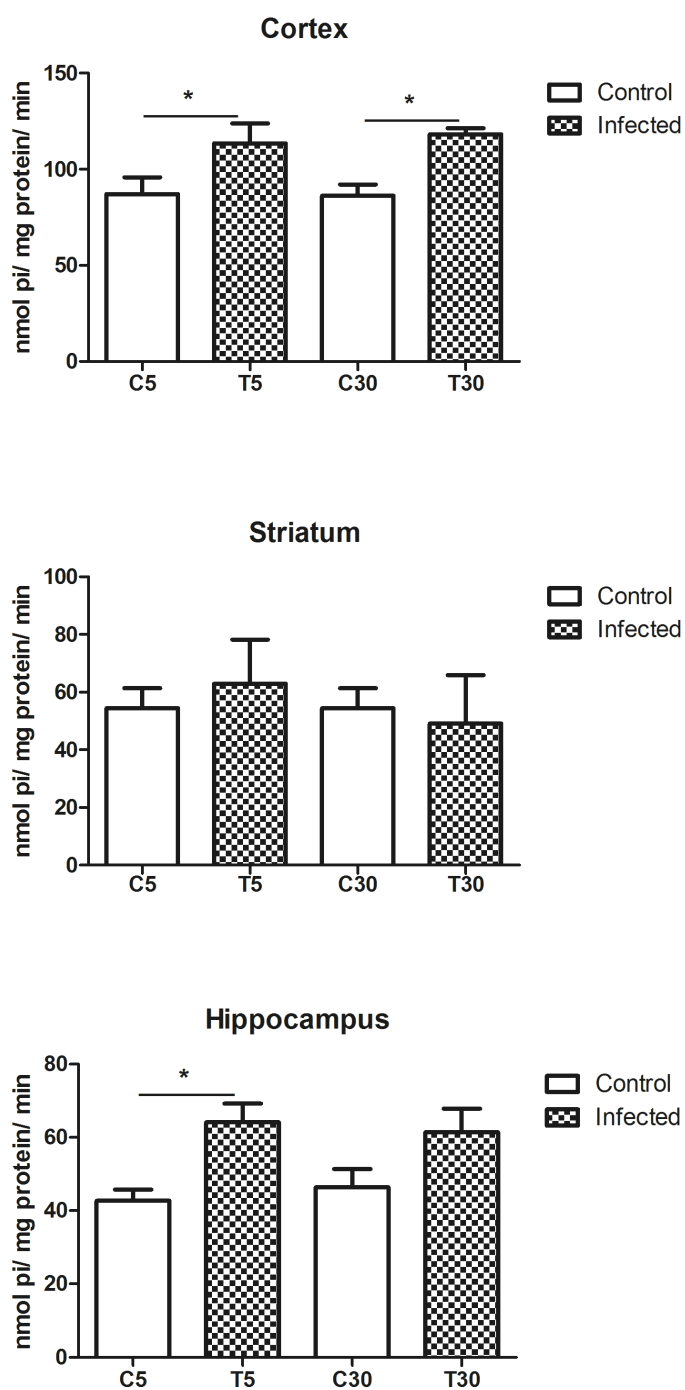


782

783

783 Figure 6 – Evaluation of Ca (2+)-ATPase activity in cortex, striatum and hippocampus
784 of rats infected by *T. evansi* at days 5 (T5) and 30 (T30) pi. Results are expressed as
785 mean±S.E.M. * P < 0.05 compared to the control group (n=8 per group)

786



787

788

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado que ratos são altamente suscetíveis à tripanossomíase apresentando várias alterações bioquímicas e hematológicas associadas aos sinais clínicos como anemia, ataxia, tremores e coma terminal em ratos não tratados (MENEZES et al., 2004; WOLKMER et al., 2009 – artigo I). É importante ressaltar que nos primeiros trabalhos, desenvolvidos pelo grupo, o isolado do *T. evansi* (obtida de uma infecção natural em cão) era mantida somente por passagens em ratos, sendo altamente patogênica (mortalidade de 100% dos animais infectados até o sétimo dia pós-infecção - pi). Com a padronização do protocolo de criopreservação (TAVARES et al., 2010) e sucessivas passagens do isolado obteve-se menores taxas de mortalidade, possibilitando manter os animais infectados por períodos mais longos.

Ratos são considerados um bom modelo experimental para o estudo do *T. evansi*, pois podem manifestar sinais neurológicos e problemas locomotores como paralisia de membros pélvicos (WOLKMER et al., 2007; WOLKMER et al., 2010; DA SILVA et al., 2012a) semelhante ao observado em equinos naturalmente infectados por esse parasita. A patogenia das alterações clínicas e neurológicas da Surra não está completamente esclarecida e diversos trabalhos vêm demonstrando que o sistema colinérgico tem um papel fundamental na patogenia desta doença. Assim, consideramos oportuno investigar esse sistema na infecção por *T. evansi*, utilizando ratos como modelo experimental.

Além do caráter clássico da AChE na finalização da transmissão sináptica, nos últimos anos têm-se sugerido outras funções ligadas a esta enzima tanto no aspecto catalítico (hidrólise da ACh) quanto não-catalítico (adesão protéica e celular, participação na hematopoiese, regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica e osteogênese) (SOREQ e SEIDMAN, 2001; SILMAN e SUSSMAN, 2005). Desta forma, neste conjunto de estudos, buscou-se demonstrar que as alterações na atividade da AChE estão intimamente relacionadas à patologia do *T. evansi*. Através de ensaios enzimáticos foi possível detectar a atividade desta enzima no parasita, o que sugere seu envolvimento no metabolismo do *T. evansi* (artigo II). Além disso, com os artigos I, III e IV foi possível demonstrar que alterações na atividade da

AChE estão correlacionadas com os distúrbios patológicos apresentados por ratos infectados por *T. evansi*, avaliado na relação parasita-hospedeiro.

Em relação ao papel da AChE nos seres unicelulares (artigo II), sabe-se que a enzima é amplamente distribuída em muitas espécies, incluindo os parasitas. Inicialmente, acreditava-se que esta enzima estava presente apenas em formas que apresentavam movimentos, pois a enzima é considerada fundamental para a regulação da propagação do impulso e, portanto, responsável pelo movimento flagelar e de cílios (SEAMAN e HOULIHAN, 1951; KARZMAR, 2010). Contudo, diversos trabalhos reforçam sua importância não neuronal, demonstrando que o sistema colinérgico está também presente em organismos não-móveis, tais como o *Plasmodium* e as esponjas (JAHN e BOVEE, 1965). No artigo II, foi utilizado protocolo enzimático padrão para avaliar a atividade da enzima (ELLMAN et al., 1961 modificado por FITZGERALD & COSTA, 1993) com o qual foi possível detectar a presença de AChE em *T. evansi*, também demonstrada através de ELISA por Mijares e colaboradores (2011). Com a detecção da AChE no *T. evansi* juntamente com outros componentes do sistema colinérgico, incluindo nAChR (PORTILLO et al., 2011), acredita-se que a enzima seja responsável pela regulação dos níveis de ACh do parasita. Sabe-se que receptores nAChR medeiam a ativação de fosfolipase C, o que resulta no aumento da concentração de Ca^{+} (HULME et al., 1990). Desta forma, a presença do sistema colinérgico no parasita poderia estar modulando a entrada de cálcio, mineral essencial para a vida do protozoário. Assim, devido ao seu papel biológico crucial para a vida do tripanossoma, futuros estudos poderão ser desenvolvidos utilizando a AChE do parasita como o alvo de drogas, naturais e sintéticas. Além disso, trabalhos devem ser conduzidos, buscando avaliar a interferência desta enzima na neuromodulação do hospedeiro.

Nos estudos I, III e IV foi avaliada a relação parasita-hospedeiro abrangendo diversos mecanismos fisiopatológicos, buscando analisar alterações na fase aguda e crônica da doença. Uma característica comum na infecção pelo protozoário é o desenvolvimento de anemia (WOLKMER et al., 2009; FRANCA et al., 2011; PAIM et al., 2011b; DA SILVA et al., 2013). Esta é de natureza hemolítica, contudo discutem-se causas multifatoriais. Por exemplo, já foi demonstrado que a peroxidação lipídica que ocorre nos ratos infectados por *T. evansi* leva a uma fragilidade da membrana eritrocitária, levando à lise das hemácias (WOLKMER et al. 2009). Além disso, Paim et al. (2011a) observou que a infecção pelo flagelado causa um aumento

significativo das citocinas pró-inflamatórias no soro, e esta resposta imunológica afetaria a produção de células vermelhas, contribuindo com anemia observada nesta doença. Sabe-se que a AChE participa do processo de proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas e que sua inibição é capaz de reduzir a proliferação de células multipotentes comprometendo a eritropoiese, megacariocitopoiese, a produção de macrófagos, e ainda promove a apoptose. Com base nesses dados, a redução na atividade da AChE observada no sangue de animais infectados por *T. evansi* poderia estar contribuindo com o desenvolvimento da anemia (artigo I).

Contudo, o principal papel da AChE é a finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas pela hidrólise do neurotransmissor ACh. A AChE está presente no SNC e periférico. No cérebro está envolvida nas sinapses associadas ao controle motor, memória e cognição (DAS et al., 2005a). Considerando que a infecção por *T. evansi* cursa com diversas alterações neurológicas e que alterações cognitivas são de difícil percepção em animais, buscou-se avaliar possíveis alterações colinérgicas em ratos infectados por este parasita. No primeiro trabalho (artigo I), avaliando a atividade da AChE no SNC não foram observadas alterações significativas na atividade da enzima cinco dias pi (WOLKMER, 2010). Provavelmente, isso se deva a utilização do encéfalo, sem a separação das estruturas encefálicas as quais possuem diferentes projeções colinérgicas, como por exemplo, o estriado que é uma estrutura rica em vias colinérgicas (MILATOVIC e DETTBARN, 1996; MULLER et al., 2002). Desta forma, a utilização conjunta de estruturas com diferentes concentrações enzimáticas poderia ter mascarado o resultado.

Porém, a atividade da AChE no sangue demonstra propriedade funcional e estrutural similar a enzima neuronal, assim poderia refletir o status do SNC (RAKONCZAY et al., 2005). Tendo em vista que a atividade enzimática sanguínea encontrava-se diminuída (WOLKMER et al., 2010), outros estudos foram realizados para avaliar o sistema colinérgico no SNC de animais infectados. Deste modo, Da Silva et al., (2012) e Wolkmer (artigo IV) avaliaram a atividade da AChE nas diferentes estruturas encefálicas no dia cinco pi, observando um aumento na atividade da AChE no córtex cerebral, hipocampo e estriado, e 30 dias pi em que ocorreu inibição na atividade da AChE nestas mesmas estruturas, corroborando com a hipótese que o parasita interfere com a neurotransmissão colinérgica do hospedeiro.

O aumento na atividade da AChE nas estruturas encefálicas dos ratos infectados (dia cinco pi) pode estar correlacionado a inibição da Na^+ , K^+ -ATPase e aumento na Ca^{+2} - ATPase, o que altera a homeostase iônica e conduz a um aumento dos níveis Ca^{+2} e Na^+ no interior da célula. Essa alteração provoca uma hiperpolarização da membrana da célula neuronal e, conseqüentemente, a liberação de neurotransmissores, tais como ACh, entre outros. Acredita-se que o aumento na atividade da AChE pode ser uma resposta compensatória a estes eventos bioquímicos. Ativação da AChE leva a uma rápida degradação da ACh. A importância do sistema colinérgico em processos de aprendizagem e memória é inegável, e, assim, a alteração na atividade da AChE, bem como nos níveis de neurotransmissores como ACh, é neuroquimicamente associada à déficits cognitivos (DAS et al., 2005a; DAS et al., 2005b). Desta forma, sugere-se que a infecção por *T. evansi* pode promover uma disfunção na sinapse, o que interfere com a modulação da neurotransmissão colinérgica podendo estar associado com prejuízos na aprendizagem e perda de memória, como demonstrado através da esQUIVA inibitória nos ratos infectados (artigo IV).

Outro ponto importante nas pesquisas com *T. evansi* foi a avaliação da concentração de óxido nítrico (NO) no encéfalo dos animais infectados (Paim et al., 2011). O NO-mensageiro é considerado um neurotransmissor devido as suas características de alta difusibilidade, sendo capaz de penetrar no citoplasma celular diretamente, sem necessidade de receptores de membrana, levando a respostas rápidas e precisas (GARTHWAITE e BOULTON, 1995). Nosso grupo demonstrou que a infecção pelo parasita leva a um aumento nas concentrações de NO nas diferentes estruturas encefálicas após 20 dias pi (PAIM et al., 2011a). Sabe-se que estimulação neuronal leva a liberação de glutamato que se liga aos seus receptores do tipo NMDA. Enquanto persistir essa união, o cálcio é capaz de entrar no citoplasma do neurônio pós-sináptico levando à ativação da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) resultando na síntese de NO. Assim, o NO recém sintetizado deixa o neurônio pós-sináptico por difusão direta pela membrana da célula. O NO desempenha um papel como mensageiro retrógrado, difundindo-se do neurônio pós-sináptico e retornando para o neurônio pré-sináptico onde ativa a enzima guanilato ciclase. A guanilato ciclase catalisa a reação que produz guanosina monofosfato ciclase (GMPc). A GMPc, por sua vez, desencadeia o processo que resulta na liberação do glutamato e o ciclo se repete (TSUTSUKI et al., 2007).

Partindo desta hipótese, considerou-se apropriado investigar possíveis alterações no sistema glutamatérgico. Assim, com a cronicidade da doença (30 dias pi) foi evidenciado uma redução na captação de glutamato nas fatias de córtex cerebral de ratos infectados por *T. evansi* (artigo IV). Considerando que a captação de glutamato por astrócitos é o principal processo envolvido na neuroproteção fisiopatológica contra excitotoxicidade glutamatérgica, através da redução das concentrações de glutamato extracelular abaixo dos níveis tóxicos, este efeito inibitório causado pelo parasita pode levar a efeitos citotóxicos no córtex cerebral. Além disso, a redução da captação de glutamato e da atividade Na⁺, K⁺-ATPase podem atuar sinergicamente e cooperando, ao longo da infecção, com danos cerebrais nos animais infectados por este protozoário.

É importante ressaltar que em estudo realizado pelo nosso grupo foi demonstrado que lesões histológicas no SNC só foram observadas aos 150 dias pi. Juntamente, foi possível concluir que a paralisia dos membros posteriores em ratos é uma consequência de lesão do músculo e do sistema nervoso periférico (DA SILVA et al., 2012). As alterações no SNC, e conseqüentemente nos testes comportamentais, são sugestivos de um agravamento clínico, resultado das alterações neuroquímicas, e não um reflexo dos problemas do aparelho locomotor. Ratos infectados pelo *T. evansi* até 30 dias pi não tem sua performance alterada no teste de campo aberto (artigo IV) e em testes neurológicos que avaliaram capacidade motora e equilíbrio (DA SILVA et al., 2012).

Como foi demonstrado, o *T. evansi* é um protozoário altamente patogênico, para diversas espécies. Tratamentos alternativos contra tripanossomas têm sido utilizados, principalmente, pela elevada taxa de resistência às drogas e seus diversos efeitos colaterais. A suplementação animal com produtos naturais vem sendo cada vez mais utilizada, tanto com efeito bioregulador como adjuvante no tratamento padrão.

Como demonstrado no artigo III, ratos pré-tratados com curcumina (polifenol conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e tripanocida) e infectados por *T. evansi* mantiveram, ao longo do experimento, uma menor parasitemia. Ainda, nestes grupos foi evidenciada uma maior taxa de sobrevivência dos ratos. O pré-tratamento com curcumina foi capaz de prevenir o aumento das citocinas pró-inflamatórias, modulando a resposta imunológica. Além de aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e reduzir a atividade da AChE, indicando níveis mais elevados

de ACh livre. Portanto, ACh induziu a liberação de hormônios e citocinas anti-inflamatórias, como demonstrado pela IL-10 que através do mecanismo de *feedback* negativo inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, que, em excesso podem ter efeitos deletérios. Desta maneira, sugere-se que a utilização da curcumina como suplemento alimentar, principalmente nas regiões em que a doença é endêmica, poderia reforçar e estimular o sistema inume, minimizando os efeitos deletérios da infecção por *T. evansi*.

Assim, neste trabalho foi investigada a relação da infecção experimental pelo *T. evansi* com a atividade de enzimas e neurotransmissores cruciais para o SNC. Com os resultados compilados pode-se sugerir que existe uma disfunção colinérgica e glutamatérgica causada pelo parasita. Essas alterações resultam em alterações cognitivas, levando a déficit de memória e aumento da ansiedade no hospedeiro. Também foi demonstrado a presença da AChE no parasita, que pode estar associado a funções vitais do parasita podendo ser utilizado como alvo para estudos de quimioterápicos. Em relação ao tratamento com a curcumina, os resultados foram promissores, pois a prévia utilização do composto minimizou efeitos nocivos da infecção. Assim, sugere-se que a curcumina pode ser utilizada como suplemento alimentar em áreas onde a infecção por *T. evansi* é endêmica, contribuindo para minimizar a mortalidade e prejuízos econômicos.

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A redução na atividade da AChE nos eritrócitos pode estar relacionada à patogenia da anemia nas tripanossomíases.
- É possível detectar, através de ensaio enzimático, a atividade da AChE no *T. evansi*, com isso esta enzima pode estar associada com as funções vitais do parasita, podendo ser utilizada como possível alvo no desenvolvimento de quimioterapias.
- O pré-tratamento com curcumina induz efeitos imunomodulatórios alterando os parâmetros inflamatórios tais como as citocinas e a atividade da AChE sanguínea. Desta forma, a curcumina poderia ser usada como um suplemento alimentar em áreas endêmicas de tripanossomíase, uma vez que estimulou o sistema imunológico, reduziu a carga parasitária e a mortalidade em ratos infectados com *T. evansi*.
- Alterações nos sistemas colinérgico, glutamatérgico e nos parâmetros de metabolismo energético (ATPases) parecem ser mecanismos envolvidos na disfunção neuronal, prejudicando a memória e aumentando o comportamento de ansiedade em ratos infectados com *T. evansi*.

PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos e o interesse de compreender melhor os mecanismos da infecção pelo *T. evansi* no SNC, torna-se de extrema importância avaliar o efeito da infecção sobre receptores colinérgicos e glutamatérgicos. Sabe-se que esses receptores estão envolvidos nos processos de plasticidade neural, neurodegeneração e neuroproteção. Além disso, vários pesquisadores demonstraram que a ativação excessiva dos receptores e aminoácidos excitatórios pode iniciar uma série de eventos bioquímicos intracelulares, resultando em uma lesão do SNC em desenvolvimento e em adultos. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a infecção pelo *T. evansi* altera tanto o sistema colinérgico, quanto o glutamatérgico. Estas mudanças na atividade sináptica das conexões neuronais, que são consideradas críticas em muitas funções do encéfalo, variam desde a plasticidade sináptica durante o desenvolvimento, como observado com o processo de formação de memória. Desta forma, ajustes nos receptores podem ser um dos mecanismos pelos quais a atividade neuronal pode ser controlada e restabelecer as funções das áreas afetadas durante a patologia. Esta alteração pode resultar em efeito protetor neuronal, porém dependendo do tipo e extensão da lesão, pode haver uma liberação excessiva de fatores neurotóxicos, como também, ativar fatores como lipases, proteases, radicais livres, aminoácidos excitatórios, incluindo o glutamato, como outros neuromediadores. Esses fatores e os neuromediadores, por sua vez, medeiam vias intracelulares que podem ativar processos como apoptose ou necrose. Assim, avaliar a expressão dos receptores em conjunto com a caracterização de morte neuronal e avaliação de fatores neurotóxicos poderia esclarecer os mecanismos na neuropatogenia da infecção por *T. evansi*. Esses dados podem elucidar se as alterações neuronais são decorrentes de um processo de excitotoxicidade ou um possível efeito compensatório neuroprotetor durante a infecção.

Além disso, visto que alguns trabalhos tem demonstrado que a curcumina melhora o desempenho de ratos nas tarefas de memória e aprendizagem, é interessante avaliarmos o efeito do uso da curcumina sobre os déficits de memória e possível dano neuronal causados pela infecção. Em adição, o possível efeito da

curcumina poderia ser avaliado tanto *in vitro* quanto *in vivo*, analisando seu efeito neuroprotetor, antioxidante e anti-inflamatório sobre o SNC de animais infectados por *T. evansi*. Assim, avaliando se este composto polifenólico poderia ser um agente efetivo na redução da neuropatia induzida pela infecção.

REFERÊNCIAS

ABE, Y.; S. HASHIMOTO; T. HORIE. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **Pharmacol Res**, v.39, n.1, p.41-47. 1999.

ABREU-VILLACA, Y.; C. C. FILGUEIRAS; A. C. MANHAES. Developmental aspects of the cholinergic system. **Behav Brain Res**, v.221, n.2, p.367-378. 2011.

ABRIL, C., et al. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **J Virol**, v.78, n.7, p.3644-3653. 2004.

AGGARWAL, B. B.; K. B. HARIKUMAR. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **Int J Biochem Cell Biol**, v.41, n.1, p.40-59. 2009.

AGRESTI, C., et al. ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. **Brain Res Brain Res Rev**, v.48, n.2, p.157-165. 2005.

AKSOY, S.; W. C. GIBSON; M. J. LEHANE. Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. **Adv Parasitol**, v.53, p.1-83. 2003.

AKSOY, S.; R. V. RIO. Interactions among multiple genomes: tsetse, its symbionts and trypanosomes. **Insect Biochem Mol Biol**, v.35, n.7, p.691-698. 2005.

AL-JAFARI, A. A.; M. A. KAMAL; A. S. DUHAIMAN. The mode of inhibition of human erythrocyte membrane-bound acetylcholinesterase by cisplatin in vitro. **J Enzyme Inhib**, v.8, n.4, p.281-289. 1995.

AL-QARAWI, A. A.; H. ABDEL-RAHMAN; S. A. ELMOUGY. Impairment in the pituitary-thyroid axis of the *Camelus dromedarius* infected with *Trypanosoma evansi*. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v.108, n.4, p.172-174. 2001.

AMARA, S. G.; A. C. FONTANA. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochem Int**, v.41, n.5, p.313-318. 2002.

AMMON, H. P.; M. A. WAHL. Pharmacology of *Curcuma longa*. **Planta Med**, v.57, n.1, p.1-7. 1991.

ANDERSON, C. M.; R. A. SWANSON. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**, v.32, n.1, p.1-14. 2000.

ANDREWS, N. C. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. **J Clin Invest**, v.113, n.9, p.1251-1253. 2004.

APERIA, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **J Intern Med**, v.261, n.1, p.44-52. 2007.

AQUINO, L. P., et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94, n.2, p.255-260. 1999.

ATTWELL, D. Brain uptake of glutamate: food for thought. **J Nutr**, v.130, n.4S Suppl, p.1023S-1025S. 2000.

BARAL, T. N., et al. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. **J Infect Dis**, v.195, n.10, p.1513-1520. 2007.

BEAL, M. F. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. **FASEB J**, v.6, n.15, p.3338-3344. 1992a.

BEAL, M. F. Role of excitotoxicity in human neurological disease. **Curr Opin Neurobiol**, v.2, n.5, p.657-662. 1992b.

BERLIN, D.; E. LOEB; G. BANETH. Disseminated central nervous system disease caused by *Trypanosoma evansi* in a horse. **Vet Parasitol**, v.161, n.3-4, p.316-319. 2009.

BERTHOUD, H. R.; W. L. NEUHUBER. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Auton Neurosci**, v.85, n.1-3, p.1-17. 2000.

BESTEIRO, S., et al. Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. **Trends Parasitol**, v.21, n.4, p.185-191. 2005.

BLOKLAND, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? **Brain Res Brain Res Rev**, v.21, n.3, p.285-300. 1995.

BOLDYREV, A., et al. Glutamate receptors communicate with Na⁺/K⁺-ATPase in rat cerebellum granule cells: demonstration of differences in the action of several metabotropic and ionotropic glutamate agonists on intracellular reactive oxygen species and the sodium pump. **J Mol Neurosci**, v.21, n.3, p.213-222. 2003.

BOLDYREV, A., et al. Functional relationship between Na/K-ATPase and NMDA-receptors in rat cerebellum granule cells. **Biochemistry (Mosc)**, v.69, n.4, p.429-434. 2004.

BOROVIKOVA, L. V., et al. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Auton Neurosci**, v.85, n.1-3, p.141-147. 2000.

BOURIN, M., et al. Animal models of anxiety in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, v.21, n.6, p.567-574. 2007.

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

BRUN, R.; H. HECKER; Z. R. LUN. Trypanosoma evansi and T. equiperdum: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Vet Parasitol**, v.79, n.2, p.95-107. 1998.

BRUNELLI, M., et al. Neurobiological principles of learning and memory. **Arch Ital Biol**, v.135, n.1, p.15-36. 1997.

CAHILL, L.; J. BRIONI; I. IZQUIERDO. Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia, and some clinical implications. **Psychopharmacology (Berl)**, v.90, n.4, p.554-556. 1986.

CARVALHO, F. B., et al. Spermidine decreases Na(+),K(+)-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. **Eur J Pharmacol**, v.684, n.1-3, p.79-86. 2012.

CASTELL, J. V., et al. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. **Hepatology**, v.12, n.5, p.1179-1186. 1990.

CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. **Biomed Pharmacother**, v.48, n.10, p.445-453. 1994.

CHEN, Y.; R. A. SWANSON. Astrocytes and brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.23, n.2, p.137-149. 2003.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, v.1, n.8, p.623-634. 1988.

COEN, P. G., et al. Trypanosoma evansi in Indonesian buffaloes: evaluation of simple models of natural immunity to infection. **Epidemiol Infect**, v.126, n.1, p.111-118. 2001.

COLLINGRIDGE, G. L.; R. A. LESTER. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol Rev**, v.41, n.2, p.143-210. 1989.

COSTA, M. M., et al. Serum proteinogram of cats experimentally infected by Trypanosoma evansi. **Prev Vet Med**, v.95, n.3-4, p.301-304. 2010.

COYLE, J. T.; P. PUTTFARCKEN. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v.262, n.5134, p.689-695. 1993.

CZURA, C. J.; K. J. TRACEY. Autonomic neural regulation of immunity. **J Intern Med**, v.257, n.2, p.156-166. 2005.

DA SILVA, A. S., et al. Trypanosoma evansi: adenosine deaminase activity in the brain of infected rats. **Exp Parasitol**, v.127, n.1, p.173-177. 2011a.

DA SILVA, A. S., et al. Trypanosoma evansi: hematologic changes in experimentally infected cats. **Exp Parasitol**, v.123, n.1, p.31-34. 2009a.

DA SILVA, A. S., et al. Trypanosoma evansi: levels of copper, iron and zinc in the bloodstream of infected cats. **Exp Parasitol**, v.123, n.1, p.35-38. 2009b.

DA SILVA, A. S., et al. Acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and spinal cord of rats infected with Trypanosoma evansi. **Vet Parasitol**, v.175, n.3-4, p.237-244. 2011b.

DA SILVA, A. S., et al. Trypanosoma evansi: immune response and acetylcholinesterase activity in lymphocytes from infected rats. **Exp Parasitol**, v.127, n.2, p.475-480. 2011c.

DA SILVA, A. S., et al. Clinical signs and histopathology of brain, spinal cord and muscle of the pelvic limb of rats experimentally infected with Trypanosoma evansi. **Pathol Res Pract**, v.208, n.1, p.39-44. 2011d.

DA SILVA, A. S., et al. Clinical signs and histopathology of brain, spinal cord and muscle of the pelvic limb of rats experimentally infected with Trypanosoma evansi. **Pathol Res Pract**, v.208, n.1, p.39-44. 2012a.

DA SILVA, A. S., et al. Influence of Trypanosoma evansi in adenine nucleotides and nucleoside concentration in serum and cerebral cortex of infected rats. **Exp Parasitol**, v.131, n.1, p.80-84. 2012b.

DA SILVA, A. S., et al. Pathological findings associated with experimental infection by Trypanosoma evansi in cats. **J Comp Pathol**, v.142, n.2-3, p.170-176. 2010a.

DA SILVA, A. S., et al. Biochemical detection of adenosine deaminase in Trypanosoma evansi. **Exp Parasitol**, v.128, n.3, p.298-300. 2011e.

DA SILVA, A. S., et al. Influence of Trypanosoma evansi in blood, plasma, and brain cholinesterase of experimentally infected cats. **Res Vet Sci**, v.88, n.2, p.281-284. 2010b.

DA SILVA, A. S., et al. Lipid peroxidation in cats experimentally infected with Trypanosoma evansi. **Parasitol Res**, v.106, n.1, p.157-161. 2009c.

DA SILVA, A. S., et al. Susceptibility of Trypanosoma evansi to cordycepin. **Biomed Pharmacother**, v.65, n.3, p.220-223. 2011f.

DA SILVA, A. S., et al. Diminazene aceturate in the control of Trypanosoma evansi infection in cats. **Vet Parasitol**, v.165, n.1-2, p.47-50. 2009d.

DA SILVA, C. B., et al. Cholinesterases as markers of the inflammatory process in rats infected with Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae. **J Med Microbiol**, v.61, n.Pt 2, p.278-284. 2011g.

DA SILVA, C. B., et al. Iron metabolism and its relationship to anemia and immune system in *Trypanosoma evansi* infected rats. **Exp Parasitol**, v.133, n.3, p.357-364. 2013.

DAIKHIN, Y.; M. YUDKOFF. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. **J Nutr**, v.130, n.4S Suppl, p.1026S-1031S. 2000.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v.65, n.1, p.1-105. 2001.

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

DARGIE, J. D., et al. Bovine trypanosomiasis: the red cell kinetics of ndama and Zebu cattle infected with *Trypanosoma congolense*. **Parasitology**, v.78, n.3, p.271-286. 1979.

DAS, A.; M. DIKSHIT; C. NATH. Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. **Pharmacol Biochem Behav**, v.81, n.1, p.89-99. 2005a.

DAS, A., et al. Nature of stress: differential effects on brain acetylcholinesterase activity and memory in rats. **Life Sci**, v.77, n.18, p.2299-2311. 2005b.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Med Sci Monit**, v.13, n.12, p.RA214-221. 2007.

DAVILA, A. M.; R. A. SILVA. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. **Ann N Y Acad Sci**, v.916, p.199-212. 2000.

DAVILA, A. M., et al. The seroprevalence of equine trypanosomosis in the pantanal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94, n.2, p.199-202. 1999.

DOCAMPO, R.; S. N. MORENO. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. **Parasitol Today**, v.12, n.2, p.61-65. 1996.

DOS REIS, E. A., et al. Arginine administration inhibits hippocampal Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. **Brain Res**, v.951, n.2, p.151-157. 2002.

EDWARDS, F. A.; A. J. GIBB; D. COLQUHOUN. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. **Nature**, v.359, n.6391, p.144-147. 1992.

EGGERMONT, J., et al. Cellular function and control of volume-regulated anion channels. **Cell Biochem Biophys**, v.35, n.3, p.263-274. 2001.

ELAMIN, E. A.; M. O. EL BASHIR; E. M. SAEED. Prevalence and infection pattern of *Trypanosoma evansi* in camels in mid-eastern Sudan. **Trop Anim Health Prod**, v.30, n.2, p.107-114. 1998.

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

ENDRES, S.; J. W. VAN DER MEER; C. A. DINARELLO. Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. **Eur J Clin Invest**, v.17, n.6, p.469-474. 1987.

ERECINSKA, M.; I. A. SILVER. Ions and energy in mammalian brain. **Prog Neurobiol**, v.43, n.1, p.37-71. 1994.

FELDMANN, M. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. **J Clin Invest**, v.118, n.11, p.3533-3536. 2008.

FINCK, B. N.; R. W. JOHNSON. Anorexia, weight loss and increased plasma interleukin-6 caused by chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1beta in the rat. **Brain Res**, v.761, n.2, p.333-337. 1997.

FINKELSTEIN, Y.; D. MILATOVIC; M. ASCHNER. Modulation of cholinergic systems by manganese. **Neurotoxicology**, v.28, n.5, p.1003-1014. 2007.

FIORENTINO, D. F., et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol**, v.147, n.11, p.3815-3822. 1991.

FISKE, C. H.; Y. SUBBAROW. The Nature of the "Inorganic Phosphate" in Voluntary Muscle. **Science**, v.65, n.1686, p.401-403. 1927.

FLEGR, J., et al. Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v.113 (Pt 1), p.49-54. 1996.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem**, v.42, n.1, p.1-11. 1984.

FORDER, J. P.; M. TYMIANSKI. Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules. **Neuroscience**, v.158, n.1, p.293-300. 2009.

FRANCA, R. T., et al. Delta-aminolevulinatase activity in red blood cells of rats infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitology**, v.138, n.10, p.1272-1277. 2011.

FRANCIS, P. T., et al. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.66, n.2, p.137-147. 1999.

FRANKE, C. R.; M. GREINER; D. MEHLITZ. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). **Acta Trop**, v.58, n.2, p.159-169. 1994.

FRUSSA-FILHO, R., et al. Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments. **Psychopharmacology (Berl)**, v.147, n.2, p.168-173. 1999.

GAFTER, U., et al. Anemia of uremia is associated with reduced in vitro cytokine secretion: immunopotentiating activity of red blood cells. **Kidney Int**, v.45, n.1, p.224-231. 1994.

GANDHI, C. R.; D. H. ROSS. Characterization of a high-affinity Mg²⁺-independent Ca²⁺-ATPase from rat brain synaptosomal membranes. **J Neurochem**, v.50, n.1, p.248-256. 1988.

GAO, W.; M. A. PEREIRA. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol**, v.32, n.2, p.167-170. 2002.

GARTHWAITE, J.; C. L. BOULTON. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, v.57, p.683-706. 1995.

GAZZINELLI, R. T., et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **J Immunol**, v.157, n.2, p.798-805. 1996.

GENN, R. F., et al. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v.27, n.1-2, p.155-161. 2003.

GILLINGWATER, K.; P. BUSCHER; R. BRUN. Establishment of a panel of reference *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* strains for drug screening. **Vet Parasitol**, v.148, n.2, p.114-121. 2007.

GLUSHCHENKO, T. S.; N. L. IZVARINA. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in neurons and glial cells of the olfactory cortex of the rat brain during the development of long-term potentiation. **Neurosci Behav Physiol**, v.27, n.1, p.49-52. 1997.

GOEHLER, L. E., et al. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. **Auton Neurosci**, v.85, n.1-3, p.49-59. 2000.

GREENAMYRE, J. T.; R. H. PORTER. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. **Neurology**, v.44, n.11 Suppl 8, p.S7-13. 1994.

GUERRA, G. P., et al. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.186, n.2, p.150-158. 2006.

GUTIERREZ, C., et al. Clinical, hematological, and biochemical findings in an outbreak of abortion and neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels. **Ann N Y Acad Sci**, v.1081, p.325-327. 2006.

HABILA, N., et al. Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. **Res Vet Sci**, v.93, n.1, p.13-17. 2012.

HANAHISA, Y.; M. YAMAGUCHI. Increase of Ca²⁺-ATPase activity in the brain microsomes of rats with increasing ages: involvement of protein kinase C. **Brain Res Bull**, v.46, n.4, p.329-332. 1998.

HARTMANN, H.; A. ECKERT; W. E. MULLER. Disturbances of the neuronal calcium homeostasis in the aging nervous system. **Life Sci**, v.55, n.25-26, p.2011-2018. 1994.

HAWKING, F. The resistance of *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. evansi* to human plasma. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.72, n.4, p.405-407. 1978.

HEADLEY, P. M.; S. GRILLNER. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends Pharmacol Sci**, v.11, n.5, p.205-211. 1990.

HEINRICH, P. C.; J. V. CASTELL; T. ANDUS. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem J**, v.265, n.3, p.621-636. 1990.

HERRERA, H. M., et al. *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. **Vet Parasitol**, v.102, n.3, p.209-216. 2001.

HERRERA, H. M., et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Vet Parasitol**, v.125, n.3-4, p.263-275. 2004.

HERRERA, H. M., et al. Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.105, n.7, p.380-387. 2011.

HOLLAND, W. G., et al. The influence of *T. evansi* infection on the immunoresponsiveness of experimentally infected water buffaloes. **Vet Parasitol**, v.102, n.3, p.225-234. 2001.

HULME, E. C.; N. J. BIRDSALL; N. J. BUCKLEY. Muscarinic receptor subtypes. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.30, p.633-673. 1990.

ILLARIONOVA, N. B., et al. Functional and molecular interactions between aquaporins and Na,K-ATPase. **Neuroscience**, v.168, n.4, p.915-925. 2010.

IZQUIERDO, I., et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci**, v.29, n.9, p.496-505. 2006.

JAHN, T. L.; E. C. BOVEE. Movement and locomotion of microorganisms. **Annu Rev Microbiol**, v.19, p.21-58. 1965.

JENSEN, R. E.; L. SIMPSON; P. T. ENGLUND. What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. **Trends Parasitol**, v.24, n.10, p.428-431. 2008.

JIA, Y., et al. Trypanosoma evansi: identification and characterization of a variant surface glycoprotein lacking cysteine residues in its C-terminal domain. **Exp Parasitol**, v.127, n.1, p.100-106. 2011.

JOSHI, P. P., et al. Treatment and follow-up of the first case of human trypanosomiasis caused by Trypanosoma evansi in India. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.100, n.10, p.989-991. 2006.

JOSHI, P. P., et al. Human trypanosomiasis caused by Trypanosoma evansi in India: the first case report. **Am J Trop Med Hyg**, v.73, n.3, p.491-495. 2005.

KAMAL, M. A.; F. H. NASIM; A. A. AL-JAFARI. Human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by cis-diamminediaquaplatinum (II): a novel kinetic approach. **Cancer Lett**, v.138, n.1-2, p.115-119. 1999.

KARCZMAR, A. G. Cholinesterases (ChEs) and the cholinergic system in ontogenesis and phylogenesis, and non-classical roles of cholinesterases - a review. **Chem Biol Interact**, v.187, n.1-3, p.34-43. 2010.

KAUSHIK, M.; P. H. LAMBERTON; J. P. WEBSTER. The role of parasites and pathogens in influencing generalised anxiety and predation-related fear in the mammalian central nervous system. **Horm Behav**, v.62, n.3, p.191-201. 2012.

KAWASHIMA, K.; T. FUJII. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacol Ther**, v.86, n.1, p.29-48. 2000.

KAWASHIMA, K.; T. FUJII. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. **Front Biosci**, v.9, p.2063-2085. 2004.

KIHARA, T.; S. SHIMOHAMA. Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v.64, n.1, p.99-105. 2004.

KIMURA, R., et al. Nicotine-induced Ca²⁺ signaling and down-regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the CEM human leukemic T-cell line. **Life Sci**, v.72, n.18-19, p.2155-2158. 2003.

KOPF, M.; M. F. BACHMANN; B. J. MARSLAND. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. **Nat Rev Drug Discov**, v.9, n.9, p.703-718. 2010.

KRAUS-FRIEDMANN, N. Calcium sequestration in the liver. **Cell Calcium**, v.11, n.10, p.625-640. 1990.

KUHAD, A.; K. CHOPRA. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. **Eur J Pharmacol**, v.576, n.1-3, p.34-42. 2007.

KUNNUMAKKARA, A. B.; P. ANAND; B. B. AGGARWAL. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through

interaction with multiple cell signaling proteins. **Cancer Lett**, v.269, n.2, p.199-225. 2008.

LAAKE, J. H., et al. Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. **J Neurochem**, v.65, n.2, p.871-881. 1995.

LAI, D. H., et al. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, n.6, p.1999-2004. 2008.

LALONDE, R.; H. D. KIM; K. FUKUCHI. Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APP^{swe} + PS1/DeltaE9 mice. **Neurosci Lett**, v.369, n.2, p.156-161. 2004.

LAPIZ-BLUHM, M. D., et al. Behavioural assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. **J Neuroendocrinol**, v.20, n.10, p.1115-1137. 2008.

LAYER, P. G. Cholinesterases during development of the avian nervous system. **Cell Mol Neurobiol**, v.11, n.1, p.7-33. 1991.

LAYER, P. G.; T. WEIKERT; R. ALBER. Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. **Cell Tissue Res**, v.273, n.2, p.219-226. 1993.

LAYER, P. G.; E. WILLBOLD. Cholinesterases in avian neurogenesis. **Int Rev Cytol**, v.151, p.139-181. 1994.

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

LIAO, D.; J. SHEN. Studies of quinapyramine-resistance of *Trypanosoma brucei evansi* in China. **Acta Trop**, v.116, n.3, p.173-177. 2010.

LOTTI, M. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. **Clin Chem**, v.41, n.12 Pt 2, p.1814-1818. 1995.

LUCKINS, A. G. *Trypanosoma evansi* in Asia. **Parasitol Today**, v.4, n.5, p.137-142. 1988.

LUN, Z. R.; S. S. DESSER. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? **Parasitol Today**, v.11, n.4, p.131-133. 1995.

LUN, Z. R., et al. Trypanosomiasis of domestic animals in China. **Parasitol Today**, v.9, n.2, p.41-45. 1993.

LUN, Z. R., et al. Trypanosoma brucei: two steps to spread out from Africa. **Trends Parasitol**, v.26, n.9, p.424-427. 2010.

MABBOTT, N. A., et al. African trypanosome infections in mice that lack the interferon-gamma receptor gene: nitric oxide-dependent and -independent suppression of T-cell proliferative responses and the development of anaemia. **Immunology**, v.94, n.4, p.476-480. 1998.

MAGEZ, S., et al. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator in the regulation of experimental Trypanosoma brucei infections. **Infect Immun**, v.67, n.6, p.3128-3132. 1999.

MAGEZ, S., et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated Trypanosoma congolense parasite killing. **J Infect Dis**, v.196, n.6, p.954-962. 2007.

MAGEZ, S., et al. Interferon-gamma and nitric oxide in combination with antibodies are key protective host immune factors during trypanosoma congolense Tc13 Infections. **J Infect Dis**, v.193, n.11, p.1575-1583. 2006.

MAGNONI, M. S., et al. The aging brain: protein phosphorylation as a target of changes in neuronal function. **Life Sci**, v.48, n.5, p.373-385. 1991.

MAHESHWARI, R. K., et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life Sci**, v.78, n.18, p.2081-2087. 2006.

MANNA, P. T.; S. KELLY; M. C. FIELD. Adaptin evolution in kinetoplastids and emergence of the variant surface glycoprotein coat in African trypanosomatids. **Mol Phylogenet Evol**, v.67, n.1, p.123-128. 2013.

MARAGAKIS, N. J.; J. D. ROTHSTEIN. Glutamate transporters in neurologic disease. **Arch Neurol**, v.58, n.3, p.365-370. 2001.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; K. P. BELL; M. D. NORENBURG. Glutamine synthetase: glial localization in brain. **Science**, v.195, n.4284, p.1356-1358. 1977.

MASSOULIE, J.; S. BON. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annu Rev Neurosci**, v.5, p.57-106. 1982.

MASSOULIE, J., et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Prog Neurobiol**, v.41, n.1, p.31-91. 1993a.

MASSOULIE, J., et al. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Prog Brain Res**, v.98, p.139-146. 1993b.

MCKENNA, M. C. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. **J Neurosci Res**, v.85, n.15, p.3347-3358. 2007.

MEKATA, H., et al. Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. **Infect Genet Evol**, v.9, n.6, p.1301-1305. 2009.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v.130, n.4S Suppl, p.1007S-1015S. 2000.

MESULAM, M. M., et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v.110, n.4, p.627-639. 2002.

MICHEL, P. P., et al. Role of activity-dependent mechanisms in the control of dopaminergic neuron survival. **J Neurochem**, v.101, n.2, p.289-297. 2007.

MIJARES, A., et al. Immune detection of acetylcholinesterase in subcellular compartments of *Trypanosoma evansi*. **Parasitol Res**, v.108, n.1, p.1-5. 2011.

MILATOVIC, D.; W. D. DETTBARN. Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic, subacute paraoxon application in rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.136, n.1, p.20-28. 1996.

MONAGHAN, D. T.; R. J. BRIDGES; C. W. COTMAN. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.29, p.365-402. 1989.

MOORE, K. W., et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v.19, p.683-765. 2001.

MORCEAU, F.; M. DICATO; M. DIEDERICH. Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regarding molecular mechanisms of erythropoiesis. **Mediators Inflamm**, v.2009, p.405016. 2009.

MOSELEY, A. E., et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v.27, n.3, p.616-626. 2007.

MULLER, T. C., et al. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochim Biophys Acta**, v.1587, n.1, p.92-98. 2002.

NAESSENS, J., et al. Susceptibility of TNF-alpha-deficient mice to *Trypanosoma congolense* is not due to a defective antibody response. **Acta Trop**, v.92, n.3, p.193-203. 2004.

NEDERGAARD, M.; T. TAKANO; A. J. HANSEN. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nat Rev Neurosci**, v.3, n.9, p.748-755. 2002.

NICHOLLS, D.; D. ATTWELL. The release and uptake of excitatory amino acids. **Trends Pharmacol Sci**, v.11, n.11, p.462-468. 1990.

NOYES, H. A., et al. Mechanisms controlling anaemia in *Trypanosoma congolense* infected mice. **PLoS One**, v.4, n.4, p.e5170. 2009.

NUNES, V. L.; E. T. OSHIRO. *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.84, n.5, p.692. 1990.

O'SHEA, J. J.; P. J. MURRAY. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v.28, n.4, p.477-487. 2008.

OLIVEIRA, C. B., et al. *Trypanosoma evansi*: Activities of adenine nucleotide degradation enzymes in cerebral cortex of infected rats. **Exp Parasitol**, v.128, n.3, p.225-229. 2011.

OTTERSEN, O. P., et al. Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. **Prog Neurobiol**, v.54, n.2, p.127-148. 1998.

OTTO, M. A., et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to human blood and plasma in infected mice. **Vet Parasitol**, v.168, n.1-2, p.1-4. 2010.

OZAWA, S.; H. KAMIYA; K. TSUZUKI. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, v.54, n.5, p.581-618. 1998.

PAIM, F. C., et al. *Trypanosoma evansi*: concentration of 3-nitrotyrosine in the brain of infected rats. **Exp Parasitol**, v.129, n.1, p.27-30. 2011a.

PAIM, F. C., et al. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Exp Parasitol**, v.128, n.4, p.365-370. 2011b.

PASTI, L., et al. Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. **J Neurosci**, v.21, n.2, p.477-484. 2001.

PATHAK, K. M.; J. K. ARORA; M. KAPOOR. Camel trypanosomosis in Rajasthan, India. **Vet Parasitol**, v.49, n.2-4, p.319-323. 1993.

PAULNOCK, D. M.; S. P. COLLIER. Analysis of macrophage activation in African trypanosomiasis. **J Leukoc Biol**, v.69, n.5, p.685-690. 2001.

PAVLOV, V. A.; K. J. TRACEY. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain Behav Immun**, v.19, n.6, p.493-499. 2005.

PAVLOV, V. A.; K. J. TRACEY. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Biochem Soc Trans**, v.34, n.Pt 6, p.1037-1040. 2006.

PAVLOV, V. A., et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Mol Med**, v.9, n.5-8, p.125-134. 2003.

PORTILLO, R., et al. *Trypanosoma evansi*: pharmacological evidence of a nicotinic acetylcholine receptor. **Exp Parasitol**, v.125, n.2, p.100-105. 2011.

POURJAFAR, M., et al. Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* in Iranian dromedary camels. **Parasitol Res**, v.112, n.2, p.899-903. 2012.

PRADO, M. A., et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochem Int**, v.41, n.5, p.291-299. 2002.

PRAST, H.; A. PHILIPPU. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol**, v.64, n.1, p.51-68. 2001.

PRICE, D. L. New order from neurological disorders. **Nature**, v.399, n.6738 Suppl, p.A3-5. 1999.

QUEIROZ, A. O.; P. H. CABELLO; A. M. JANSEN. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso-Brazil. **Vet Parasitol**, v.92, n.2, p.107-118. 2000.

QUEIROZ, A. O., et al. Specific antibody levels and antigenic recognition of Wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, p.965-972. 2001.

RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. **Acta Biol Hung**, v.54, n.2, p.183-189. 2003.

RAKONCZAY, Z., et al. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chem Biol Interact**, v.157-158, p.233-238. 2005.

REARDON, C., et al. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.110, n.4, p.1410-1415. 2013.

REED, S. G.; D. L. PIHL; K. H. GRABSTEIN. Immune deficiency in chronic *Trypanosoma cruzi* infection. Recombinant IL-1 restores Th function for antibody production. **J Immunol**, v.142, n.6, p.2067-2071. 1989.

REID, G. A.; N. CHILUKURI; S. DARVESH. Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. **Neuroscience**, v.234, p.53-68. 2013.

RODRIGUES, A., et al. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Vet Pathol**, v.46, n.2, p.251-258. 2009.

ROHN, T. T.; T. R. HINDS; F. F. VINCENZI. Ion transport ATPases as targets for free radical damage. Protection by an aminosteroid of the Ca²⁺ pump ATPase and Na⁺/K⁺ pump ATPase of human red blood cell membranes. **Biochem Pharmacol**, v.46, n.3, p.525-534. 1993.

ROSENBERRY, T. L. Acetylcholinesterase. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v.43, p.103-218. 1975.

ROTHMAN, S. M.; J. W. OLNEY. Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. **Trends Neurosci**, v.18, n.2, p.57-58. 1995.

RUBIN, M. A., et al. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **J Neurosci**, v.24, n.9, p.2328-2334. 2004.

SALIM, B., et al. Population genetics of *Trypanosoma evansi* from camel in the Sudan. **PLoS Negl Trop Dis**, v.5, n.6, p.e1196. 2011.

SATTLER, R., et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. **Science**, v.284, n.5421, p.1845-1848. 1999.

SCHMIDT, A. P., et al. Antinociceptive effects of intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: evidences for the mechanism of action. **Brain Res**, v.1234, p.50-58. 2008.

SCHMUNIS, G. Status of and cost of Chagas disease worldwide. **Lancet Infect Dis**. 2013.

SCHOUSBOE, A.; H. S. WAAGEPETERSEN. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. **Neurotox Res**, v.8, n.3-4, p.221-225. 2005.

SCHWEIGERT, I. D., et al. Gestational and postnatal malnutrition affects sensitivity of young rats to picrotoxin and quinolinic acid and uptake of GABA by cortical and hippocampal slices. **Brain Res Dev Brain Res**, v.154, n.2, p.177-185. 2005.

SCURI, R., et al. Inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase potentiates synaptic transmission in tactile sensory neurons of the leech. **Eur J Neurosci**, v.25, n.1, p.159-167. 2007.

SEAMAN, G. R.; R. K. HOULIHAN. Enzyme systems in *Tetrahymena geleii* S. II. Acetylcholinesterase activity; its relation to motility of the organism and to coordinated ciliary action in general. **J Cell Physiol**, v.37, n.2, p.309-321. 1951.

SEGOVIA, G., et al. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mech Ageing Dev**, v.122, n.1, p.1-29. 2001.

SEIDL, A. F.; A. S. MORAES; R. A. SILVA. *Trypanosoma evansi* control and horse mortality in the Brazilian Pantanal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.5, p.599-602. 2001.

SHEGOKAR, V. R., et al. Short report: Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in a village in India: preliminary serologic survey of the local population. **Am J Trop Med Hyg**, v.75, n.5, p.869-870. 2006.

SHEHZAD, A.; G. REHMAN; Y. S. LEE. Curcumin in inflammatory diseases. **Biofactors**, v.39, n.1, p.69-77. 2013.

SILEGHEM, M., et al. Modulation of IL-1 production and IL-1 release during experimental trypanosome infections. **Immunology**, v.68, n.1, p.137-139. 1989.

SILMAN, I.; J. L. SUSSMAN. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Curr Opin Pharmacol**, v.5, n.3, p.293-302. 2005.

SILVA, R. A., et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Vet Parasitol**, v.60, n.1-2, p.167-171. 1995.

SILVA-ITURRIZA, A., et al. *Trypanosoma evansi* kDNA minicircle found in the Venezuelan nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* (Glossophaginae), supports the hypothesis of multiple origins of that parasite in South America. **Parasitol Int**. 2013.

SINGH, P., et al. Prolonged glutamate excitotoxicity: effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes. **Mol Cell Biochem**, v.243, n.1-2, p.139-145. 2003.

SMITH, S. J.; A. B. MACDERMOTT; F. F. WEIGHT. Detection of intracellular Ca²⁺ transients in sympathetic neurones using arsenazo III. **Nature**, v.304, n.5924, p.350-352. 1983.

SOREQ, H., et al. Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.17, p.7907-7911. 1994.

SOREQ, H.; S. SEIDMAN. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci**, v.2, n.4, p.294-302. 2001.

SRIVASTAVA, R. M., et al. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. **Int Immunopharmacol**, v.11, n.3, p.331-341. 2011.

STERNBERG, J. M., et al. Meningoencephalitic African trypanosomiasis: Brain IL-10 and IL-6 are associated with protection from neuro-inflammatory pathology. **J Neuroimmunol**, v.167, n.1-2, p.81-89. 2005.

SUMBA, A. L.; S. MIHOK; F. A. OYIEKE. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. **Med Vet Entomol**, v.12, n.4, p.417-422. 1998.

TABB, J. S., et al. Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. **J Biol Chem**, v.267, n.22, p.15412-15418. 1992.

TANIGUCHI, S., et al. Interferon gamma downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells. **Blood**, v.90, n.6, p.2244-2252. 1997.

TAVARES, K. C., et al. Cryopreservation of *Trypanosoma evansi* after DEAE-cellulose purification: Evaluation of infective parameters. **Res Vet Sci**, v.90, n.2, p.257-259. 2010.

TAYLOR, M. C.; J. M. KELLY. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. **Parasitology**, v.137, n.6, p.899-917. 2010.

TERRY, A. V., JR.; J. J. BUCCAFUSCO. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. **J Pharmacol Exp Ther**, v.306, n.3, p.821-827. 2003.

TOMASSINI, V., et al. Neuroplasticity and functional recovery in multiple sclerosis. **Nat Rev Neurol**. 2012.

TONIN, A. A., et al. Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of *Trypanosoma evansi* infection in rats. **Exp Parasitol**, v.128, n.3, p.243-249. 2011.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n.6917, p.853-859. 2002.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Clin Invest**, v.117, n.2, p.289-296. 2007.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.6, p.418-428. 2009.

TRAYHURN, P.; I. S. WOOD. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**, v.92, n.3, p.347-355. 2004.

TREVISAN, G., et al. Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloids. **J Nat Prod**, v.72, n.4, p.608-612. 2009.

TSUTSUKI, H., et al. Nitric oxide inhibits depolarization-evoked glutamate release from rat cerebellar granule cells. **Nitric Oxide**, v.16, n.2, p.217-227. 2007.

TUNTASUVAN, D., et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. **Vet Parasitol**, v.87, n.2-3, p.223-230. 2000.

TUNTASUVAN, D.; N. SARATAPHAN; H. NISHIKAWA. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Vet Parasitol**, v.73, n.3-4, p.357-363. 1997.

VAN DEN BERG, C. J.; D. GARFINKEL. A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. **Biochem J**, v.123, n.2, p.211-218. 1971.

VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annu Rev Immunol**, v.8, p.253-278. 1990.

VANHAMME, L., et al. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. **Nature**, v.422, n.6927, p.83-87. 2003.

VANHOLLEBEKE, B., et al. Human Trypanosoma evansi infection linked to a lack of apolipoprotein L-I. **N Engl J Med**, v.355, n.26, p.2752-2756. 2006.

VENET, F., et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. **J Leukoc Biol**, v.83, n.3, p.523-535. 2008.

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. **J Parasitol**, v.86, n.6, p.1289-1298. 2000.

VILLAFLORES, O. B., et al. Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v.51, n.4, p.515-525. 2012.

VINCENDEAU, P.; B. BOUTEILLE. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. **An Acad Bras Cienc**, v.78, n.4, p.645-665. 2006.

WARR, O.; M. TAKAHASHI; D. ATTWELL. Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. **J Physiol**, v.514 (Pt 3), p.783-793. 1999.

WATANABE, T., et al. Facilitation of memory impairment and cholinergic disturbance in a mouse model of Alzheimer's disease by mild ischemic burden. **Neurosci Lett**, v.536, p.74-79. 2013.

WATKINS, J. C.; P. KROGSGAARD-LARSEN; T. HONORE. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. **Trends Pharmacol Sci**, v.11, n.1, p.25-33. 1990.

WATKINS, L. R., et al. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neurosci Lett**, v.183, n.1-2, p.27-31. 1995.

WEBSTER, J. P., et al. Toxoplasma gondii infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour? **J Exp Biol**, v.216, n.Pt 1, p.99-112. 2012.

WITOLA, W. H., et al. RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in Trypanosoma evansi confers resistance to diminazene aceturate. **Exp Parasitol**, v.107, n.1-2, p.47-57. 2004.

WOLKMER, P., et al. Erythropoietic response in Trypanosoma evansi infected rats with different parasitaemia intensity **Cienc. Rural**, v.37, n.6, p.1682-1687. 2007.

WOLKMER, P., et al. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with Trypanosoma evansi. **Vet Parasitol**, v.165, n.1-2, p.41-46. 2009.

WOLKMER, P., et al. Biochemistry detection of acetylcholinesterase activity in *Trypanosoma evansi* and possible functional correlations. **Exp Parasitol**, v.132, n.4, p.546-549. 2012a.

WOLKMER, P., et al. Pre-treatment with curcumin modulates acetylcholinesterase activity and proinflammatory cytokines in rats infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitol Int**. 2012b.

WOLKMER, P., et al. *Trypanosoma evansi* infection on levels of copper, iron, and zinc in the plasma of rats. **Comp. Clin. Pathol.**, v.in press, p.1-7. 2012c.

WOLKMER, P., et al. *Trypanosoma evansi*: cholinesterase activity in acutely infected Wistar rats. **Exp Parasitol**, v.125, n.3, p.251-255. 2010.

WOOLF, N. J. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. **Prog Neurobiol**, v.37, n.6, p.475-524. 1991.

WYSE, A. T., et al. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. **Physiol Behav**, v.80, n.4, p.475-479. 2004.

WYSE, A. T., et al. Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. **Neuroreport**, v.11, n.10, p.2331-2334. 2000.

XIE, W., et al. Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. **J Pharmacol Exp Ther**, v.293, n.3, p.896-902. 2000.

XONG, H. V., et al. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. **Cell**, v.95, n.6, p.839-846. 1998.

YADAV, S. C., et al. Identification and characterization of cysteine proteinases of *Trypanosoma evansi*. **Parasitol Res**, v.109, n.3, p.559-565. 2011.

YOUNG, A. B.; G. E. FAGG. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. **Trends Pharmacol Sci**, v.11, n.3, p.126-133. 1990.

ZAMBRANO-VILLA, S., et al. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol**, v.18, n.6, p.272-278. 2002.

ZHANG, Z. Q.; C. GIROUD; T. BALTZ. *Trypanosoma evansi*: in vivo and in vitro determination of trypanocide resistance profiles. **Exp Parasitol**, v.77, n.4, p.387-394. 1993.

ZHOU, J., et al. Resistance to drug by different isolates *Trypanosoma evansi* in China. **Acta Trop**, v.90, n.3, p.271-275. 2004.

ZWEYGARTH, E.; R. KAMINSKY; P. WEBSTER. *Trypanosoma brucei evansi*: dyskinesia and loss of infectivity after long-term in vitro cultivation. **Acta Trop**, v.48, n.2, p.95-99. 1990

