

# VIA INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA EM CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *RICKETTSIA* *PARKERI*: DADOS PRELIMINARES

FERREIRA, Eduarda Pacheco Talleyrand<sup>1</sup>; WOLKMER, Patricia<sup>2</sup>; PALMA, Heloisa<sup>2</sup>;  
SOARES, João<sup>3</sup>; GALLIO, Miguel<sup>4</sup>; MORAES, Bibiana Telo<sup>5</sup>; ZALAMENA, Fernanda<sup>5</sup>;  
FRASSON, Letícia<sup>5</sup>; FAVARETTO, Bruna Peruzzo<sup>5</sup>; DOS SANTOS, Tassiana Bourscheid<sup>5</sup>

## Introdução

*Rickettsia spp.* são bactérias (cocobacilos), pertencentes à ordem Rickettsiales e da família *Rickettsiaceae* (RAOULT; ROUX, 1997). As riquetsias patogênicas constituem um grupo de microrganismos com características de bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias responsáveis por várias doenças conhecidas como riquetsioses, que são transmitidas ao homem por meio da picada de artrópodes hematófagos, tais como carrapato, pulga e piolho. Relatos no Brasil indicam a presença de uma nova cepa de riquetsia, a qual foi denominada de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica), devido a sua similaridade filogenética com *R. parkeri*. Esta nova cepa foi isolada a partir de amostra de pele do local da picada do carrapato, de um paciente com uma doença febril exantemática em área de Mata Atlântica no município de Peruíbe, SP (SPOLIDORIO *et al.*, 2010).

Esta patologia em cães parece ser assintomática, porem os animais podem permanecer como reservatório, podendo transmitir ao homem através do carrapato. Associado a isso, diversos estudos têm demonstrado a atuação do sistema colinérgico no controle do processo inflamatório através das ações da acetilcolina na via colinérgica anti-inflamatória. O sistema colinérgico tem um papel fundamental em várias funções vitais, como o aprendizado, a memória e a organização cortical do movimento (MESULAM *et al.*, 2002). A mecânica de funcionamento, do sistema colinérgico se dá por uma estreita relação entre a sua principal molécula, a acetilcolina (ACh), com as colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Estas enzimas fazem a regulação das concentrações da ACh, e

<sup>1</sup> Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), Bolsista PAPCT 2016. Email: dudapacheco91@hotmail.com

<sup>2</sup> Docente do curso de Medicina Veterinária da UNICRUZ.

<sup>3</sup> Docente do curso de Medicina Veterinária da UFRGS. Email: jfsvet@gmail.com

<sup>4</sup> Aluno do programa de pós graduação em Medicina Veterinária da UFSM

<sup>5</sup> Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Cruz Alta

esta ação pode levar a diferentes situações fisiológicas, dentre as quais a modulação de processos inflamatórios (DAS, 2007). A via colinérgica anti-inflamatória é mediada pela ACh, cuja atuação se dá por uma inibição a produção de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF). A ACh regula os níveis da serotonina, dopamina e de outros neuropeptídeos e, portanto, modula tanto a resposta imune como a neurotransmissão (KAWASHIMA; FUJII, 2003).

Assim, buscando compreender sua patogenia e os mínimos sinais da infecção por esta bactéria em cães, este trabalho busca avaliar a atividade da acetilcolinesterase nos linfócitos dos cães frente à infecção por *R. parkeri*.

## Metodologia

Foram utilizados seis cães sem raça definida (SRD), (machos e fêmeas), provenientes do canil da Universidade de Cruz Alta, localizado no Campus Universitário Ulysses Guimarães. Os seis cães foram divididos em dois grupos, controle e infectado. O grupo controle foi composto por dois cães sendo o primeiro (controle 1) apenas mantido sob as mesmas condições dos demais cães utilizados no experimento, enquanto o segundo foi infestado por carrapatos da espécie *Amblyomma ovale* livres de patógenos (controle 2). No grupo infectado, quatro cães foram infestados com carrapatos da espécie *A. ovale* infectados com *Rickettsia parkeri*. Os cães de ambos os grupos passaram por avaliação clínica diária. Também foram alimentados com ração comercial de acordo com o peso individual e receberam água *ad libitum*.

A cada quatro dias os cães foram submetidos a coleta de sangue e soro por punção intravenosa, utilizando-se seringas hipodérmicas com agulhas 25 x 7mm, a fim de que as técnicas descritas abaixo fossem realizadas. As coletas foram realizadas até 12 dias pós inoculação (PI), sendo realizadas no dia zero (D0), dia quatro PI (D4), dia 8 PI(D8) e dia doze PI (D12).

Cada cão infestado, teve seu dorso tricotomizado com tosquiadeira própria para pelagem canina. Na área tricotomizada, uma câmara de pano de algodão, com diâmetro de 10 cm, teve suas bordas coladas à pele canina com cola adesiva (Kamar heat detector adhesive, marca Kamar, Steamboat Springs, Colorado, USA) própria para pele animal. Os cães foram mantidos com colar elizabetano para impedir a retirada da câmara e escape dos carrapatos, somente no período de ingurgitamento dos ixodídeos, sendo que, os colares foram removidos no restante do período de acompanhamento dos cães.

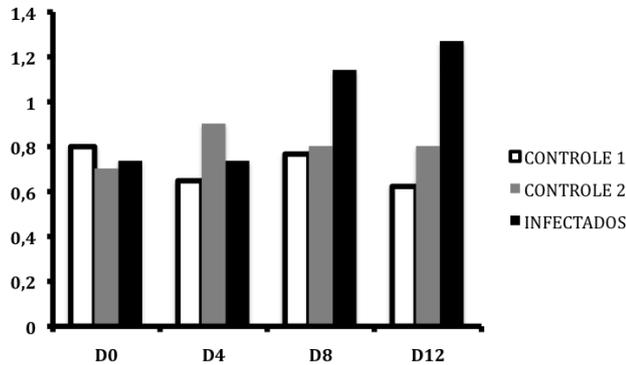
Amostras de soros coletadas no dia zero da infestação e das coletas posteriores foram enviados ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ da Universidade de São Paulo – USP para realização Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) frente ao antígeno de *R. parkeri* amostra At 24 (SILVEIRA *et al.*, 2007), conforme técnica previamente descrita (HORTA *et al.* 2004, 2007). Soros controles positivos e negativos empregados nas reações serão oriundos da soroteca do estudo realizado por Ogrzewalska *et al.*, (2012).

Os linfócitos foram isolados do sangue coletado com EDTA por um gradiente de densidade Ficol-Histopaque segundo método de Böyum (1968). Após o isolamento dos linfócitos a atividade da AChE foi determinada de acordo com o método descrito por ELLMAN *et al.* (1961) modificado por Fritzgerald na Costa (1993). A atividade da AChE nos linfócitos foi expressa em AcSCh/h/mg de proteína.

## **Resultados e Discussão**

No período que antecedeu a inoculação e PI, nenhum sinal clínico foi observado nos animais. Todos os animais inoculados tiveram sorologia positiva para *R. parkeri*. Não foram encontrados soro reagentes nos animais do grupo controle. A Figura 1 apresenta os resultados parciais da atividade da AChE nos linfócitos, pode ser observado um aumento atividade enzimática, marcando uma ação inflamatória, reduzindo a ACh livre, para se ligar aos linfócitos. Sabe-se que a acetilcolina é produzida dentro dos linfócitos (KAWASHIMA; FUJII, 2003). De acordo com Kawashima e Fujii (2003), por ligação de ACh aumenta citotoxicidade de linfócitos, aumentar o seu teor de cGMP e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), e modulam a síntese de DNA e proliferação celular, apoiando a idéia que o sistema colinérgico está envolvido linfocítica na regulação da função imune.

Figura 1: Atividade da acetilcolinesterase em linfócitos de cães infectados experimentalmente com *Rickettsia parkeri*. As coletas foram no dia zero (D0), dia quatro (D4), dia 8 (D8) e dia doze (D12) pós infecção. Infectados n=4; Controle 1 - cão controle, sem carrapato n=1; Controle 2 - infestado por carrapatos da espécie *Amblyomma ovale* livres de patógenos



### Considerações finais

Com este trabalho demonstramos que a infecção altera a atividade da acetilcolinesterase nos linfócitos dos animais infectados. Quando o processo inflamatório é de grau leve e localizado em órgãos internos é difícil detectar e confirmar a presença de inflamação. Isso é verdade, especialmente quando ocorre inflamação sistêmica leve. Assim, devido ao caráter zoonótico da riquetsiose e as perdas econômicas geradas por esta doença, novas pesquisas são de fundamental importância.

### Referência Bibliográficas

- BÖYUM, A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum, v. 97, p. 31, 1968.
- CARDOSO, L. D; FREITAS, R. N; MAFRA, C. L. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.
- DAS U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. Medical Science Monitor, v. 13, n. 12, 2007.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, v.7, p. 88-95, 1961.
- KAWASHIMA, Koichiro; FUJII, Takeshi. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. Life sciences, v. 74, n. 6, p. 675-696, 2003.

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

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

SPOLIDORIO, M. G.; et al. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 3, p. 521-523, 2010.