UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO NA PITIOSE EXPERIMENTAL EM COELHOS TRATADOS COM IMUNOTERÁPICO

TESE DE DOUTORADO

BARBARA CHARLOTTE BACH

Santa Maria, RS, Brasil

2012

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO NA PITIOSE EXPERIMENTAL EM COELHOS TRATADOS COM IMUNOTERÁPICO

BARBARA CHARLOTTE BACH

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**.

Orientador: Prof. (Dr.) Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS, Brasil

2012
Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

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

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO NA PITIOSE EXPERIMENTAL EM COELHOS TRATADOS COM IMUNOTERÁPICO

elaborada por
Barbara Charlotte Bach

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

_____

Janio Morais Santurio, Dr.
(Presidente/Orientador)

_____

Cleci Menezes Moreira, Drª. (UNIPAMPA)

_____

Laerte Ferreiro, Dr. (UFRGS)

_____

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

_____

Érico Silva de Loreto, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2012.

Dedico este trabalho à minha irmã Ursula Brigitta Bach

(In memoriam)

"Não basta dar os passos que nos devem levar um dia ao objetivo.
Cada passo deve ser ele próprio um objetivo em si mesmo,
ao mesmo tempo em que nos leva para diante."

Johann Wolfgang Von Goethe

SINCEROS AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por me amparar em todos os momentos.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia.

Ao meu orientador Prof. Janio Morais Santurio por abrir as portas do LAPEMI, por acreditar em mim e assim tornar possível este trabalho. Com maior apreço agradeço pela orientação, pelas oportunidades, pelo apoio e amizade.

A Prof.ª. Daniela Bitencourt Rosa Leal pela amizade, apoio, incentivo e por estar sempre disponível para ensinar e orientar. Com admiração o meu muito obrigada.

Ao Prof. Sydney Hartz Alves pelas sugestões e constante incentivo.

Aos colegas docentes e técnicos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, que nos acompanharam neste projeto e tem no seu cotidiano o ensino e a pesquisa.

Aos colegas da disciplina de imunologia, Prof.ª Cybele Esteves Almeida, Prof. Juan Guadalupe Cortes e a farmacêutica Rosmarina Passos Correa, um agradecimento especial pelo apoio recebido.

A todos que fazem parte da equipe do LAPEMI, em especial ao Dr. Erico Silva de Loreto e ao colega e aluno de pós-graduação Regis Zanette.

Aos alunos do Laboratório de Pesquisas do DEMIP, em especial os colegas e alunos de pós-graduação, Viviane do Carmo Gonçalves Souza e Jeandre Augusto dos Santos.

A todos os colegas e professores do Programa de Pós Graduação em Farmacologia.

A Prof.ª Valéria Maria Lara Carregaro pela amizade e muita força, principalmente no início do doutorado.

Ao meu pai Heinz Bach pelo apoio, exemplo de luta, mostrando que nunca devemos desistir.

A minha mãe e meu padrinho Elsa e Harald von Borries que sempre me incentivaram com muito amor.

As minhas filhas Andrea, Claudia e Daniela que são o meu maior tesouro.

Ao amigo Hans Rieks pelo incentivo que vem da Alemanha.

Ao meu amigo e companheiro Ricardo Fernando Michel por estar do meu lado em todos os momentos.

Aos amigos e a todas as pessoas que, embora não citados, me apoiaram e incentivaram em diferentes momentos.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO NA PITIOSE EXPERIMENTAL EM COELHOS TRATADOS COM IMUNOTERÁPICO

Autora: BARBARA CHARLOTTE BACH
Orientador: Prof. Dr. JANIO MORAIS SANTURIO
Data e local de Defesa: Santa Maria, 19 de Dezembro de 2012.

.

A pitiose é uma doença causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* que acomete equinos, bovinos, ovinos, felinos e seres humanos, e ocorre em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Em equinos as lesões são caracterizadas por granulomas eosinofílicos ulcerados. A maioria das drogas antifúngicas é ineficaz contra este patógeno e a imunoterapia tem se mostrado promissora na regressão da doença, mesmo sem a elucidação completa dos mecanismos imunes envolvidos. O sistema purinérgico, através dos nucleotídeos de adenina (ATP e ADP) e seu derivado nucleosídeo (adenosina), desempenha um importante papel na modulação da resposta imune e inflamatória. Uma vez liberados pelas células, os nucleotídeos interagem com receptores específicos e suas concentrações extracelulares são controladas por um grupo de ecto-enzimas, entre as quais estão a E-NTPDase (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase) e ADA (adenosina desaminase). Levando-se em conta a importância da imunoterapia no tratamento da pitiose e uma possível participação da sinalização purinérgica na resposta imune, foram avaliadas as atividades das ecto-enzimas NTPDase e ADA em linfócitos de coelhos com pitiose experimental. Para a indução da doença, zoósporos foram inoculados por via subcutânea, na região lateral do tórax, de cada coelho. Os coelhos inoculados foram avaliados semanalmente e a área nodular (cm^2) desenvolvida foi determinada após 28 dias da inoculação. Os animais com pitiose experimental, confirmada por teste imunoenzimático e pelo desenvolvimento de lesão característica, foram tratados com imunoterápico, sendo que a relação entre as atividades enzimáticas nos linfócitos e o tipo de resposta imune foi investigada. Os animais que não desenvolveram lesão e os animais do grupo controle mostraram o mesmo padrão de atividade das ecto-enzimas. A atividade da E-NTPDase nos linfócitos dos coelhos com pitiose experimental mostrou-se significativamente maior ($p<0,001$) em relação à hidrólise

de ATP (em cerca de 100%), podendo estar relacionada à diminuição ($p<0,05$) da concentração sérica de ATP (54,04%), quando comparado ao grupo controle. Após o tratamento com o imunoterápico, a atividade da E-NTPDase apresentou valores semelhantes aqueles observados no dia da inoculação. Por outro lado, os coelhos com pitiose experimental apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,01$) na atividade da E-ADA (82,36%), o que levaria a um importante aumento na concentração extracelular de adenosina (2,51 vezes) em relação ao grupo controle ($p<0,01$). Após a imunoterapia, este grupo de animais apresentou um aumento significativo na atividade da E-ADA (78,62%) ($p<0,01$). Através deste estudo, pode-se observar que a atividade aumentada da E-NTPDase e a atividade diminuída da E-ADA, durante a pitiose, levam à regulação da concentração do ATP e da adenosina no meio extracelular. Em conseqüência, baixos níveis extracelulares de ATP poderiam ativar receptores P2Y, enquanto, altos níveis de adenosina poderiam ativar receptores A_{2A} e/ou A_{2B} desencadeando uma resposta T_H2, responsável pelos danos teciduais gerados na infecção. Com a imunoterapia, pode-se observar uma inversão no comportamento das atividades enzimáticas, estimulando uma resposta T_H1 no hospedeiro. A mudança de uma resposta T_H2, responsável pelas lesões que ocorrem na pitiose, para um padrão de resposta T_H1, é hipótese mais aceita para explicar as propriedades curativas da imunoterapia. Dessa forma, sugere-se a participação do sistema purinérgico no padrão de resposta imune que ocorre durante a pitiose e após a imunoterapia.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum,* pitiose, ATP, adenosina, sistema purinérgico, LT_H1, resposta imunológica, imunoterapia.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Post-Graduating Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EVALUATION OF THE PURINERGIC SYSTEM IN RABBITS WITH EXPERIMENTAL PYTHIOSIS TREATED BY IMMUNOTHERAPY

Author: BARBARA CHARLOTTE BACH
Advisor: JANIO MORAIS SANTURIO
Place and Date: Santa Maria, December 19th, 2012.

Pythiosis is a disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum* that affects horses, cattle, sheep, cats and humans, and occurs in tropical, subtropical and temperate regions. In horses the lesions are characterized by ulcerative eosinophilic granulomas. Most drugs are ineffective against this pathogen and immunotherapy has shown promise in the regression of the disease, even without the complete elucidation of the immune mechanisms involved. The purinergic system via adenine nucleotides (ATP and ADP) and its derivated nucleoside (adenosine), plays an important role in modulating the immune and inflammatory responses. Once released by cells, nucleotides interact with specific receptors and their extracellular concentrations are controlled by a group of ecto-enzymes, among which are E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) and ADA (adenosine deaminase). Taking into account the importance of immunotherapy in the treatment of pythiosis and a possible involvement of purinergic signaling in the immune response, the activities of E-NTPDase and E-ADA were evaluated in lymphocytes of rabbits with experimental pythiosis. For disease induction, zoospores were inoculated, subcutaneously, in the lateral region of the torax of each rabbit. These animals were evaluated weekly and the nodular area (cm^2) developed was determined after 28 days of inoculation. Animals with experimental pythiosis, confirmed by enzyme immunoassay and the development of characteristic lesions, were treated with immunotherapy, whereas the ratio between the enzymatic activity in lymphopcytes and the consequent triggered immune response was investigated. Animals that did not develop lesions and those from the control group showed the same pattern of ectoenzymatic activity. E-NTPDase activity in lymphocytes of rabbits

with experimental pythiosis was significantly higher ($p<0,001$) in relation to ATP hydrolysis (about 100%) and may be related to decreased ($p<0,05$) serum ATP (54,04%), when compared to the control group. After immunotherapeutic treatment, the activity of E-NTPDase showed similar values to those observed on the day of inoculation. Moreover, rabbits with experimental pythiosis showed a significant decrease ($p<0,01$) in the activity of E-ADA (82,36%), and this would lead to a significant increase in the extracellular concentration of adenosine (2,51 times), in relation to the control group ($p<0,01$). After immunotherapy, this group of animals showed a significant increase in the activity of E-ADA (78,62%) ($p<0,01$). Through this study, it can be observed that an increased activity of E-ADA, during pythiosis, leads to extracellular regulation of ATP and adenosine concentration. As a result, low levels of extracellular ATP could activate P2Y receptors, while high levels of extracellular adenosine may activate A_{2A} and/or A_{2B} receptors, triggering a T_H2 response, responsible for the tissue damage generated by infection. After immunotherapy, it can be observed an inversion in the behaviour of the enzymatic activities, stimulating a T_H1 response in the host. The switch from a T_H2 response, responsible for the injuries that occur on pythiosis, to a T_H1 response, is the most accepted hypothesis to explain the healing properties of immunotherapy. Thus, it is suggested the involvement of purinergic system in the pattern of immune response that occurs during pythiosis and after immunotherapy.

Keywords: *Pythium insidiosum*, pythiosis, ATP, adenosine, purinergic system, LT_H1, immune response, immunotherapy,

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1- Equinos em seu habitat no Pantanal Matogrossense..... 19
Figura 2- Esquema do ciclo biológico do *Pythium insidiosum*..... 21
Figura 3- Gramíneas inoculadas com *P. insidiosum* – formação dos esporângios contendo os zoósporos. 22
Figura 4- Lesão em equino causada pelo *P. insidiosum* (forma cutânea)..... 23
Figura 5- Kunkers obtidos de um cavalo com pitiose..... 23
Figura 6- Coelho inoculado com zoósporos de *P. insidiosum*..... 26
Figura 7- Funções das células Th1 e Th2 28
Figura 8- *P. insidiosum* em meio de cultura..... 30
Figura 9- Imunoterápico para tratamento da pitiose em equinos obtido da massa micelial inativada e vortexada..... 33
Figura 10- Tratamento imunoterápico na pitiose equina..... 33
Figura 11- Provável explicação para a cura da pitiose pela imunoterapia..... 34
Figura 12- Via de sinalização purinérgica..... 36
Figura 13- Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina..... 37

ARTIGO 1

Figure 1- ATP hydrolysis in lymphocytes obtained from the control group, the inoculated group without lesions and the inoculated group with lesions. Data represent the mean value ± standard error of 10, 20 and 10 rabbits, respectively. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Groups that 46

share different letters are statistically different (*P*<0.001).

Figure 2- ATP hydrolysis in lymphocytes from the group with lesions on different days after inoculation. Data represent the mean value ± standard error of 10 rabbits. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Groups that share different letters are statistically different (*P*<0.001). 46

Figure 3- ATP hydrolysis in lymphocytes obtained from the group with lesions on days 0 and 28 after inoculation and after four doses of immunotherapy. Data represent the mean value ± standard error of 10 rabbits. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Groups that share different letters are statistically different (*P*<0.001). 46

Figure 4- Effect of extracellular ATP concentrations on the immune response during pythiosis and immunotherapy. The increased NTPDase activity during pythiosis decreases the extracellular ATP concentration, which can bind to P2Y receptors, as can ADP. Consequently, a Th2 response could develop and cause tissues damage. With immunotherapy, the decreased NTPDase activity could lead to an increased concentration of extracellular ATP that would act on P2X7 receptors, stimulating a Th1 immune response and inducing inflammatory mediators that would initiate the destruction of *Pythium insidiosum* hyphae. 47

ARTIGO 2

Figure 1- Ecto-adenosine deaminase (E-ADA) activity in lymphocytes obtained from normal rabbits (control), rabbits without characteristic pythiosis lesions (I), rabbits with characteristic pythiosis lesions after 28 days of 53

inoculation (II). Data represent the mean ± SEM of 6, 12 and 12 rabbits, respectively. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Groups with different letters are significantly different (*P*<0.01).

Figure 2- Ecto-adenosine deaminase (E-ADA) activity in lymphocytes obtained from normal rabbits (control), rabbits without characteristic pythiosis lesions (I), rabbits with lesions treated with eight doses of immunotherapy (II). Data represent the mean ± SEM of 6, 12 and 6 rabbits, respectively. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Groups with different letters are significantly different (*P*<0.01). 54

Figure 3- Effects of extracellular adenosine triphosphate (ATP) and adenosine concentrations on the immune response during pythiosis and immunotherapy. The increased E-NTPDase activity and decreased ectoadenosine deaminase (E-ADA) activity during pythiosis lead to a decrease in the concentration of extracellular ATP and an increase in the extracellular adenosine concentration, respectively. Decreased extracellular ATP levels can bind to P2Y receptors, as can adenosine diphosphate (ADP), whereas increased extracellular adenosine can bind to A2A or/and A2B receptors. The involvement of a Th2-like immune response in the infected host and a Th1-like immune response induced by immunotherapy is just one hypothesis that has yet to be proven. 55

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Table 1- The measurement of purine levels from serum of normal rabbits and those inoculated with *Pythium insidiosum* with characteristic lesion. 54

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Adenosina desaminase
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Cluster differentiation (marcador de diferenciação)
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano tecidual
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
FC	Reação de fixação do complemento
ID	Reação de imunodifusão dupla
IFNγ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LT_C	Linfócito T citotóxico
LT_H	Linfócito T helper ou auxiliar
MH_C	Complexo principal de histocompatibilidade
PAMPs	Padrões moleculares assocoados aos patógenos
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE ANEXOS

Anexo A Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética 75
Anexo B Fotos dos experimentos..... 77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 OBJETIVOS 41
3 ARTIGO I 43
4 ARTIGO II 49
5 DISCUSSÃO 57
6 CONCLUSÕES 62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63
8 ANEXOS 76

1 INTRODUÇÃO

A pitiose é doença insidiosa, podendo levar à morte se não tratada, tendo como agente etiológico em mamíferos, o *Pythium insidiosum.* O agente da pitiose foi isolado pela primeira vez a partir de granulomas subcutâneos em equinos na Indonésia (DE HAAN; HOOGKAMER, 1901), sendo classificado como um fungo. Em 1961, recebeu o nome *Hyphomyces destruens* acreditando-se ser um zigomiceto, provavelmente *Mortierella* (BRIDGES; EMMONS, 1961). Austwick e Copland (1974) observaram o desenvolvimento de zoósporos quando culturas em Agar Sabouraud Dextrose eram transferidas para um meio aquoso, concluindo que *H. destruens* pertencia aos oomicetos do gênero *Pythium.* O nome pitiose foi proposto para a doença por Chandler e colaboradores (1980). E o oomiceto foi descrito como *Pythium insidiosum* quando De Cock e colaboradores (1987) observaram a reprodução sexuada (esporulação).

Esta doença é considerada não transmissível, encontrada nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (DE COCK et al., 1987; MENDOZA et al., 1993; MENDOZA, 2005). Possivelmente a modificação do ambiente, como a irrigação para a produção de arroz, poderia justificar o aparecimento da pitiose em regiões não tropicais, como observado na Califórnia e Arizona (BERRYSSA et al., 2008; WHITE et al., 2008). No Brasil, na região do Pantanal (Figura 1), a maioria dos casos acontece entre os meses de fevereiro e maio, quando ocorre formação de banhados e temperatura propícia para o desenvolvimento dos zoósporos (LEAL et al., 2001).

Figura 1- Equinos em seu habitat no Pantanal Matogrossense (SANTURIO; FERREIRO, 2008).

P. insidiosum se desenvolve na superfície da água sendo este um pré-requisito para induzir a formação de zoósporos (SUPABANDHU et al., 2008). Desta maneira, os casos de pitiose ocorrem em regiões com acúmulo de água e com temperatura média superior a 25ºC, sendo que a grande maioria dos casos foi observada durante ou após a época das chuvas (MILLER; CAMPBELL, 1982).

O gênero *Pythium* possui mais de 120 espécies, sendo a maioria habitante do solo e patógenos de plantas. No entanto, o *P. insidiosum* é conhecido por causar doença em mamíferos e plantas (ALEXOPOULUS et al., 1996).

A análise filogenética revelou que as espécies de *Pythium* são distantes do Reino Fungi e mais próximas das algas (GUARRO; STCHIGEL, 1999; HUDSPETH et al., 2000; KWON-CHUNG, 1994; MARTIN, 2000). Baseado em análises moleculares, o agente da pitiose ficou definido como pertencente ao Reino Straminipila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e espécie *Pythium insidiosum* (LEAL, 1999; MONTEIRO, 1999).

Microscopicamente, o *P. insidiosum* desenvolve micélio como os fungos. Porém, não é um fungo verdadeiro, uma vez que sua parede não contém quitina, sendo composta de celulose e β-glucanas, a membrana citoplasmática carece de ergosterol, o processo sexual é oogâmico e o organismo desenvolve zoósporos biflagelados em ambiente aquoso (ALEXOPOULOS et al., 1996).

O ciclo biológico do *P. insidiosum* foi descrito por Miller (1983), baseando-se na colonização de plantas aquáticas que servem como substrato para o seu desenvolvimento e a sua reprodução sexuada. Nas plantas se formam os zoosporângios que liberam os zoósporos que se movimentam na água até encontrar outra planta ou animal (Figura 2).

Os zoósporos são células nucleadas sem parede celular que se locomovem com o auxílio de dois flagelos; um anterior e outro posterior. Não podem se dividir e são considerados propágulos infectantes que mostram quimiotaxia para tecido lesionado de planta aquática. O tecido lesionado dos animais entra neste ecossistema do *P. insidiosum* e exerce o mesmo efeito (Figura 2). Nos mamíferos observa-se marcante quimiotaxia dos zoósporos para os pelos, lesões na pele ou mucosa intestinal. O tropismo tecidual está diretamente relacionado com a parte do corpo do animal que está em contato com a água contendo os zoósporos (DE COCK et al., 1987; MENDOZA et al., 1993).

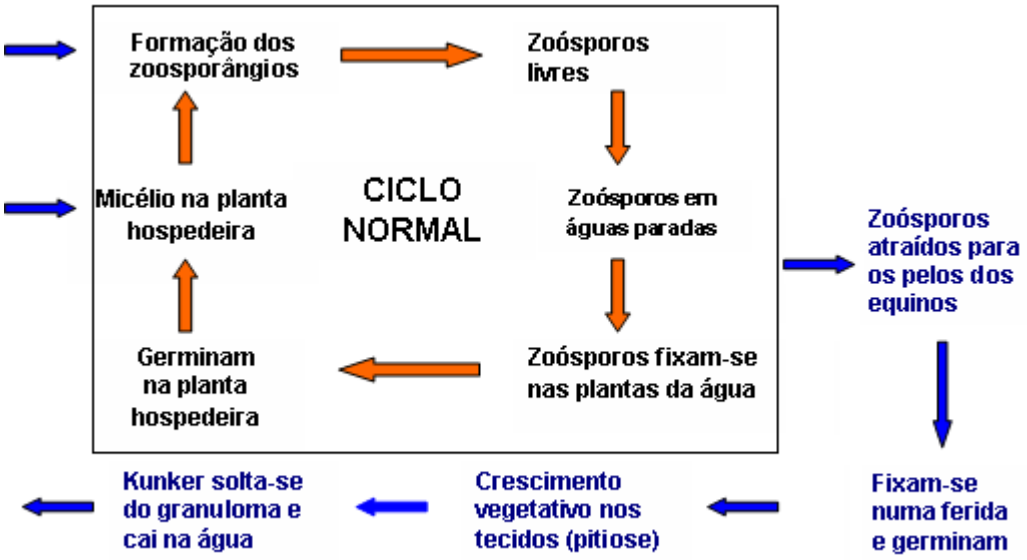


Figura 2 - Esquema do ciclo biológico do *Pythium insidiosum*
(Adaptado de MILLER, 1983).

O encistamento do zoósporo na superfície do tecido lesionado de uma planta ou animal ocorre no momento do contato em ambiente aquoso. Uma vez encistado, o zoósporo secreta glicoproteínas que permitem a adesão ao tecido e, estimulado pela temperatura corporal do hospedeiro, desenvolve um tubo germinativo que vai do zoósporo até o tecido infectado podendo infiltrar vasos sangüíneos (homens e animais) (MENDOZA et al., 1993, 1996). A invasão de vasos sangüíneos pode levar à trombose e invasão de grandes artérias (IMWIDTHAYA, 1994; KRAJAEJUN et al., 2006; LAOHAPENSANG et al., 2009; PUPAIBOOL et al., 2006; THITITHANYANONT et al., 1998).

A obtenção de zoósporos no laboratório é possível pela técnica da zoosporogênese em meio líquido (Figura 3), sendo relevante na identificação da espécie (BENTINCK-SMITH et al., 1989), nos testes de suscetibilidade *in vitro* (CAVALHEIRO et al., 2009; PEREIRA et al., 2007) e para reproduzir a doença em modelo experimental (SANTURIO et al., 2003).

A maioria dos casos de pitiose foi observada em equinos, cães e seres humanos. Casos esporádicos foram relatados em outros animais, como bezerros (PÉREZ et al., 2005), gatos (MILLER et al., 1985; RAKICH et al., 2005; THOMAS;

LEWIS, 1998) e ovelhas (MILLER et al., 1985; SANTURIO; FERREIRO, 2008; TABOSA et al., 2004).

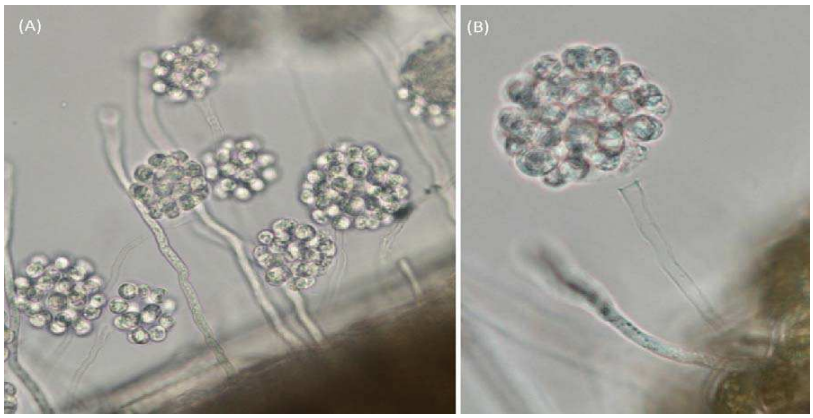


Figura 3 - Gramíneas inoculadas com *P. insidiosum* – formação dos esporângios contendo os zoósporos. A) vesículas com zoósporos após 3 horas de incubação; B) vesículas antes da liberação dos zoósporos (GAASTRA et al., 2010).

Nos equinos não há predisposição de sexo, idade ou raça (MILLER, 1983; MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA, 2005; WHITE et al., 2008). Nesta espécie, a forma cutânea (Figura 4) é a mais prevalente, sendo a forma intestinal raramente observada (BROWN; ROBERTS, 1988; MORTON et al., 1991; PURCELL et al., 1994). As lesões cutâneas são largas, arredondadas com tecido granulomatoso nodular ulcerativo. De aspecto tumoral, consistem de tecido necrótico contendo eosinófilos e hifas de *P. insidiosum* (HEADLEY et al., 2002; MENDOZA; ALFARO, 1986; MILLER, 1983; MILLER; CAMPBELL, 1984). O tecido e as fístulas de drenagem contêm núcleos de material amarelo-acinzentado referidos como “kunkers” (Figura 5). Os “kunkers” podem variar de forma e tamanho e são específicos e exclusivos da pitiose eqüina, sendo formados pela degranulação de eosinófilos sobre as hifas do *P. insidiosum*. Novos eosinófilos degranulam sobre os primeiros e a massa estrutural cresce em tamanho (LEAL et al., 2001; MENDOZA et al., 1996; MENDOZA, 2005).

Figura 4 - Lesão em equino causada pelo *P. insidiosum* (forma cutânea) (SANTURIO; FERREIRO, 2008).

Os sinais clínicos da pitiose equina podem incluir lesões ósseas, fraqueza muscular, linfonodos regionais aumentados, anemia e hipoproteinemia (MENDOZA; ALFARO, 1986; MILLER, 1983). A pitiose intestinal em equinos é caracterizada por lesões estenóticas e fibrosas disseminadas no estômago e intestino (ALLISON; GILLIS, 1990; BROWN; ROBERTS, 1988; PURCELL et al., 1994).

Figura 5 - Kunkers obtidos de um cavalo com pitiose (GAASTRA et al., 2010).

Nos cães, ao contrário dos equinos, a forma gastrointestinal é mais frequente e os adultos jovens os mais acometidos (GROOTERS, 2003; GROOTERS et al., 2003). Os sintomas clínicos incluem vômito, perda de peso, diarréia intermitente e presença de massas palpáveis no abdômen (FISCHER et al., 1994). Por vezes

compromete o pâncreas, linfonodos mesentéricos e dutos biliares (BERRYESSA et al., 2008; GROOTERS, 2003; THOMAS; LEWIS, 1998). As lesões também podem envolver patas, face ou a cauda do animal (THOMAS; LEWIS,1998).

A pitiose nos gatos é rara e as lesões costumam limitar-se à pele e ao tecido subcutâneo (GROOTERS, 2003; THOMAS; LEWIS, 1998). A infecção gastrointestinal em gatos foi referida nos EUA (RAKICH et al., 2005). Sem predisposição para raça, idade ou sexo (GROOTERS, 2003).

A pitiose em bovinos é esporádica e geralmente ocorre nas regiões subtropicais, na época das chuvas. Pérez e colaboradores (2005) identificaram pitiose cutânea em sessenta e três bovinos na Venezuela, enquanto Gabriel e colaboradores (2008) relataram um surto de pitiose cutânea em bovinos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Nesses animais, ocorre com maior freqüência nos membros causando prurido e claudicação. Massas tumorais nos membros com fístulas e tecido ulcerado são comuns, sendo que as hifas podem ser isoladas do centro do granuloma eosinofílico. As áreas afetadas são dolorosas e a maioria dos animais não consegue levantar-se acarretando desidratação e morte. Contaminação bacteriana secundária também ocorre (MILLER et al., 1985; PÉREZ et al., 2005; SANTURIO et al., 1998). No Brasil, a doença também foi observada na região do Pantanal e os animais apresentaram regressão espontânea das lesões (SANTURIO et al, 1998).

A pitiose em ovelhas desencadeia lesões cutâneas em diferentes áreas anatômicas, particularmente nos membros e, com lesões granulomatosas eosinofílicas na rinofaringe (RIET-CORREA et al., 2008; TABOSA et al., 2004).

Os primeiros casos de pitiose no homem foram observados e descritos na Tailândia (THIANPRASIT, 1986, 1990). No Brasil, o primeiro caso foi relatado no Estado de São Paulo (BOSCO et al., 2005) e nos EUA, Austrália, Haiti e Nova Zelândia descreveram-se casos esporádicos (THIANPRASIT, 1986, 1990). Entre os fatores predisponentes, destacam-se as atividades agrícolas e de lazer associadas à água (BOSCO et al., 2005; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989; SUPABANDHU et al., 2008) e talassemia α e β na Tailândia (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989).

Os pacientes com pitiose são encontrados em todas as regiões da Tailândia sugerindo que o patógeno está amplamente distribuído nesse país que tem uma vasta região pantanosa apropriada para o seu desenvolvimento. Os indivíduos sadios também são vulneráveis à pitiose ocular. Num estudo da pitiose na Tailândia,

Krajaejun e colaboradores (2006) relataram que todos os pacientes com pitiose cutânea/subcutânea, vascular e disseminada apresentavam desordens hematológicas. Ao contrário, a maioria (84%) dos pacientes com pitiose ocular não apresentavam esse tipo de desordem. Percentuais de 90% de pacientes com pitiose vascular eram talassêmicos, sugerindo uma associação entre pitiose vascular e talassemia. Na Tailândia 1% da população apresenta talassemia podendo justificar o número de casos da doença no país. Pacientes com talassemia apresentam uma sobrecarga de ferro que poderia aumentar a suscetibilidade do hospedeiro à pitiose favorecendo a infectividade do patógeno (WALKER; WALKER, 2000) Entretanto, seis pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna, que está relacionada a uma deficiência de ferro, foram diagnosticados com pitiose (KRAJAEJUN et al., 2006; KRAUSS, 2003).

As infecções por *P. insidiosum* em humanos, podem apresentar-se de três formas: 1) lesões granulomatosas no tecido subcutâneo de pacientes talassêmicos. 2) forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, comprometendo a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmicos. 3) ceratite ocular, podendo ou não ser associada à talassemia (IMWIDTHAYA, 1994; MENDOZA et al., 2004).

A reprodução experimental da pitiose, com a inoculação de zoósporos, nas espécies naturalmente infectadas ainda não teve sucesso. Por outro lado, a suscetibilidade de coelhos como modelo experimental da pitiose foi demonstrada por Miller e Campbell (1983a). Segundo Santurio e colaboradores (2003) a inoculação de 17.500 zoósporos é necessária para gerar a doença nos coelhos. A inoculação subcutânea com zoósporos resulta no desenvolvimento de nódulos que evoluem para fibrogranulomas eosinofílicos, não ocorrendo formação de “kunkers” (Figura 6). A resposta leucocitária é semelhante a dos equinos onde ocorre progressiva leucocitose com moderada neutrofilia e leve monocitose (MILLER; CAMPBELL,1983a,1983b). Dessa forma, o coelho parece ser o único modelo experimental para avaliar imunoterapia e a atividade das drogas antimicóticas (MILLER; CAMPBELL,1983a; PATINO-MEZA,1988; PEREIRA et al., 2007,2008; SANTURIO et al., 2003).

Figura 6 - Coelho inoculado com zoósporos de *P. insidiosum* (LAPEMI, UFSM).

A interação do patógeno com o hospedeiro é complexa e multifatorial. A resposta imune do hospedeiro, como a que ocorre na pitiose, parece depender de quando e como determinadas citocinas e outros fatores estão disponíveis no sítio da presença do parasito. Os mecanismos de defesa do hospedeiro são formados pela imunidade inata, também conhecida como imunidade natural, que está presente desde o nascimento em todos os organismos multicelulares e pela imunidade adaptativa que é estimulada pelos micro-organismos que invadem os tecidos (ABBAS; LICHTMAN, 2009).

A imunidade inata é poderoso mecanismo inicial de defesa, controlando ou erradicando os agentes invasores antes da ativação da resposta adaptativa. Além de fornecer a defesa inicial contra infecções, instrui o sistema imunológico adaptativo a responder aos diversos micro-organismos de maneira eficaz, participando também da eliminação das infecções (ABBAS; LICHTMAN, 2009). Seu início depende do reconhecimento de estruturas que são comuns a diversos micro-organismos e que não estão presentes nas células do hospedeiro. Estas estruturas correspondem a um número conservado de determinantes que são detectados, no início da infecção, pelas células inflamatórias do hospedeiro através de receptores do tipo Toll e outros. Esses receptores são referidos como “sinalizadores do perigo exógeno” (PAMPs – pathogen-associated molecular patterns) (DI VIRGILIO et al., 2009). Para uma resposta imune eficiente, além dos “sinalizadores do perigo exógeno” é necessário também o reconhecimento de moléculas intracelulares. Essas moléculas são liberadas após a injúria tecidual e conhecidas como “sinalizadores de dano tecidual” (DAMPs – damage associated molecular patterns) (PRAETORIUS; LEIPZIGER, 2009). O reconhecimento dos PAMPs, na maioria dos casos, não é suficiente para

iniciar uma resposta imune sendo necessário um sinal que comprove que o invasor é potencialmente perigoso. Este sinal é dado pelos DAMPs (DI VIRGILIO, 2007).

Entre os DAMPs, o ATP tem características únicas: ocorre em altas concentrações no citoplasma de todas as células; no interstício os níveis são baixos; é rapidamente liberado após o dano tecidual e é inativado por enzimas extracelulares (ecto-ATPases). Estas propriedades fazem do ATP um sinalizador ideal de estresse celular (DI VIRGILIO et al., 2009).

A resposta imunológica adquirida é iniciada quando receptores específicos presentes nos linfócitos interagem com os antígenos. Os linfócitos B e T são as únicas células que possuem receptores específicos para antígenos (ABBAS; LICHTMAN, 2009).

Os linfócitos B e T diferem em relação aos antígenos que reconhecem. Os receptores de antígenos dos linfócitos B podem reconhecer uma grande variedade de macromoléculas (proteínas, polissacarídios, lipídios, ácidos nucléicos) e pequenas substâncias químicas em solução ou associadas à superfície celular. Assim, há resposta humoral mediada pelas células B contra vários tipos de antígenos da membrana celular dos micro-organismos e de antígenos solúveis. Os linfócitos T só identificam fragmentos peptídicos de antígenos protéicos associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) das células apresentadoras de antígeno do hospedeiro (KINDT et al., 2008).

A ativação dos linfócitos B resulta na proliferação de células antígeno-específicas (expansão clonal) e diferenciadas em células efetoras, conhecidas como plasmócitos, que secretam ativamente anticorpos. Os anticorpos secretados circulam na corrente sangüínea, onde atuam como efetores da imunidade humoral a procura de antígenos, marcando-os para eliminação (KINDT et al., 2008).

Os linfócitos T são encarregados da imunidade mediada por células, possuindo funções efetoras e reguladoras da resposta imune. São subdivididos em linfócitos T citotóxicos (T $CD8^+$), responsáveis pela eliminação de células que apresentam antígenos estranhos e linfócitos T helper ou auxiliar (T $CD4^+$) que secretam citocinas que ativam e regulam a resposta imune. As células T $CD4^+$ podem se diferenciar em subgrupos de células que produzem diferentes citocinas. Os primeiros subgrupos definidos foram denominados T_H1 e T_H2 (ROMAGNANI, 1997).

A diferenciação das células T_H nos diferentes subgrupos é um processo regulado pelos estímulos que as células T $CD4^+$ virgens recebem quando são apresentadas aos antígenos pelas células dendríticas ou macrófagos. As citocinas produzidas e liberadas por essas células entram em contato com as células $CD4^+$ virgens no momento da apresentação e ativam fatores de transcrição que promovem a diferenciação num determinado subgrupo. A diferenciação das células T $CD4^+$ virgens em linfócitos T_H1 ocorre na presença de IL-12 (interleucina 12) e IFN-γ (interferon gama) determinando um perfil inflamatório. A diferenciação em T_H2 ocorre na presença de IL-4 (interleucina 4) promovendo a produção de IgE e reações alérgicas. Além disso, a indução de um tipo de resposta inibe a outra (Figura 7) (WAN; FLAVELL, 2009).

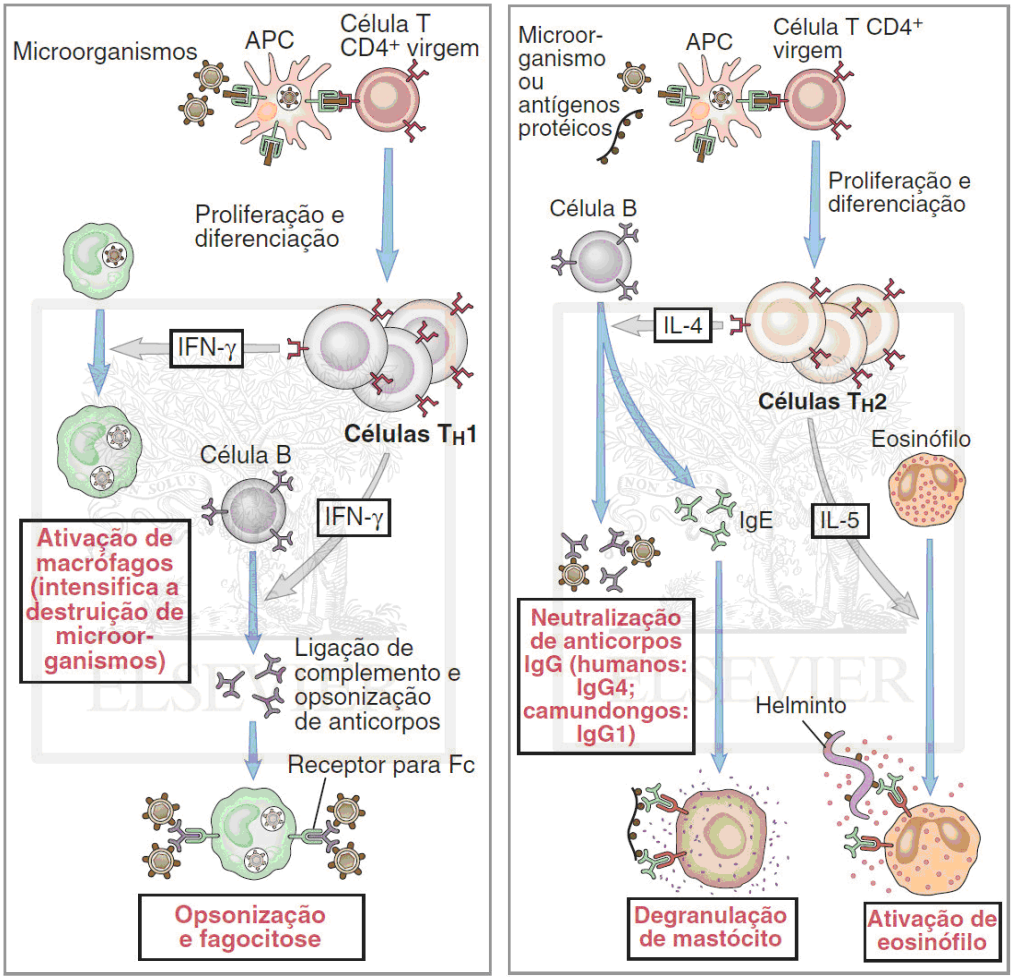


Figura 7 - Funções das células T_H1 e TH2 (ABBAS & LICHTMAN, 2009).

Em 1924, Witkamp relatou que animais com pitiose desenvolvem anticorpos que podem ser facilmente detectados num teste de imunodifusão com extrato bruto do patógeno. Estudos sorológicos, tanto em humanos como em animais com pitiose, mostraram que o *P. insidiosum* estimula resposta imune humoral (GROOTERS et al., 2002; IMWIDTHAYA; SRIMUANG, 1989; MENDOZA et al., 1986, 1992; MENDOZA; NEWTON, 2005; MILLER; CAMPBELL, 1984). Entretanto, os anticorpos formados, não parecem ser capazes de eliminar a infecção (MENDOZA; ALFARO, 1986; MILLER; CAMPBELL, 1984; THITITHANYANONT et al., 1998; TRISCOTT et al., 1993). A imunidade celular mediada por mastócitos, eosinófilos e outras células inflamatórias parece estar diretamente envolvida no dano tecidual. A liberação de grânulos de eosinófilos e mastócitos no sítio da infecção causa prurido intenso nos cavalos e nas outras espécies com pitiose, o que favorece a ulceração e necrose e contaminação bacteriana secundária (MENDOZA; ALFARO, 1986; MILLER; CAMPBELL, 1982).

A partir destas observações supõe-se que a imunidade humoral no hospedeiro com pitiose leva à formação de anticorpos precipitantes e aglutinantes relacionados a uma resposta do tipo T_H2. Estes anticorpos não são protetores, mas são úteis para o diagnóstico da doença (MENDOZA et al., 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005).

Sugere-se que o uso de extratos antigênicos obtidos do *P. insidiosum* no tratamento da pitiose é eficaz ao estimular uma resposta do tipo. T_H1. A observação de altos níveis de IFN-γ (interferon gama) e IL-2 (interleucina 2) (indicativos de resposta mediada por linfócitos T_H1) e uma diminuição das citocinas mediadas pela resposta T_H2 nos pacientes curados pela imunoterapia reforçam esta idéia. Assim, a resposta imune desenvolvida na pitiose desvia o sistema imune para uma resposta do tipo T_H2, responsável pela evolução da doença (MENDOZA; NEWTON, 2005; THITITHANYANONT et al., 1998; WANACHIWANAWIN et al., 2004).

Para avaliar a especificidade da resposta humoral, estudos foram realizados com o objetivo de caracterizar os antígenos do *P. insidiosum* (LEAL, 1999; MENDOZA et al., 1992). Leal e colaboradores (2005) estudaram, através da análise por “immunoblot”, amostras de soros obtidos de equinos e bovinos com pitiose e de equinos e coelhos imunizados com antígeno bruto de *P. insidiosum.* Os soros de equinos com pitiose e de equinos e coelhos imunizados mostraram o mesmo padrão

de reatividade, sendo que dois antígenos foram reconhecidos exclusivamente pelo soro de bovinos com pitiose.

Um antígeno imunodominante (74 kDa) identificado em 16 isolados de *P. insidiosum* foi reconhecido em 12 soros de pacientes com pitiose, pela técnica de "Western Blot". Nenhuma reação ocorreu com os soros de indivíduos saudáveis, pacientes com talassemia e pacientes com outras infecções. Os autores sugeriram que o antígeno 74 kDa é alvo para o desenvolvimento de testes rápidos para o diagnóstico e para a produção de um imunoterápico (KRAJAEJUN et al., 2006). O antígeno imunodominante 74 kDa foi caracterizado como 1,3-β-Glucanase (KRAJAEJUN et al., 2010)

Em 2009, Chindamporn e colaboradores avaliaram seis cepas da Ásia e Américas contra soro de bovinos, gatos, cães, equinos e humanos com pitiose. Os resultados mostraram que anticorpos anti-*P. insidiosum* desenvolvidos por hospedeiros de diferentes espécies detectam diferentes antígenos do *P. insidiosum*, o que pode ter implicação nos diferentes tipos de resposta ao imunoterápico em animais de espécies distintas (GAASTRA et al., 2010).

O diagnóstico de infecção pelo *P. insidiosum* pode ser obtido pelo exame a fresco com KOH 10% e posterior cultivo (Figura 8), pesquisa de anticorpos anti-*P. insidiosum* e/ou pela detecção do DNA do agente infeccioso no tecido infectado por PCR (GROOTERS, 2007; MENDOZA, 2005; MILLER, 1983).

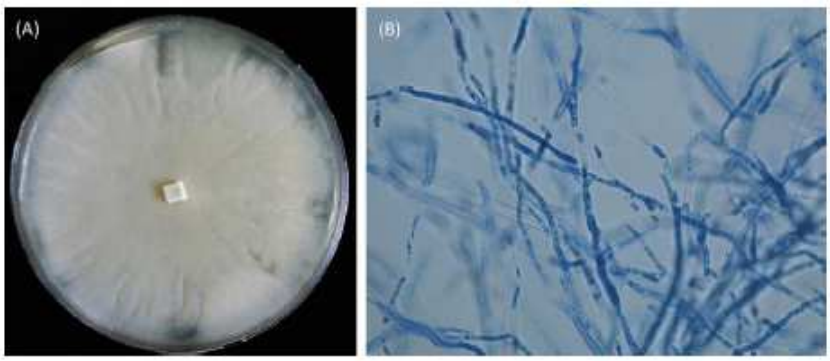


Figura 8 – Morfologia do *P. insidiosum*. (A) Cultivo de cinco dias a 37ºC em ágar Sabouraud dextrose 2% de *P. insidiosum* a 37 ° C.
(B) Hifas de *P. insidiosum* esparsamente septadas em lactofenol azul.
(GAASTRA et al., 2010)

A citologia e a histologia podem ajudar no diagnóstico, mas não diferenciam a pitiose das infecções causadas pelos zigomicetos *Conidiobolus* e *Basidiobolus* (GROOTERS, 2007; MENDOZA, 2005; MILLER, 1983).

Os testes sorológicos podem ser usados no diagnóstico da pitiose (MILLER; CAMPBELL, 1982). Diferentes antígenos foram obtidos de uma cepa de *P. insidiosum* e usados nas reações de imunodifusão dupla (ID) e no teste de fixação do complemento (FC). A ID resultou ser teste sensível e específico. Equinos sem história prévia de pitiose e animais que se recuperaram da doença não reagiram ao teste. A FC detectou 82% dos equinos doentes e forneceu resultados positivos com soro de animais que se recuperaram da doença e de animais sem história de doença prévia. A ID foi avaliada por Pracharktam e colaboradores (1991), demonstrando ser sensível e específica, no diagnóstico de arterite por *P. insidiosum* em seres humanos e no monitoramento da doença.

Mendoza e colaboradores (1997) padronizaram um teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) em placas de poliestireno sensibilizadas com antígeno solúvel de hifas sonicadas de *P. insidiosum* e compararam os resultados com o teste de ID. Amostras de soro humano e de animais saudáveis e com pitiose clínica foram testadas e os resultados mostraram que o teste de ELISA é sensível e específico para o diagnóstico da pitiose. Quando comparado ao teste de imunodifusão dupla mostrou igual especificidade e maior sensibilidade. Posteriormente novos testes imunoenzimáticos foram padronizados para o diagnóstico da pitiose equina, canina e humana (ALVES et al., 2001; GROOTERS et al., 2002; KRAJAEJUN et al., 2002; ROSA et al., 1999). Santurio e colaboradores (2001) usaram antígeno solúvel, obtido do rompimento das hifas do oomiceto por sonicação para confirmar a pitiose experimental em coelhos.

Outros testes sorológicos foram desenvolvidos, podendo ser úteis no diagnóstico da pitiose, como a reação de hemaglutinação passiva (JINDAYOK et al., 2009) e a imunocromatografia (KRAJAEJUN et al., 2009). *P. insidiosum* também pode ser identificado em tecidos por outras técnicas como a imunofluorescência direta (MENDOZA et al., 1987) e a imunoperoxidase (BROWN; ROBERTS, 1988).

A infecção causada pelo *P. insidiosum* é de difícil tratamento. Em conjunto, cirurgia, agentes antimicrobianos e imunoterapia têm sido usado com relativo sucesso. Independente da terapia escolhida, as chances de involução da doença estão associadas a um início precoce do tratamento (ARGENTA et al., 2010).

A parede celular dos oomicetos como o *P. insidiosum* contém celulose e β-glucanas como componentes (HENDRIX, 1964) e não quitina como os fungos verdadeiros. A membrana citoplasmática não tem ergosterol que é o alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas. Apesar destas diferenças, drogas antifúngicas foram testadas com algum resultado terapêutico (BISSONNETTE et al.,1991; GROOTERS, 2003; SHENEP et al., 1998; TRISCOT et al., 1993). Pereira e colaboradores (2007) testaram inibidores de β-glucanas (caspofungina) em coelhos experimentalmente infectados. Houve redução das lesões que rescidivaram com a suspensão da terapia. A combinação de inibidores da síntese do ergosterol (itraconazol, miconazol, etc) e caspofungina (inibidor da síntese de β-glucanas) vem sendo testada com resultados alentadores (ARGENTA et al., 2010; GROOTERS, 2003; PEREIRA et al., 2007, 2008).

O primeiro extrato antigênico produzido com efeito curativo para o tratamento da pitiose foi desenvolvido por Miller (1981), preparado a partir da sonicação da massa micelial morta, sendo efetivo em 50% dos eqüinos tratados. Antígenos de secreção e excreção do *P. insidiosum* foram obtidos a partir do cultivo em meio líquido e, posterior precipitação (MENDOZA; ALFARO, 1986). A eficácia deste imunoterápico não foi melhor do que a do extrato antigênico obtido por sonicação, sendo, contudo, mais estável e fácil de ser preparado. Em um estudo em que foram combinados tratamento imunoterápico, cirúrgico e químico, envolvendo 18 equinos e 6 cães infectados, obteve-se um percentual de cura de 72% nos equinos e 33% nos caninos. Neste estudo observou-se ainda que após uma semana de imunoterapia as hifas do *P. insidiosum* apareciam lesadas (MENDOZA; NEWTON, 2005).

A imunoterapia em cães tem uma taxa de cura menor do que em equinos. Em gatos não se obteve nenhuma resposta (HENSEL et al., 2003). No gado a imunoterapia foi eficaz na maioria dos casos tratados (THOMAS; LEWIS, 1998).

No Brasil, Santurio e colaboradores (2003) estudaram e avaliaram extratos antigênicos para o tratamento da pitiose. A massa micelial após inativação com timerosal foi usada para obtenção do imunoterápico pelo uso do ultrasom ou do vortex. Em coelhos infectados com o imunoterápico vortexado (Figura 9) mostrou ser mais eficaz com diminuição em 71,8% das lesões após 26 semanas de observação.

Figura 9 - Imunoterápico para tratamento da pitiose em equinos obtido da massa micelial inativada e vortexada (LAPEMI/UFSM e EMBRAPA).

Em equinos, o índice de involução da doença variou de 50 a 83,3% (SANTURIO et al., 2003). Recentemente, Santos e colaboradores (2011b) relataram a resposta satisfatória ao tratamento imunoterápico de um equino com extensa lesão facial ulcerada, decorrente da infecção pelo *P. insidiosum (*Figura 10*).*

Figura 10 - Tratamento imunoterápico na pitiose equina. Equino exibindo extensa lesão facial ulcerada decorrente de pitiose no momento da abordagem inicial (A). Nas imagens subsequentes (B-E) as tomadas foram executadas a cada 14 dias,coincidindo com aplicação do imunoterápico (Pitium Vac®), totalizando cinco aplicações. Ao final do tratamento nota-se apenas lesão cicatricial com completa resolução do caso (F) (SANTOS et al., 2011b).

Em humanos, a imunoterapia foi utilizada pela primeira vez com sucesso em um menino da Tailândia com pitiose vascular. O tratamento cirúrgico e antimicótico não reverteram o quadro e o menino passou a receber duas doses do imunoterápico a cada duas semanas e teve cura após um ano (THITITHANYANONT et al.,1998). Wanaschiwanawin e colaboradores (2004) usaram a imunoterapia como último recurso para tratar pacientes com pitiose vascular. Após a administração de duas doses do imunoterápico num intervalo de duas semanas, 50% dos pacientes responderam positivamente ao tratamento. Acredita-se que o sucesso da terapia dependa de um início precoce. As taxas de mortalidade são maiores quando os pacientes sofrem de lesões crônicas com mais de dois meses (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Uma provável explicação para o mecanismo que leva à cura pelo uso da imunoterapia seria a de que a infecção desvia a resposta para T_H2 com produção de anticorpos não protetores e que a imunização com antígenos extraídos do *P. insidiosum* ativaria uma resposta T_H1 mais eficaz (Figura 11) (MENDOZA et al., 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005).

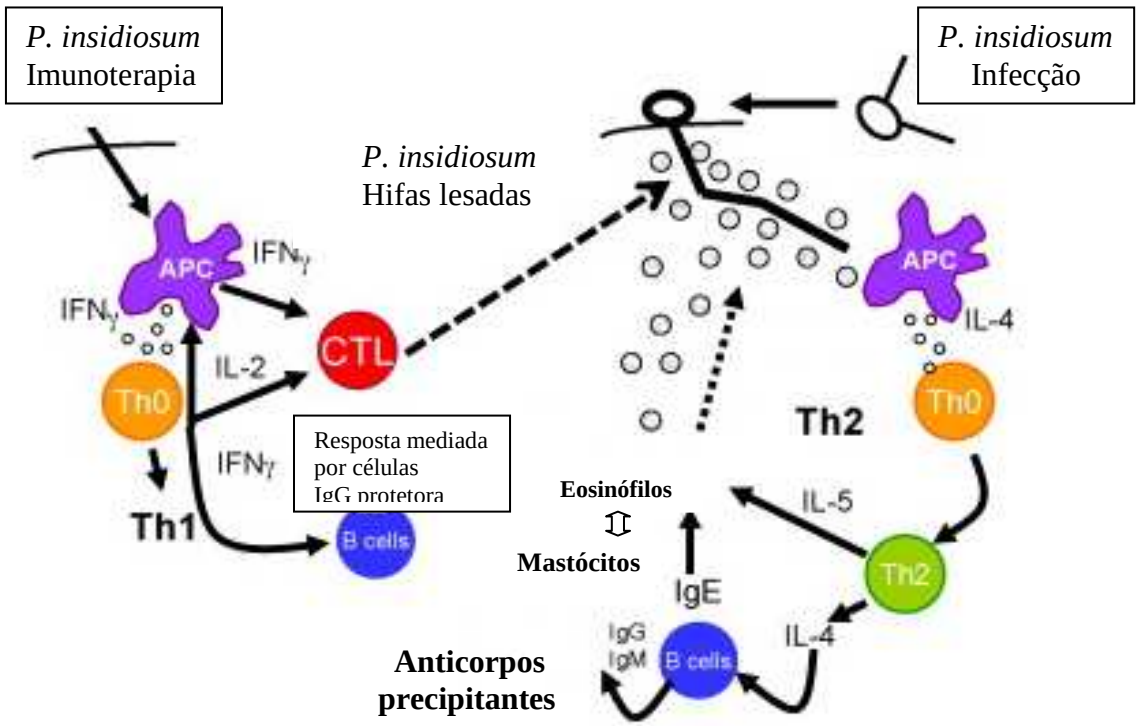


Figura 11 - Provável explicação para a cura da pitiose pela imunoterapia
(Adaptado de MENDOZA; NEWTON, 2005).

Na pitiose, as hifas crescem e liberam antígenos. O processamento e a apresentação desses antígenos pelas células apresentadoras desviam a resposta imune para T_H2 que libera IL-4 (interleucina 4). A IL-4 diferencia linfócitos T_H virgens em células T_H2. As células T_H2 ativadas vão liberar IL-4, IL-5 e IL-10, que por sua vez estimulam linfócitos B a produzirem anticorpos IgM e IgG precipitantes e aglutinantes e IgE. IL-5 e IgE ativam a migração de eosinófilos e mastócitos para o local da lesão. Os grânulos liberados dos eosinófilos e mastócitos sobre as hifas do *P. insidiosum* contribuem para o dano tecidual (MENDOZA et al., 2003; THITITHANYANONT et al., 1998).

A imunoterapia expõe antígenos de *P. insidiosum* de forma distinta às células apresentadoras de antígeno, induzindo a diferenciação de células T_H virgens em células T_H1 que liberam IFN-γ e IL-2, ampliando a resposta mediada por células, e ativando, possivelmente, células T citotóxicas e anticorpos IgG protetores (MENDOZA et al., 2003; THITITHANYANONT et al., 1998).

As respostas imunes são montadas após a infecção para controlar os agentes patogênicos. Neste contexto, o sistema de sinalização purinérgica desempenha um importante papel, através de biomoléculas extracelulares, como os nucleotídeos da adenina e seu derivado nucleosídeo adenosina (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003; ZIMMERMANN, 2000).

Os nucleotídeos extracelulares de adenina, adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e o nucleosídeo adenosina são considerados importantes moléculas sinalizadoras em vários tecidos (YEGUTKIN, 2008), sendo que o ATP, o ADP e a adenosina, tem importância na modulação da resposta imune (BURNSTOCK, 2002). O ATP, quando em concentrações elevadas no meio extracelular, como resultado da injúria tecidual, pode ser interpretado como um “sinalizador de dano tecidual” (DAMP) e iniciar uma reposta inflamatória caracterizada pela secreção de citocinas, como IFN-γ, IL-12 e TNF (LANGSTON et al., 2003). Seus efeitos dependem da dose, do tempo de exposição e da célula envolvida, sendo controlados pela ação de ecto-enzimas que agem sobre o ATP e seus produtos de degradação, reduzindo sua concentração no meio e culminando na produção de adenosina. Esta, por sua vez, possui efeitos contrários aos do ATP na resposta imune (DI VIRGILIO, 2007).

Cada nucleotídeo, uma vez presente no meio extracelular, desempenha sua ação pela ligação a um tipo diferente de receptor localizado em diferentes células,

como, por exemplo, na superfície das células do sistema imune. Esses receptores pertencem à família P2. Os receptores para adenosina pertencem à família P1 (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; YEGUTKIN, 2008) (Figura 12).

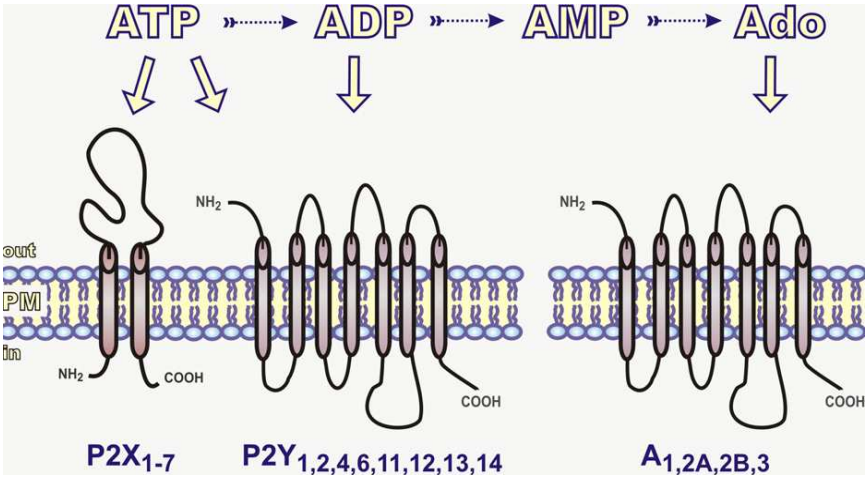


Figura 12 - Via de sinalização purinérgica (YEGUTKIN, 2008).

A família P1 é composta pelos receptores A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3, acoplados a proteína G sendo ativados pela adenosina com diferentes afinidades (BOURS et al., 2006). A ação imunomoduladora da adenosina nos receptores A_{2A} e A_{2B} envolve o aumento do AMP cíclico (AMPc) e resulta na inibição da resposta imune, inibindo a produção de citocinas pro-inflamatórias (IFN-γ, TNF-α e IL-2) e aumentando a produção de IL-10. A ligação nos receptores A_1 e A_3 inibe a produção de AMPc, funcionando como mecanismo de prevenção, por exemplo, para evitar a inibição prematura das células do sistema imune pelos receptores A_2 (ABBRACCHIO; CERUTTI, 2007; SITKOVSKY; OHTA, 2005).

Os receptores P2 são subdivididos em receptores P2X, ativados pelo ATP, conhecidos como receptores purinérgicos ionotrópicos e em receptores metabotrópicos P2Y que são ativados pelo ATP e ADP. A família P2 é composta por oito subtipos de receptores P2Y ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$), acoplados a proteína G e sete subtipos de receptores P2X ($P2X_1$ - $P2X_7$), ligados a canais iônicos. A ativação de receptores P2Y na superfície dos linfócitos direciona para uma resposta do tipo T_H2. A secreção de IL-12 e de quimiocinas pró-inflamatórias é inibida, enquanto a das citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) é potencializada. Em contraste, a presença de alta concentração de ATP estimula

receptores $P2X_7$, o que leva a liberação maciça de mediadores pró-inflamatórios (IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α) e quimiocinas como CCL5 e CXCL10 (BURNSTOCK, 2006; DI VIRGILIO et al., 2001).

O controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina é realizado por várias enzimas ancoradas na membrana celular (ZIMMERMANN et al., 2007). Dentre estas enzimas pode-se destacar as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase), a família das E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases), 5'-nucleotidase e a adenosina desaminase (ADA) (ROBSON et al., 2006; YEGUTKIN, 2008). Por estarem amplamente distribuídas nas células sanguíneas, as ecto-nucleotidases participam de importantes interações celulares, agindo, por exemplo, na agregação plaquetária e em processos inflamatórios e imunes (ZIMMERMANN, 2001).

Estas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática (Figura 13) que tem início com a ação da E-NTPDase e E-NPP, as quais catalisam a hidrólise de ATP e do ADP formando AMP (ZIMMERMANN et al., 2007). A seguir a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula de AMP formando adenosina, que é degradada pela ADA gerando inosina (YEGUTKIN, 2008).

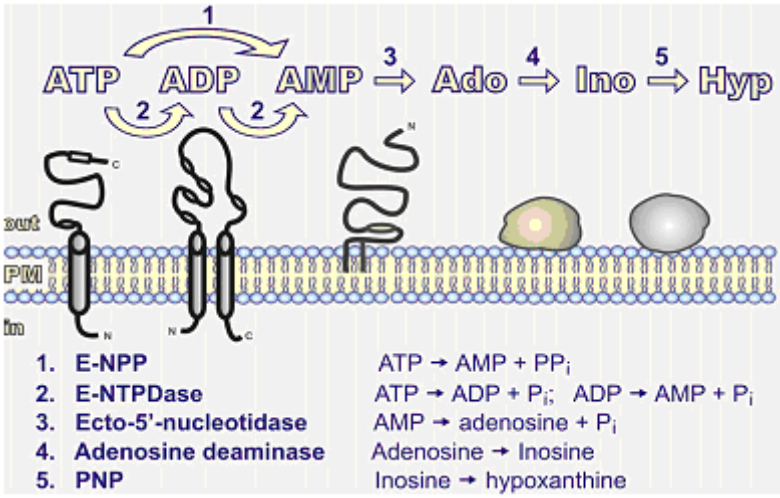


Figura 13 - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina (YEGUTKIN, 2008).

As NTPDases formam uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN et al., 2007). A família inclui oito

membros nomeados de NTPDase 1-8, que diferem quanto à especificidade por substratos, distribuição tecidual e localização celular. Quatro enzimas estão localizadas na membrana celular com o sítio catalítico voltado para o meio extra-celular (NTPDase 1,2,3 e 8) e quatro exibem localização intracelular (NTPDase 4,5,6 e 7) (ROBSON et al., 2006). Todos os membros da família das NTPDases apresentam 5 regiões denominadas regiões conservadas da apirase (ACRs), que são as regiões de maior importância para a atividade enzimática (ZIMMERMANN, 2000).

A NTPDase 1 (CD39, ecto-apirase, ecto-difosfoidrolase), a primeira enzima da família a ser descrita, está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembrana próximas ao grupamento aminoterminal e carboxilaterminal, sendo capaz de hidrolisar tanto ATP como ADP, formando AMP na presença de íons Ca^2 e Mg^2 (ROBSON et al., 2006; ZIMMERMANN, 2001). Esta enzima foi primeiramente identificada como um marcador de ativação linfóide (DWYER et al., 2007), sendo capaz de gerar sinais que amplificam as interações célula-célula controlando o desempenho da função linfocitária, incluindo o reconhecimento do antígeno e a ativação de células T citotóxicas (FILLIPINI et al., 1990; LEAL et al., 2005).

Foram isolados e identificados sete sub-tipos da enzima 5’-nucleotidase em humanos, sendo que cinco sub-tipos estão localizados no citosol, um na matriz mitocondrial e um anexado à membrana plasmática externa (HUNSUCKER et al., 2005). A ecto-5’-nucleotidase é uma glicoproteína ligada à membrana via um glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular sendo responsável pela hidrólise de AMP, gerando adenosina (STRÄTER, 2006). Esta enzima é encontrada em vários tecidos como, rins, fígado, pulmão, endotélio vascular e, também, nas plaquetas e nas células do sistema imune (COLGAN et al., 2006). As funções da ecto-5’-nucleotidase (marcador CD73 de linfócitos) correlacionam-se ao seu papel na produção de adenosina e a subseqüente ativação de receptores de adenosina (P1) (ZIMMERMANN, 2000), modulando, desta maneira, a resposta imune. A enzima também desempenha outras funções como, por exemplo, controlar a agregação plaquetária, regular o tônus vascular e atuar na neuromodulação e neuroproteção no sistema nervoso (DUNWIDDIE e MASINO, 2001; KAWASHIMA et al., 2000; ZIMMERMANN et al., 1998).

A família das E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatse/Fosfodiesterases) é constituída por sete enzimas nomeadas de NPP1 até NPP7, sendo numeradas de

acordo com sua ordem de descoberta (YEGUTKIN, 2008). Com exceção a NPP2, que é secretada no meio extracelular, todos os demais membros são ligados à membrana por um único domínio transmembrana. A NPP1 e 3 têm uma orientação transmembrana do tipo II, com sua porção aminoterminal voltada para o meio intracelular, enquanto que as NPPs 4-7 têm uma orientação do tipo I com sua posição aminoterminal voltada para o meio extracelular (STEFAN et al., 2006). As ecto-fosfodiesterases uma ampla especificidade por substratos e são capazes de hidrolisar ligações pirofosfato e fosfodiéster de nucleotídeos, ácidos nucléicos, nucleotídeos de açúcar bem como de fosfodiésteres de colina (STEFAN et al., 2005). Entretanto, somente as NPP 1, 2 e 3 são capazes de hidrolisar nucleotídeos, sendo assim, relevantes no contexto da cascata da sinalização purinérgica (STEFAN et al., 2006; YEGUTKIN, 2008).

A enzima adenosina desaminase (ADA) faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação sequencial dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina (YEGUTKIN, 2008). A ADA é responsável pela desaminação da adenosina com a consequente produção de inosina regulando desta maneira as concentrações extracelulares deste nucleosídeo (FRANCO et al., 1997). A adenosina desaminase (ADA) é uma enzima que catalisa irreversivelmente a clivagem hidrolítica da adenosina em inosina e amônia. A atividade da ADA origina-se da ação de duas principais isoenzimas, ADA1 e ADA2 (GESSI et al., 2007).

A ADA1 é uma proteína monômera com uma massa molecular de aproximadamente 40kDa, localizada principalmente no citosol, sendo encontrada em todo o organismo. A enzima pode estar combinada com uma glicoproteína dimérica não específica de aproximadamente 200 kDa, designada como proteína combinante (cp) (TSUBOI et al., 1995). O complexo ADA-cp constitui uma ecto-ADA, que é responsável pelo controle dos níveis de adenosina extracelular (FRANCO et al., 1997). Estudos têm demonstrado que esta proteína de ligação é uma glicoproteína multifuncional do tipo II, conhecida como CD26, podendo estar ligada à membrana da célula ou estar na forma solúvel no citosol (YEGUTKIN, 2008). Além da interação com CD26, a ADA1, pode atuar como uma ectoenzima ancorada aos receptores da adenosina A_1 e A_{2B}, mediando os processos de sinalização da adenosina (ROMANOWSKA et al., 2007). A ADA2 apresenta diferenças estruturais e cinéticas quando comparada a ADA1. Sua massa molecular é de aproximadamente 100 kDa e representa a menor parte da atividade da ADA em tecidos, sendo abundante no

plasma, com menor afinidade para a adenosina e menor atividade catalítica com a deoxiadenosina que a ADA1 (IWAKI-EGAWA et al., 2006).

Considerando o papel que os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina exercem durante eventos inflamatórios e a importância das ecto-nucleotidases na manutenção dos seus níveis extracelulares seria importante avaliar os mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta imune à pitiose para contribuir no entendimento do mecanismo imunológico que leva à involução da doença pelo tratamento dos animais com antígenos obtidos do oomiceto (imunoterapia).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar componentes da sinalização purinérgica em linfócitos de coelhos com pitiose experimental para contribuir no entendimento das alterações que ocorrem na resposta imunológica durante a infecção e após o tratamento imunoterápico.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar a atividade de ecto-enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo da adenina nos linfócitos dos coelhos infectados experimentalmente com *P. insidiosum*;

2. Quantificar os nucleotídeos e nucleosídeo da adenina no soro dos animais;

3. Avaliar a participação das ecto-enzimas na regulação da resposta imune e inflamatória durante a evolução clínica da pitiose e após a imunoterapia.

RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois artigos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se compondo os próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados demonstrados nos artigos contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

3 ARTIGOS

3.1 Artigo 1

Imunoterapia para a pitiose: Efeito na atividade da NTPDase em linfócitos de um modelo experimental.

Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model

Barbara Charlotte Bach, Daniela Bitencourt Rosa Leal, Jader Betsch Ruchel, Viviane do Carmo Gonc¸alves Souza, Grazieli Maboni, Marcelo Dal Pozzo, Karine Bizzi Schlemmer, Sydney Hartz Alves, Janio Morais Santurio *

Publicado na revista Biomedicine & Pharmacotherapy

Biomedicine & Pharmacotherapy 64 (2010) 718–722

Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

Original article

Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model

Barbara Charlotte Bach, Daniela Bitencourt Rosa Leal, Jader Betsch Ruchel, Viviane do Carmo Gonçalves Souza, Grazieli Maboni, Marcelo Dal Pozzo, Karine Bizzi Schlemmer, Sydney Hartz Alves, Janio Morais Santurio *

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 20, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 May 2010
Accepted 10 September 2010

Keywords:
NTPDase
Pythium insidiosum
Rabbit lymphocytes

ABSTRACT

NTPDase (EC 3.6.1.5) occurs in lymphocytes and plays an important role in immune function, in that hydrolyzes extracellular nucleoside tri- and/or diphosphates to form AMP. *Pythium insidiosum* causes the disease pythiosis, a pyogranulomatous disease of horses, dogs, cattle, cats and humans. Most antifungal drugs are ineffective against this pathogen, and immunotherapy, a treatment approach that relies on the injection of *P. insidiosum* antigen, has been successfully used in humans and horses to manage this disease. In this study, we investigated NTPDase activity in lymphocytes from rabbits inoculated with zoospores of *P. insidiosum*. After immunotherapy, we investigated the relationship between enzymatic activity and the pattern of the immune response. One milliliter of zoospores was inoculated subcutaneously into the coastal region of each rabbit. An average of 17,500 viable mobile zoospores/mL of induction medium was administered. Inoculated rabbits were checked weekly, and the subcutaneous nodular area (cm^2) was measured 28 days after inoculation. Rabbits that developed lesions received four doses of immunotherapy at intervals of 14 days. Blood samples were collected by heart puncture twice a month for the determination of NTPDase activity. The results demonstrated that NTPDase activity in lymphocytes was increased in relation to ATP hydrolysis (by about 100%) in pythiosis and returned to normal values after immunotherapy. The data demonstrating NTPDase activity before and after immunotherapy reinforce the previously elaborated hypothesis that the change from a Th2 to a Th1 immune response is responsible for the curative properties of immunotherapy.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Enzymes that hydrolyze extracellular nucleotides are known as ectonucleotidases, because they are anchored to the cell surface with their active site facing the extracellular medium [1]. NTPDase (EC 3.6.1.5) is an enzyme that hydrolyzes extracellular nucleoside tri-and/or diphosphates (preferably ATP and ADP) and is found in many cell types, such as lymphocytes [2] and platelets [3,4]. The AMP that is produced is converted to adenosine by the catalytic action of ecto-5′-nucleotidase enzyme (EC 3.1.3.5). NTPDase and 5′-nucleotidase control the levels of two potent immunomodulatory molecules, ATP and adenosine. ATP acts as a pro-inflammatory agent that potentiates the release of pro-inflammatory cytokines [5] from activated lymphocytes [6]. Adenosine, in contrast, exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive action by inhibiting the proliferation of T cells [7], the secretion of cytokines and the migration of leukocytes across endothelial barriers [8].

NTPDase activity occurs in lymphocytes from human peripheral blood, thymocytes and mouse spleen lymphocytes, and its activity is higher in human B cells than in T cells [9]. The possible association between NTPDase activity and immune diseases has been evaluated in humans [10], considering that NTPDase activity could be used as an activation marker of lymphocytes during the immune response.

The oomycota *Pythium insidiosum* is the cause of the disease pythiosis, a chronic, pyogranulomatous disease of horses, dogs, cattle, cats and humans [11]. Rabbits are sensitive to zoospore inoculation and can be used as experimental models for studying the disease [12]. The hyphae of this microorganism colonize cutaneous and subcutaneous tissues, produce intestinal lesions, invade blood vessels, and proliferate within bone. Lacking the membrane steroid ergosterol, *P. insidiosum* is unaffected by the usual battery of antifungal agents, and immunotherapy shows promise in the management of infections in horses [13]. In the infected host, *P. insidiosum* triggers a T helper 2 (Th2) response with an inflammatory reaction composed mainly of eosinophils

* Corresponding author. Fax: +55 55322 08906.
E-mail address: janio.santurio@gmail.com (J.M. Santurio).

0753-3322/$ – see front matter © 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biopha.2010.09.016

and mast cells. A switch from a Th2 to a Th1 response is postulated to be the most likely explanation for the curative properties of immunotherapy [14].

The aim of this study was to determine whether immunotherapy affects NTPDase activity in lymphocytes from rabbits with pythiosis, with the ultimate goal of assessing the potential use of NTPDase activity as a peripheral marker of immune function in pythiosis infection.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Nucleotides and Trizma base were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Pythium insidiosum

DMVP 118/98 (CBS 101555) strain, isolated from a pythiosis lesion in the chest of a foal and cultivated in 1.5% Corn Meal Agar at 27 °C for 7 days, was used to experimentally inoculate rabbits and to produce the immunotherapy.

2.3. Zoosporogenesis

Ten pieces of *Paspallum notatum* grass, approximately 2 cm long, were autoclaved for 2 hours and distributed over *P. insidiosum* cultures and incubated at 37 °C for 24 hours. Pieces of infected grass were transferred to an induction medium that contained the following: solution 1, 1.0 M K_2HPO_4, 1.0 M KH_2PO_4, 3.66 M $(NH_4)_2$, 500 mL of distilled water; solution 2, 0.5 M $MgCl_2$ $6H_2O$, 0.5 M $CaCl_2$ $2H_2O$, 250 mL of distilled water. The final composition of the induction medium was 0.5 mL of solution 1 and 0.1 mL of solution 2 in 1000 mL of sterile distilled water. Induction medium containing grass infected by *P. insidiosum* was incubated at 37 °C for 8 hours. Pieces of grass were observed by microscopy, and zoospores were counted using a Neubauer chamber.

2.4. Rabbits

Forty "New Zealand" male rabbits, aged between 2 and 3 months, were used in this work. The control group, with ten rabbits, received one milliliter of saline, while thirty rabbits were inoculated with one milliliter of zoospores subcutaneously into the coastal region. An average of 17,500 viable mobile zoospores/mL of induction medium was administered. Inoculated rabbits were checked weekly, and the subcutaneous nodular area (cm^2) was measured using a sliding calliper when nodules were present. Nodular development was evaluated 28 days after inoculation. Those rabbits not developing lesions were eliminated from the experiment after 28 days. ELISA was used to confirm *Pythium* infection [15]. Rabbits that developed lesions received four doses of immunotherapy or placebo at intervals of 14 days, beginning 1 month after inoculation with viable mobile zoospores. Blood samples were collected by heart puncture twice a month for the determination of NTPDase activity.

2.5. ELISA

Antibodies against *P. insidiosum* were measured by ELISA for serodiagnosis of pythiosis, as previously described by Santurio et al. [15]. The antigen used for the immunization of the rabbits, it was prepared of cultures of *P. insidiosum* stains CBS 101555. The samples of this Oomycete were cultivated under agitation in Sabouraud broth at 37 °C for 7 days. After the cultivation, it was filtered and the mycelia diluted in solution of PBS and sonicated until disruption and centrifuged at 6000 rpm for 5 minutes to collected the supernatant to use as antigen. Plates of polystyrene of 96 wells were sensitized with the antigen diluted in PBS and was incubated to 4 °C for overnight that there was the absorption of the antigen in the surface of the plate. Each well received 10 μg of proteins and, after the incubation period, the plates were washed and stored 4 °C until the moment of the use. The tested serums were diluted in PBS in pH 7.2 (1:2000), distributed 100 μl in each well in the plates and incubated at 37 °C for 1 hour. Then, the plates were incubated with specific secondary antibody for the species (anti-IgG conjugated with peroxidase) with dilution of 1:10,000. The plates received the chromogen buffer (*ortho*-phenylene-diamine) and the reading was carried out through a spectrophotomer of plates with 490 nm.

2.6. Immunotherapy

P. insidiosum was cultivated in 150 ml of Sabouraud broth incubated at 37 °C in a shaker at 130 rpm for 8 days. After removing the culture from the shaker, mycelial material was inactivated with 0.02% thimersal for 20 minutes. The mycelial mass was disrupted by vortexing at 1800 rpm for 5 minutes, mixed with sulfuric ether ($(C_2H_5)_2O$) at 50% volume of the mass and rested for 15 minutes before disrupting for 5 minutes more, according to the protocol described by Santurio et al. [16]. The final product was storage in 2 ml aliquots in glass bottle with a rubber lid and lyophilized for 12 hours. Rabbits were inoculated with zoospores. The first dose of immunotherapy was administered subcutaneously on the 30th day after inoculation and in the coastal region opposite to the zoospore injection. This procedure was repeated every 14 days for a total of four injections.

2.7. Isolation of mononuclear cells from rabbit blood

Mononuclear leukocytes were isolated from rabbit blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Hypaque density gradients as described by Böyum [17].

2.8. Enzyme assays

After the isolation of mononuclear cells, NTPDase activity was determined by a colorimetric assay in compliance with Leal et al. [2]. The reaction medium contained 0.5 mM $CaCl_2$, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 at a final volume of 200 mL. Twenty microliters of intact mononuclear cells suspended on saline solution were added to the reaction medium (2–4 mg protein) and preincubated for 10 minutes at 37 °C. The reaction was started by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2 mM and stopped with 200 mL 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The samples were chilled on ice for 10 minutes before assaying for the release of inorganic phosphate (Pi) as described for Chan et al. [18], using malachite green as a colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. All samples were run in duplicate or triplicate and specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg protein.

2.9. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard, as described by Bradford [19].

2.10. Cellular integrity

The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was used as a marker of cell integrity. The measurement of LDH activity showed

that most cells (approximately 85%) were intact after the isolation procedure (data not shown). The integrity of the cells after incubation was confirmed by microscopic observations in control samples and samples with therapeutic doses (data not shown).

2.11. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer test, using a level of significance of 5%.

3. Results

After 28 days, 20 rabbits did not develop lesions. Ten rabbits developed lesions and received four doses of the immunotherapy, as described in "Materials and Methods". Rabbits with lesions characteristic of pythiosis showed alterations in ATP hydrolysis. Compared to the control (28.5 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 3.77; $n = 10$), enzyme activity was significantly higher in the group with lesions (60.7 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 5.59; $n = 10$; $P < 0.001$). In the inoculated animals that showed no lesions after 28 days, the enzyme activity was similar to control animals (34.5 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 2.92; $n = 20$). Post-hoc analysis with the Tukey-Kramer test revealed that the group with lesions was significantly different compared to the control group and the group without lesions (Fig. 1).

ATP hydrolysis was also evaluated 14 days after inoculation (37.8 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 8.12; $n = 10$) (Fig. 2). The results showed a progressive increase in enzymatic activity, but the ATP hydrolysis was significantly higher after 28 days (60.7 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 5.59; $n = 10$; $P < 0.001$). Compared to inoculation day (day 0), the Tukey-Kramer test revealed that ATP hydrolysis was significantly different only at day 28. After four doses of immunotherapy, the enzymatic activity returned to levels similar to those observed on the day of inoculation (28.3 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 3.44; $n = 10$) (Fig. 3). The decrease in enzymatic activity with immunotherapy was statistically significant by the Tukey-Kramer test ($P < 0.001$). Significant alterations in ADP hydrolysis were not observed after inoculation or immunotherapy (data not shown).

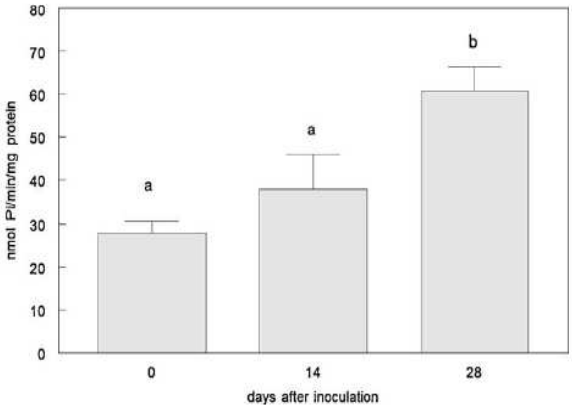


Fig. 2. ATP hydrolysis in lymphocytes from the group with lesions on different days after inoculation. Data represent the mean value ± standard error of 10 rabbits. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Groups that share different letters are statistically different ($P < 0.001$).

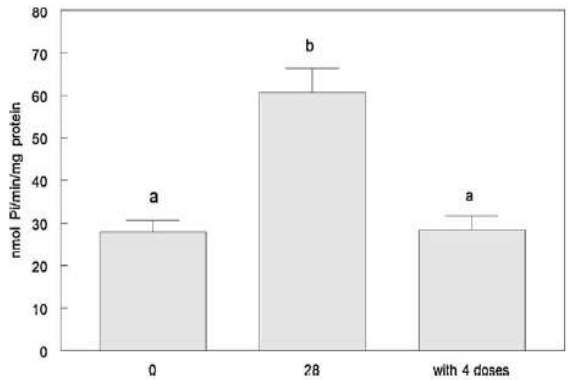


Fig. 3. ATP hydrolysis in lymphocytes obtained from the group with lesions on days 0 and 28 after inoculation and after four doses of immunotherapy. Data represent the mean value ± standard error of 10 rabbits. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Groups that share different letters are statistically different ($P < 0.001$).

4. Discussion

Much remains to be discovered about the pathogenesis of *P. insidiosum* infection and the type of immune response elaborated by the host. Most antifungal drugs are ineffective against this pathogen, and immunotherapy, a treatment approach that relies on the injection of *P. insidiosum* antigen from in vitro cultures, has been successfully used in humans and horses to manage this disease. Mendoza et al. [14] speculated that although key cytokines are up-regulated after successful immunotherapy, a mononuclear reaction is also immediately stimulated by the immunotherapy in infected hosts. It is quite possible that the immunotherapy triggers a cell-mediated response, including natural killer cells and cytotoxic lymphocytes that are abundant in the infected tissues after immunotherapy [20,21], thus compensating for the deficit of phagocytic cells in this population of individuals. A switch from a Th2 to a Th1 response is postulated as the most likely explanation for the curative properties of this approach [22].

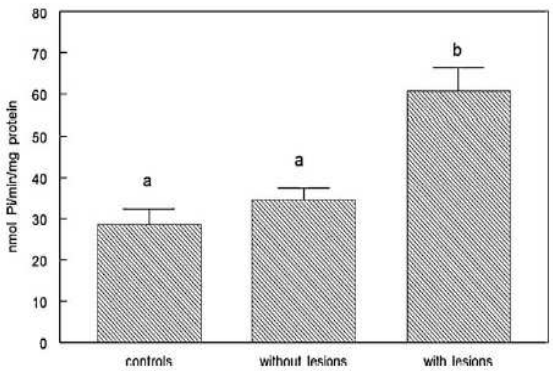


Fig. 1. ATP hydrolysis in lymphocytes obtained from the control group, the inoculated group without lesions and the inoculated group with lesions. Data represent the mean value ± standard error of 10, 20 and 10 rabbits, respectively. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Groups that share different letters are statistically different ($P < 0.001$).

Massive leakage of nucleotides might occur upon cell lysis, however, this non-specific mechanism is restricted to organ injury, traumatic shock or certain inflammatory conditions [5]. NTPDase/CD39 is important for the removal of ATP and the coordinated regulation of immune responses [23]. The increase in extracellular ATP levels drives inflammatory dendritic cell and macrophage differentiation, accompanied by the release of pro-inflammatory mediators (TNF-α, IL-12, IL-1β and ROS), the differentiation of naïve Th cells to Th1 lymphocytes and the initiation of inflammation. When immune cells are intermittently exposed to low ATP

concentrations, the evolving immune response skews towards tolerance and non-responsiveness rather than cellular reactivity [24].

High local concentrations of ATP accumulating in the immunological synapse between effectors cells and target cells can activate pore-forming P2X7 receptors expressed on target cells, resulting in target cell lysis [25–27]. A physiological function for P2X7 remained elusive until more recent studies showed a role for P2X7 in promoting pro-inflammatory responses and controlling intracellular infection in vitro. Several pathogens are now known to protect infected cells against P2X7-dependent apoptosis by producing ATPases that consume extracellular ATP [28].

It appears that low-level purinergic signaling by P2 receptors, induced by nucleotides at decreased concentrations, modulates ongoing inflammatory and immune responses. Activation of P2 receptors, most likely P2Y receptor subtypes, attenuates pro-inflammatory cytokines production by Mo/Mø, diminishes the Th1 cell-stimulatory capacity of DCs and inhibits lymphocyte effector functions. Thus, upon progression of the immune response, nucleotide-mediated purinergic signaling may switch from being predominantly pro-inflammatory to being mostly immunomodulatory, depending on the extracellular concentrations of the nucleotides as well as the P2 receptor subtype(s) ligated by these nucleotides. This switch could be part of a mechanism for fine-tuning the immune effector class in response to microenvironmental signals according to the tissue in which the response occurs [29–31]. Furthermore, Ado-mediated P1 receptor signaling during the second stage down-regulates neutrophil effector functions, contributes to alternative activation of macrophages, stimulates the Th2 cell-stimulatory capacity of DCs and inhibits lymphocyte effector functions [5]. Conceptually, the idea of ectoenzymatic control of leukocyte trafficking allows new insights into adhesive events and offers multiple novel targets for manipulating the movement of immune cells. ATP-generating and ATP-consuming pathways coexist on the surface of leukocytes and endothelial cells, and their dynamic balance regulates local ATP and adenosine levels in this microenvironment [32].

Our results demonstrate that during pythiosis, there is an increase in the activity of NTPDase in relation to ATP hydrolysis, without alterations in the rate of ADP hydrolysis. As a result, we expect that there will be a decrease in the concentration of extracellular ATP. At low concentrations, extracellular ATP, as well as ADP, possesses an affinity for the P2Y purinergic receptors on the surfaces of lymphocytes. Binding to the P2Y receptor stimulates the Th2 immune response, leading to the production of IL-4 and activation of eosinophils and mast cells, which can ultimately cause significant tissues lesions. After treatment with four doses of immunotherapy, we observed that the rate of ATP hydrolysis was similar to the rate observed prior to the inoculation. Thus, the decrease in NTPDase activity could be responsible for the increase of the extracellular ATP concentration, which, at high concentrations, could bind to P2X7 receptors. The interaction with purinergic receptors would provoke a Th1 response pattern, with secretion of pro-inflammatory cytokines and activation of cytotoxic T lymphocytes and macrophages that would destroy the hyphae. The switch from a Th2 to a Th1 response pattern would lead to a decrease of lesions (Fig. 4).

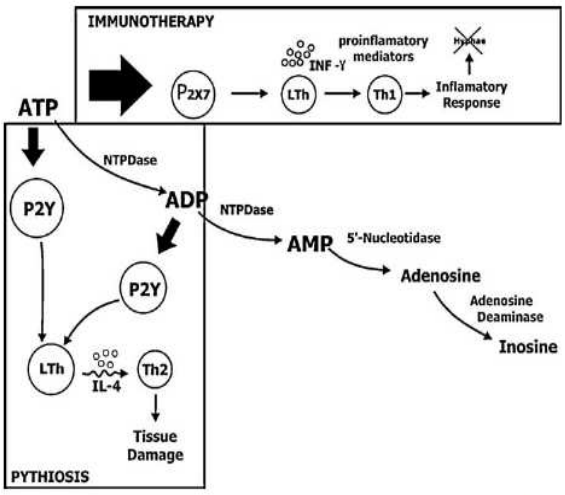


Fig. 4. Effect of extracellular ATP concentrations on the immune response during pythiosis and immunotherapy. The increased NTPDase activity during pythiosis decreases the extracellular ATP concentration, which can bind to P2Y receptors, as can ADP. Consequently, a Th2 response could develop and cause tissues damage. With immunotherapy, the decreased NTPDase activity could lead to an increased concentration of extracellular ATP that would act on P2X7 receptors, stimulating a Th1 immune response and inducing inflammatory mediators that would initiate the destruction of *Pythium insidiosum* hyphae.

5. Conclusion

In conclusion, the observed change in NTPDase activity before and after immunotherapy reinforces the hypothesis, previously elaborated by Mendonza and Newton [22] that the change from a Th2 to a Th1 immune response might be responsible for the curative properties of immunotherapy.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo à Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (FIPE-UFSM) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biopha.2010.09.016.

References

[1] Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. Drug Development Research 2001;52:44–56.
[2] Leal DBR, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CAM, Silva JEP, et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. Biochim Biophys Acta 2005;1721:9–15.
[3] Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch VM, Mazzanti CM, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. Thrombosis Research 2003;109:189–94.
[4] Pilla C, Emanuelli T, Frasetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJF. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in human blood platelets. Platelets 1996;7:225–30.
[5] Bours MJ, Swennwen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacology and Therapeutics 2006;112:358–404.
[6] Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA. Secretion of IL-2 and IFN-γ, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. Journal of Immunology 2003;170:2962–70.
[7] Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. Journal of Immunology 2006;177:6780–6.
[8] Thompson LF, Takedachi M, Ebisuno Y, Tanaka T, Miyasaka M, Mills JH, et al. Regulation of leukocyte migration across endothelial barriers by ECTO-5'-Nucleotidase-generated adenosine. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2008;27:755–60.
[9] Wang TF, Rosenberg PA, Guidotti G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. Molecular Brain Research 1997;47:295–302.
[10] Leal DBR, Streher CA, Bertoncheli CM, Carli LFD, Silva JEP, Morsch VM, et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. Biochim Biophys Acta 2005;1746:129–34.

[11] De Cock AW, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp., the etiologic agent of pythiosis. Journal of Clinical Microbiology 1987;25:344–9.
[12] Miller RI, Campbell RSF. Experimental pythiosis in rabbits. Sabouraudia 1983;21:331–41.
[13] Mendoza L, Ajello L, McGinnis M. Infections caused by the oomycetous pathogen, *Pythium insidiosum*. Journal de Mycologie Médicale 1996;6:151–64.
[14] Mendoza L, Mandy W, Glass W. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. Vaccine 2003;21:2797–804.
[15] Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Alves SH, Lubeck I, Griebeler J, et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. Pesquisa Veterinária Brasileira 2006;26(1):47–50.
[16] Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Festugatto R, Lubeck I, Sallis ESV, et al. Three types of immunotherapics against pythiosis insidiosi developed and evaluated. Vaccine 2003;21:2535–40.
[17] Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, isolation on mononuclear cells by centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 1968;97:77–89.
[18] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+}-ATPase activity. Analytical Biochemistry 1986;157:375–80.
[19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976;72:248–54.
[20] Miller RI. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. Australian Veterinary Journal 1981;57:377–82.
[21] Mendoza L, Villalobus J, Calleja CE, Solis O. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosi in horses. Mycopathologia 1992;118:89–95.
[22] Mendoza L, Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. Medical Mycology 2005;43(6):477–86.
[23] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. Biochimica et Biophysica Acta 2008;1783(5):673–94.
[24] Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. Current Opinion in Pharmacology 2009;9(4):507–13.
[25] Steinberg TH, Di Virgilio F. Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. Current Opinion in Immunology 1991;3(1):71–5.
[26] Macino B, Zambon A, Milan G, Cabrelle A, Ruzzene M, Rosato A, et al. CD45 regulates apoptosis induced by extracellular adenosine triphosphate and cytotoxic T lymphocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications 1996;226:769–76.
[27] Correale P, Tagliaferri P, Guarrasi R, Caraglia M, Giuliano M, Marinetti MR, et al. Extracellular adenosine-5'-triphosphate involvement in the death of LAK-engaged human tumor cells via P2X-receptor activation. Immunology Letters 1997;55(2):69–78.
[28] Coutinho-Silva R, Corrêa G, Sater AA, Ojcius DM. The P2X(7) receptor and intracellular pathogens: a continuing struggle. Purinergic Signaling 2009;5(2):197–204.
[29] Di Virgilio F, Ferrari D, Idzko M, Panther E, Norgauer J, La Sala A, et al. Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation. Drug Development Research 2003;59(1):171–4.
[30] La Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. Journal of Leukocyte Biology 2003;73(3):339–43.
[31] Mazzoni A, Segal DM. Controlling the road to dendritic cell polarization. Journal of Leukocyte Biology 2004;75:721–30.
[32] Salmi M, Jalkanen S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. Nature Reviews. Immunology 2005;5:760–71.

3.2 Artigo 2

Atividade da E-ADA em linfócitos de um modelo experimental de pitiose tratada com imunoterapia.

E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy.

Barbara Charlotte Bach, Daniela Bitencourt Rosa Leal, Jeandre Augusto dos Santos Jaques, Viviane do Carmo Gonc¸alves Souza, Jader Betsch Ruchel, Karine Bizzi Schlemmer, Régis Adriel Zanette, Pedro Abib Hecktheuer, Patrique de Lima Pereira, Emerson André Casali, Sydney Hartz Alves e Janio Morais Santurio.

Publicado na revista Cell Biochemistry & Function

CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION

CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION
Cell Biochem Funct (2012)
Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) **DOI**: 10.1002/cbf.2921

E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy

Barbara Charlotte Bach[1], Daniela Bitencourt Rosa Leal[2], Jeandre Augusto dos Santos Jaques[2], Viviane do Carmo Gonçalves Souza[2], Jader Betsch Ruchel[2], Karine Bizzi Schlemmer[1], Régis Adriel Zanette[1], Pedro Abib Hecktheuer[1], Patrique de Lima Pereira[1], Emerson André Casali[3], Sydney Hartz Alves[1] and Janio Morais Santurio[1]*

[1]*Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Santa Maria, RS, Brazil*
[2]*Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário Santa Maria, RS, Brazil*
[3]*Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, Porto Alegre, RS, Brazil*

Pythiosis is a life-threatening disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*. Some authors have suggested the involvement of a Th2-like immune response in the infected host, which leads to extensive tissue damage. The switch from a Th2 to a Th1 response pattern is one hypothesis to explain the curative properties of immunotherapy. Taking into account the importance of immunotherapy for pythiosis treatment and the contribution of adenine nucleotides in the immunoregulation of the host, we evaluated the ecto-adenosine deaminase (E-ADA; EC 3·5.4·4) activity in lymphocytes from rabbits inoculated with *P. insidiosum*. Rabbits were inoculated with 1 milliliter of zoospores subcutaneously injected into the lateral thorax; after developing lesions, the rabbits received eight doses of immunotherapy. E-ADA activity was measured in lymphocytes and the adenine nucleotides and adenosine levels were quantitatively determined in serum. Rabbits with characteristic lesions of pythiosis showed a decreased E-ADA activity (82·36%), a decreased adenosine triphosphate concentration (54·04%) and a higher adenosine concentration (2·51 fold), when compared with controls, after 28 days of inoculation. However, after the immunotherapy, the rabbits showed an increase in the E-ADA activity when compared with control (78·62%), contributing for the change in the immune response. Our results reinforce the hypothesis that the change from a Th2 to a Th1 immune response with the participation of the purinergic system could be responsible for the curative properties of immunotherapy. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS—pythiosis; *Pythium insidiosum*; adenosine deaminase; lymphocytes; adenosine

INTRODUCTION

Pythiosis is a life-threatening disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*, which is endemic to tropical and subtropical regions and infects both humans and animals. The most common sites of infection in humans are the arteries and eyes, whereas cutaneous, subcutaneous and gastrointestinal infections predominate in animals.[1,2] Rabbits are the commonly used laboratory animals that are susceptible to experimental infection with *P. insidiosum* and thus are the commonly used experimental model for testing the effectiveness of immunotherapy and antimycotic agents.[3,4] Available antifungal drugs have mostly been unsuccessful for the treatment of this organism, most likely because antifungal drugs usually target the ergosterol pathway, which *P. insidiosum* lacks.[5,6] Immunotherapy with mycelial antigens from dead *P. insidiosum* is a promising non-invasive therapy and provides beneficial results. Some authors have suggested the involvement of a Th2-like immune response in hosts infected with *P. insidiosum*, leading to extensive tissue damage induced by activated macrophages, mast cells, eosinophils and other inflammatory cells.[5,7,8] It has been speculated that the switch from a Th2 to a Th1 response pattern is an explanation for the curative properties of immunotherapy. However, this hypothesis has yet to be proven.[5]

It is known that the purinergic system participates in immune system modulation during infections by mediating the interactions between various signaling molecules, such as adenosine triphosphate (ATP) and adenosine, with specific purinergic receptors. The ATP is released into the extracellular space by injured or pathogen-stimulated cells. The extracellular ATP level is mainly controlled by the action of purinergic system ectoenzymes, such as ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (CD39, E-NTPDase; EC 3.6.5.1). In turn, the extracellular adenosine produced

*Correspondence to: Janio Morais Santurio, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: janio.santurio@gmail.com

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 11 May 2012
Revised 4 September 2012
Accepted 24 September 2012

by the hydrolysis of ATP is regulated by ecto-adenosine deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), which catalyzes the irreversible deamination of adenosine. The co-existence of nucleotide-consuming, nucleotide-generating and nucleotide-interconverting pathways on the surface of immune cells, which also co-express ATP and adenosine receptors, is important in determining the duration and nature of the purinergic signaling. High concentrations of ATP in the extracellular milieu exert effects via P2X receptors that are expressed on target cells, activating pro-inflammatory cytokine production and triggering a Th1 response. Conversely, low concentrations of extracellular ATP and adenosine diphosphate (ADP) possess an affinity for P2Y purinergic receptors, which stimulate the Th2 immune response. [9,10] Adenosine, in turn, exerts potent anti-inflammatory and immunosuppressive actions by inhibiting the proliferation of T cells and the secretion of cytokines[11,12] through binding with P1 receptors.[13,14]

Taking into account the importance of immunotherapy for pythiosis treatment as well as the participation of adenine nucleotides in the immunoregulation of the host and their importance in adenosine formation, the goal of the present study was to evaluate E-ADA activity in lymphocytes from rabbits inoculated with *P. insidiosum*.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Nucleotides, adenosine, bovine serum albumin, Trizma base and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All chemicals used in this experiment were of analytical grade and of the highest purity.

P. insidiosum

The DMVP 118/98 (CBS 101555) strain, which was isolated from a pythiosis lesion in the chest of a foal and cultivated on 1·5% Corn Meal Agar at 27 °C for 7 days, was used to experimentally inoculate rabbits and as a source for the *P. insidiosum* antigen used in the immunotherapy.

Zoosporogenesis

Ten pieces of *Paspalum notatum* grass, approximately 2 cm long, were autoclaved for 2 h, distributed over *P. insidiosum* cultures and incubated at 37 °C for 24 h. Pieces of infected grass were transferred to an induction medium that contained the following: solution 1 (1·0 M K_2HPO_4, 1·0 M KH_2PO_4, 3·66 M $(NH_4)_2$ and 500 ml of distilled water) and solution 2 (0·5 M $MgCl_2$ 6 H_2O, 0·5 M $CaCl_2$ 2 H_2O and 250 ml of distilled water). The final composition of the induction medium was 0·5 ml of solution 1 and 0·1 ml of solution 2 in 1000 ml of sterile distilled water. Induction medium containing grass infected by *P. insidiosum* was incubated at 37 °C for 8 h. Pieces of grass were observed by microscopy, and zoospores were counted using a Neubauer chamber.[15]

Rabbits

Thirty New Zealand male rabbits, aged between 2 and 3 months, were used in this work. A control group of six rabbits received 1 ml of saline, whereas 24 rabbits were inoculated with 1 ml of zoospores subcutaneously into the lateral thorax. An average of 17 500 viable mobile zoospores/ml of induction medium was administered. Inoculated rabbits were checked weekly, and the subcutaneous nodular area (cm^2) was measured using a sliding caliper when nodules were present. Nodular development was evaluated 28 days after inoculation. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to confirm pythiosis.[16] Rabbits that developed lesions received eight doses of immunotherapy ($n = 6$) or placebo ($n = 6$) at intervals of 14 days, beginning 30 days after inoculation with viable mobile zoospores. Blood samples were also collected from the rabbits that did not develop lesions at the same time points to assay E-ADA activity. Blood samples were collected from all the groups by heart puncture to determine the E-ADA activity (28 and 150 days after inoculation) and purine levels (28 days after inoculation). All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the UFSM (protocol number: 23081·004001/2009-12).

ELISA

Antibodies against *P. insidiosum* were measured by ELISA for serodiagnosis of pythiosis as previously described. [16] The antigen immobilized to the microplates was prepared from cultures of *P. insidiosum* strain CBS 101555. Samples of this oomycete were cultivated under agitation in Sabouraud broth at 37 °C for 7 days. After cultivation, the culture was filtered, and the mycelia were diluted in a phosphate buffered saline (PBS) solution, sonicated until disruption and centrifuged at 6000 rpm for 5 min to collect the supernatant to use as antigen. Polystyrene 96-well microtiter plates were coated with antigen diluted in PBS and incubated overnight at 4 °C to allow absorption of the antigen onto the surface of the plate. Each well received 10 µg of protein; and after the incubation period, the plates were washed and stored at 4 °C until they were used. The tested sera were diluted in PBS pH 7·2 (1:2000), distributed with 100 µl per well in the plates and incubated at 37 °C for 1 h. Then, the plates were incubated with 100 µl of anti-rabbit secondary antibody (anti-IgG conjugated with peroxidase) diluted 1:10 000. The plates received chromogen buffer (ortho-phenylene-diamine), and a plate spectrophotomer at a wavelength of 490 nm was used to evaluate the reaction.

Separation of blood serum

Blood samples were collected in tubes without anticoagulant; and after clot formation, they were centrifuged at 3101 rpm for 15 min at room temperature. The resulting serum samples were aliquoted in microtubes and kept at −80 °C until purine quantification.

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

by the hydrolysis of ATP is regulated by ecto-adenosine deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), which catalyzes the irreversible deamination of adenosine. The co-existence of nucleotide-consuming, nucleotide-generating and nucleotide-interconverting pathways on the surface of immune cells, which also co-express ATP and adenosine receptors, is important in determining the duration and nature of the purinergic signaling. High concentrations of ATP in the extracellular milieu exert effects via P2X receptors that are expressed on target cells, activating pro-inflammatory cytokine production and triggering a Th1 response. Conversely, low concentrations of extracellular ATP and adenosine diphosphate (ADP) possess an affinity for P2Y purinergic receptors, which stimulate the Th2 immune response. [9,10] Adenosine, in turn, exerts potent anti-inflammatory and immunosuppressive actions by inhibiting the proliferation of T cells and the secretion of cytokines[11,12] through binding with P1 receptors.[13,14]

Taking into account the importance of immunotherapy for pythiosis treatment as well as the participation of adenine nucleotides in the immunoregulation of the host and their importance in adenosine formation, the goal of the present study was to evaluate E-ADA activity in lymphocytes from rabbits inoculated with *P. insidiosum*.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Nucleotides, adenosine, bovine serum albumin, Trizma base and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All chemicals used in this experiment were of analytical grade and of the highest purity.

P. insidiosum

The DMVP 118/98 (CBS 101555) strain, which was isolated from a pythiosis lesion in the chest of a foal and cultivated on 1·5% Corn Meal Agar at 27 °C for 7 days, was used to experimentally inoculate rabbits and as a source for the *P. insidiosum* antigen used in the immunotherapy.

Zoosporogenesis

Ten pieces of *Paspalum notatum* grass, approximately 2 cm long, were autoclaved for 2 h, distributed over *P. insidiosum* cultures and incubated at 37 °C for 24 h. Pieces of infected grass were transferred to an induction medium that contained the following: solution 1 (1·0 M K_2HPO_4, 1·0 M KH_2PO_4, 3·66 M $(NH_4)_2$ and 500 ml of distilled water) and solution 2 (0·5 M $MgCl_2$ 6 H_2O, 0·5 M $CaCl_2$ 2 H_2O and 250 ml of distilled water). The final composition of the induction medium was 0·5 ml of solution 1 and 0·1 ml of solution 2 in 1000 ml of sterile distilled water. Induction medium containing grass infected by *P. insidiosum* was incubated at 37 °C for 8 h. Pieces of grass were observed by microscopy, and zoospores were counted using a Neubauer chamber.[15]

Rabbits

Thirty New Zealand male rabbits, aged between 2 and 3 months, were used in this work. A control group of six rabbits received 1 ml of saline, whereas 24 rabbits were inoculated with 1 ml of zoospores subcutaneously into the lateral thorax. An average of 17 500 viable mobile zoospores/ml of induction medium was administered. Inoculated rabbits were checked weekly, and the subcutaneous nodular area (cm^2) was measured using a sliding caliper when nodules were present. Nodular development was evaluated 28 days after inoculation. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to confirm pythiosis.[16] Rabbits that developed lesions received eight doses of immunotherapy ($n = 6$) or placebo ($n = 6$) at intervals of 14 days, beginning 30 days after inoculation with viable mobile zoospores. Blood samples were also collected from the rabbits that did not develop lesions at the same time points to assay E-ADA activity. Blood samples were collected from all the groups by heart puncture to determine the E-ADA activity (28 and 150 days after inoculation) and purine levels (28 days after inoculation). All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the UFSM (protocol number: 23081·004001/2009-12).

ELISA

Antibodies against *P. insidiosum* were measured by ELISA for serodiagnosis of pythiosis as previously described. [16] The antigen immobilized to the microplates was prepared from cultures of *P. insidiosum* strain CBS 101555. Samples of this oomycete were cultivated under agitation in Sabouraud broth at 37 °C for 7 days. After cultivation, the culture was filtered, and the mycelia were diluted in a phosphate buffered saline (PBS) solution, sonicated until disruption and centrifuged at 6000 rpm for 5 min to collect the supernatant to use as antigen. Polystyrene 96-well microtiter plates were coated with antigen diluted in PBS and incubated overnight at 4 °C to allow absorption of the antigen onto the surface of the plate. Each well received 10 µg of protein; and after the incubation period, the plates were washed and stored at 4 °C until they were used. The tested sera were diluted in PBS pH 7·2 (1:2000), distributed with 100 µl per well in the plates and incubated at 37 °C for 1 h. Then, the plates were incubated with 100 µl of anti-rabbit secondary antibody (anti-IgG conjugated with peroxidase) diluted 1:10 000. The plates received chromogen buffer (ortho-phenylene-diamine), and a plate spectrophotomer at a wavelength of 490 nm was used to evaluate the reaction.

Separation of blood serum

Blood samples were collected in tubes without anticoagulant; and after clot formation, they were centrifuged at 3101 rpm for 15 min at room temperature. The resulting serum samples were aliquoted in microtubes and kept at −80 °C until purine quantification.

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Immunotherapy

P. insidiosum was cultivated in 150 ml of Sabouraud broth incubated at 37 °C in a shaker at 130 rpm for 8 days. After removing the culture from the shaker, the mycelial material was inactivated with 0·02% thimerosal for 20 min. The mycelial mass was disrupted by vortexing at 1800 rpm for 5 min, mixed with sulfuric ether [$(C_2H_5)_2O$] at 50% volume of the mass and allowed to rest for 15 min before further disruption for five more minutes, as previously described.[4] The final product was stored in 2-ml aliquots in a glass bottle with a rubber lid and lyophilized for 12 h. The first dose of immunotherapy was administered subcutaneously on day 30 after inoculation in the lateral thorax opposite to the zoospore injection site. This procedure was repeated every 14 days for a total of eight injections.

Isolation of mononuclear cells from rabbit blood

Lymphocyte-rich mononuclear cells were isolated from the rabbits' peripheral blood, which was collected with 7·2 mg dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid as an anticoagulant and separated on Ficoll-Histopaque density gradients, as described by Boyum.[17] The percentage of lymphocytes was greater than 93%, as has been previously described.[18]

Adenosine deaminase assay

E-ADA activity was measured spectrophotometrically in lymphocytes using the method of Giusti and Galanti,[19] which is based on the direct measurement of the formation of ammonia produced when E-ADA acts in the presence of excess adenosine. Briefly, 25 µl of lymphocyte suspension was reacted with 21 mM of the substrate (adenosine), pH 6·5, and the solution was incubated for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped by adding 106 mM phenol and 0·16 mM sodium nitroprussiate and hypochlorite solution. Ammonium sulfate (75 µM) was used as the ammonium standard. All experiments were performed in triplicate, and the values were expressed as U mg^{-1} of protein.

HPLC

The quantitative determination of adenine nucleotides and adenosine levels was performed in serum by high-performance liquid chromatography (HPLC). First, proteins were denatured by the addition of 0·6 M perchloric acid. Then, all samples were centrifuged (9800 rpm for 10 min), and the obtained supernatants were neutralized with 4 N KOH and clarified with a second centrifugation step (9800 rpm for 15 min). Aliquots of 40 µl were applied to a reversed-phase HPLC system using a 25 cm C18 Shimadzu column (Shimadzu, Japan) at 260 nm with a mobile phase containing 60 mM KH_2PO_4 and 5 mM tetrabutylammonium chloride, pH 6·0, in 30% methanol, according to a previously described method.[20] The peaks of purines [ATP, ADP, adenosine monophosphate (AMP)] and adenosine) were identified by their retention times and quantified by comparison with standards. The results are expressed as nanomoles of the different compounds per milliliter of serum.

Protein determination

Protein levels were measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard, as described by Bradford.[21]

Statistical analysis

Adenosine deaminase data were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Tukey–Kramer test. Statistical analysis of purine levels was carried out by unpaired *t*-test. $P < 0·05$ was considered to represent a significant difference between groups. All data are expressed as the mean ± Standard Error of the Mean (SEM).

RESULTS

Adenosine deaminase assay in lymphocytes

After 28 days, 12 rabbits did not develop lesions and 12 rabbits did develop lesions. Figure 1 shows the E-ADA activity in the lymphocytes of these animals, 28 days after inoculation. The enzyme activity did not show any significant difference between the group that did not present lesions (17·54 U mg^{-1} protein; SEM = 1·361; $n = 12$) and the control group ($P > 0·05$). However, the enzyme activity was significantly lower in the group with pythiosis lesions (3·6 U mg^{-1} protein; SEM = 0·6; $n = 12$) when compared with the controls (20·9 U mg^{-1} protein; SEM = 4·0; $n = 6$) ($P < 0·01$). Twelve rabbits did develop lesions, but only six were treated with eight doses of immunotherapy, as described in the Materials and Methods section. Figure 2 demonstrates the E-ADA activity in the lymphocytes of these rabbits 150 days after inoculation. The group with lesions (37·3 U mg^{-1} protein; SEM = 5·7; $n = 6$) that received immunotherapy demonstrated an increase in E-ADA activity

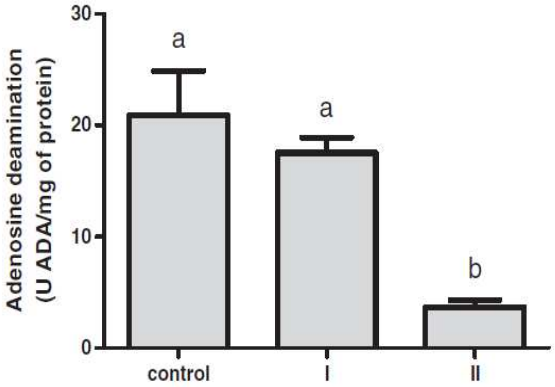


Figure 1. Ecto-adenosine deaminase (E-ADA) activity in lymphocytes obtained from normal rabbits (control), rabbits without characteristic pythiosis lesions (I), rabbits with characteristic pythiosis lesions after 28 days of inoculation (II). Data represent the mean ± SEM of 6, 12 and 12 rabbits, respectively. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey–Kramer test. Groups with different letters are significantly different ($P < 0.01$).

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

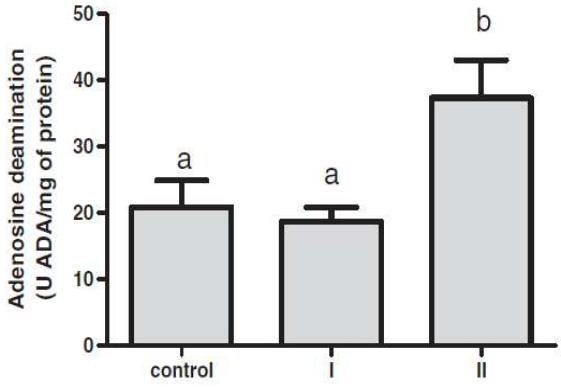


Figure 2. Ecto-adenosine deaminase (E-ADA) activity in lymphocytes obtained from normal rabbits (control), rabbits without characteristic pythiosis lesions (I), rabbits with lesions treated with eight doses of immunotherapy (II). Data represent the mean ± SEM of 6, 12 and 6 rabbits, respectively. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey–Kramer test. Groups with different letters are significantly different. ($P < 0.01$).

when compared with the control group ($P < 0{\cdot}01$). The animals that received the placebo did not survive to pythiosis, after 150 days of inoculation ($n = 6$).

ATP, ADP, AMP and adenosine determination in serum

Table 1 shows adenine nucleotides and adenosine levels in the serum of control rabbits and rabbits that developed characteristic pythiosis lesions at 28 days post-inoculation. Compared with the control group, the rabbits with lesions showed significantly decreased ATP concentrations ($P < 0{\cdot}05$) and significantly increased adenosine concentrations ($P < 0.01$). There were no significant changes in the ADP and AMP concentrations ($P > 0{\cdot}05$). Also, there was no significant difference between control group and rabbits that did not present lesions (data not shown).

DISCUSSION

The purpose of the present study was to investigate the E-ADA activity in the lymphocytes of rabbits that were experimentally infected with *P. insidiosum*. Previously, our group demonstrated that there is an increase in E-NTPDase activity in relation to ATP hydrolysis during pythiosis, without alterations in the rate of ADP hydrolysis.[22] It was suggested that the ATP concentration in the serum could consequently be decreased, resulting in binding to the P2Y receptors on lymphocytes. Activation of these receptors stimulates the Th2 immune response and leads to the production of IL-4 and the activation of eosinophils and mast cells, which can cause significant tissues lesions. Furthermore, it was observed that immunotherapy for pythiosis was able to reduce the E-NTPDase activity, resulting in an increase in the levels of extracellular ATP, which could bind to P2X7 receptors and cause a decrease in the lesions via Th1 immune response.

Table 1. The measurement of purine levels from serum of normal rabbits and those inoculated with *Pythium insidiosum* with characteristic lesion.

	Controls ($nmol\,ml^{-1}$; $n = 5$)	With lesion ($nmol\,ml^{-1}$; $n = 5$)
ATP	20·67 ± 4·80	9·50 ± 1·19*
ADP	40·92 ± 3·19	32·52 ± 3·37
AMP	8·90 ± 1·33	7·18 ± 1·02
Adenosine	1·35 ± 0·23	3·39 ± 0·73**

Adenine nucleotides and adenosine level measurement from serum of control and rabbits inoculated with lesion was addressed using HPLC methodology. Results are presented as means ± SEM. The comparison among groups was made by Student's *t* test. Statistically significant differences are represented by
*($p < 0{\cdot}05$) and
**($p < 0{\cdot}01$).

In this work, we confirmed that the extracellular ATP concentration is low in the serum of rabbits with pythiosis. Consequently, ATP could stimulate the Th2 immune response observed during infection, leading to a characteristic lesion. Additionally, no changes in the ADP concentration were observed in the serum of infected rabbits, corroborating the ADP hydrolysis observed previously in lymphocytes [22] and indicating that E-NTPDase is able to hydrolyze ATP and preserve normal levels of extracellular ADP and AMP, as demonstrated by HPLC.

Taking into consideration that purinergic system enzymes are intimately involved in the modulation of the immune system, the E-ADA activity in lymphocytes was investigated in infected rabbits. We verified that there is reduced E-ADA activity in lymphocytes from these experimental model animals. This result was confirmed by the increase in the extracellular adenosine levels found in serum. The immunosuppressive actions of adenosine are triggered by the activation of four receptor subtypes (A1, A2A, A2B and A3) belonging to the family of purinergic receptors known as P1. At physiological adenosine concentrations, A1 and A3 purinergic receptors are preferentially activated, whereas at higher adenosine concentrations, such as those observed in inflammation, A2B receptors are activated.[13] A2A receptors are the most abundant adenosine receptors on human or murine CD4+ T cells[23], and the A2B receptor is a low-affinity receptor that appears to be absent in both peripheral and mucosal T cells.[24] A2B and A2A receptor activation leads to increased levels of cyclic adenosine monophosphate via activation of adenylyl cyclase, which inhibits immune cell function. Thus, elevated levels of cyclic adenosine monophosphate induce decreases in interferon-γ, interleukin-12 and tumor necrosis factor-*alpha* and increase the levels of anti-inflammatory cytokines, such as interleukin-10, transforming growth factor-beta and interleukin-1 receptor antagonist. Together, these downstream signals inhibit cell function.[10,25]

In this experimental model of pythiosis, our results demonstrate increased levels of extracellular adenosine, which could be acting on A2 receptors and potentiating the anti-inflammatory effects that occur during the infection because of ATP binding to P2Y receptors (Figure 3). After eight doses of immunotherapy, we observed that E-ADA activity increased, which could lead to reduced levels

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

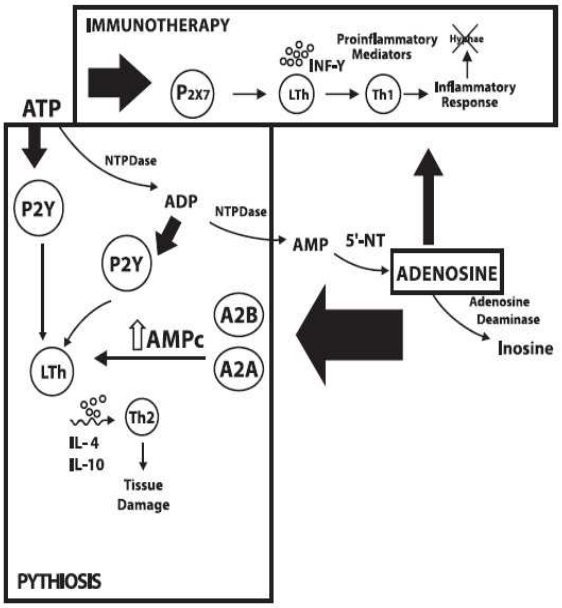


Figure 3. Effects of extracellular adenosine triphosphate (ATP) and adenosine concentrations on the immune response during pythiosis and immunotherapy. The increased E-NTPDase activity and decreased ecto-adenosine deaminase (E-ADA) activity during pythiosis lead to a decrease in the concentration of extracellular ATP and an increase in the extracellular adenosine concentration, respectively. Decreased extracellular ATP levels can bind to P2Y receptors, as can adenosine diphosphate (ADP), whereas increased extracellular adenosine can bind to A2A or/and A2B receptors. The involvement of a Th2-like immune response in the infected host and a Th1-like immune response induced by immunotherapy is just one hypothesis that has yet to be proven.

of extracellular adenosine, thus favoring a Th1 immune response with pro-inflammatory effects that would decrease the lesions. Again, the results reinforce the hypothesis of Mendoza and Newton,[5] which suggests that the change from Th2 to Th1 immune response could be responsible for the curative properties of immunotherapy for pythiosis.

The pathogenesis of *P. insidiosum* infection and the immune response of the host are not completely known. Our findings again demonstrate the importance of the purinergic system in the modulation of the immune response during infection by *P. insidiosum* because the activity of the enzymes that degrade adenine nucleotides and the levels of extracellular adenine nucleotides and nucleoside can modulate immune changes that occur after pythiosis immunotherapy. These findings also suggest the participation of purinergic receptors in the modulation of the immune response.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that there is no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo à Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (FIPE-UFSM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

REFERENCES

1. De Cock AW, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. *J Clin Microbiol* 1987; **25**: 344–349.
2. Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 2967–2973.
3. Miller RI, Campbell RS. Experimental pythiosis in rabbits. *Sabouraudia* 1983; **21**: 331–341.
4. Santurio JM, Leal AT, Leal AB, *et al*. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosi developed and evaluated. *Vaccine* 2003; **21**: 2535–2540.
5. Mendoza L, Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Med Mycol* 2005; **43**: 477–486.
6. Sekhon AS, Padhye AA, Garg AK. *In vitro* sensitivity of *Penicillium marneffei* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. *Eur J Epidemiol* 1992; **8**: 427–432.
7. Mendoza L, Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. *Mycopathologia* 1986; **94**: 123–129.
8. Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. *Vaccine* 2003; **21**: 2797–2804.
9. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; **112**: 358–404.
10. Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009; **9**: 507–513.
11. Gessi S, Varani K, Merighi S, *et al*. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signalling* 2007; **3**: 109–116.
12. Linden J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1835–1837.
13. Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* 2001; **61**: 443–448.
14. Ralevic V, Burnstock G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect* 2003; **16**: 133–140.
15. Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Cavalheiro AS, Ferreiro L. *In vitro* zoosporogenesis among oomycetes *Pythium insidiosum* isolates. *Ciência Rural* 2008; **38**: 143–147.
16. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, *et al*. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2006; **26**: 47–50.
17. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; **97**: 77–89.
18. Jaques JA, Peres Rezer JF, Ruchel JB, *et al*. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. *Anal Biochem* 2010; **410**: 34–39.
19. Giusti G, Galanti B. *Methods of Enzymatic Analysis*. VerlagChemie: Weinheim, 1984; 315–323.

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

20. Voelter W, Zech K, Arnold P, Ludwig G. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. *J Chromatogr* 1980; **199**: 345–354.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–254.
22. Bach BC, Leal DB, Ruchel JB, *et al.* Immunotherapy for pythiosis: effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. *Biomed Pharmacother* 2010; **64**: 718–722.
23. Koshiba M, Rosin DL, Hayashi N, Linden J, Sitkovsky MV. Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. *Mol Pharmacol* 1999; **55**: 614–624.
24. Alam MS, Kurtz CC, Wilson JM, *et al.* A2A adenosine receptor (AR) activation inhibits pro-inflammatory cytokine production by human CD4+ helper T cells and regulates Helicobacter-induced gastritis and bacterial persistence. *Mucosal Immunol* 2009; **2**: 232–242.
25. Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, Auchampach JA. Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **317**: 172–180.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o envolvimento da sinalização purinérgica em linfócitos de coelhos infectados experimentalmente com *P. insidiosum*. As ecto-enzimas do sistema purinérgico desempenham importante papel no metabolismo do ATP e na geração do seu nucleosídeo correspondente, adenosina. Assim, contribuem na regulação da resposta inflamatória, através da modulação da liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como no tipo de resposta imune desencadeada pelo hospedeiro durante a infecção.

A pitiose é uma doença crônica, piogranulomatosa, que acomete animais e humanos, sendo causada pelo oomiceto *P. insidiosum* (DE COCK et al., 1987). Devido à ausência de ergosterol na membrana citoplasmática, as drogas antifúngicas são de pouca eficácia no tratamento, fazendo da abordagem cirúrgica e da imunoterapia as principais opções terapêuticas (MENDOZA; NEWTON, 2005). Uma provável explicação para o mecanismo que leva à cura pelo uso da imunoterapia é que a infecção natural desvia a resposta imune para T_H2, enquanto que a imunização ativa uma resposta T_H1 eficaz contra o agente da doença (MENDOZA et al., 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005). No entanto, a patogênese da infecção pelo *P. insidiosum* e o tipo de resposta imune elaborada pelo hospedeiro ainda não foram completamente elucidados. Para contribuir e possivelmente confirmar o mecanismo que supostamente leva à involução da doença pela imunoterapia, foram investigadas as atividades das ecto-enzimas de linfócitos, NTPDase e ADA, relacionando-as com o provável tipo de resposta imune ativada na doença e após tratamento imunoterápico dos animais experimetalmente infectados.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram nos linfócitos de coelhos com pitiose experimental, um aumento significativo na atividade da E-NTPDase, em relação à hidrólise de ATP, sem alterações na taxa de hidrólise de ADP. Essa ecto-nucleotidase é responsável pela hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP (MARCUS et al., 2003). No entanto, durante a pitiose, a E-NTPDase demonstrou ser capaz de preservar os níveis extracelulares de ADP, como observado neste estudo. Dessa forma, sugere-se que, a concentração de ATP no soro poderia estar diminuída, ligando ao receptor P2Y na superfície de linfócitos e estimulando uma resposta imune T_H2 responsável pelo desenvolvimento das significativas lesões teciduais.

As análises envolvendo a avaliação de componentes do sistema purinérgico na pitiose foram realizadas pela primeira vez neste estudo. No entanto, alterações na atividade das ecto-enzimas deste sistema têm sido observadas em doenças animais, sugerindo que possam ser um importante parâmetro fisiológico e patológico (BECKER et al., 2010; DA SILVA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2012; TONIN et al., 2012). Neste contexto, o aumento na hidrólise do ATP na pitiose corrobora com os resultados encontrados durante a infecção crônica de ratos infectados experimentalmente com *Trypanosoma evansi* (OLIVEIRA et al., 2012). Estes autores sugerem que o aumento na atividade da E-NTPDase em linfócitos, estaria envolvido na modulação da resposta inflamatória, durante a infecção crônica, através do controle da liberação de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que os níveis séricos destas moléculas foram aumentados na infecção pelo *T. evansi* (BARAL et al., 2007).

Por outro lado, observou-se que a imunoterapia para a pitiose foi capaz de reduzir a atividade da E-NTPDase. Esta redução poderia ser responsável por um aumento dos níveis de ATP extracelular, o qual poderia ligar-se a receptores P2X7. Isto levaria a uma diminuição nas lesões, devido à ativação de uma resposta imune T_H1 com secreção de citocinas pro-inflamatórias e ativação de linfócitos T citotóxicos e macrófagos responsáveis pela destruição das hifas.

Em relação à atividade da E-ADA observou-se uma diminuição significativa no grupo de coelhos com pitiose experimental. Logo, sugere-se que a pitiose reduz a atividade desta ecto-enzima, a fim de preservar os níveis de adenosina no meio extracelular, favorecendo o desenvolvimento da infecção. A adenosina é uma importante molécula anti-inflamatória endógena (CRONSTEIN, 1994) e imunossupressora, atuando através da inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, da adesão de células do sistema imune e do funcionamento de linfócitos citotóxicos (CRONSTEIN et al., 1983). Portanto, durante a infecção, altas concentrações de adenosina extracelulares podem estar atuando via receptores A_2 na superfície das células imunes, potencializando os efeitos anti-inflamatórios que ocorrem com a estimulação dos receptores P2Y pelo ATP.

A regulação dos níveis de adenosina extracelular tem demonstrado um papel bioquímico importante nos mecanismos imunomodulatórios em diversas doenças em que a imunidade encontra-se alterada (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 1988). Recentemente, Castro e colaboradores (2012) observaram uma diminuição na

atividade da E-ADA em ratos infectados experimentalmente com *Sporothrix schenckii,* durante a fase aguda da infecção. Em comum, os estudos, sugerem o envolvimento da E-ADA na patogênese da infecção, por ser responsável pela metabolização da adenosina. A preservação da adenosina no meio extracelular, por sua vez, estaria contribuindo para a persistência das infecções.

O grupo dos animais com pitiose, após tratamento imunoterápico, apresentou uma atividade da E-ADA maior em relação ao grupo controle. Logo, a imunoterapia parece induzir o organismo a aumentar a atividade desta ecto-enzima, e consequentemente a desaminação irreversível da adenosina. Por sua vez, baixas concentrações de adenosina no meio extracelular, desviariam a resposta imune para T_H1 com efeitos pró-inflamatórios capazes de diminuir as lesões geradas pela infecção.

Com intuito de confirmar a participação do sistema purinérgico na modulação da resposta imune e inflamatória durante a infecção, além das atividades enzimáticas, foram determinadas as concentrações séricas de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina após o desenvolvimento das lesões características da pitiose nos animais. Uma baixa concentração de ATP e uma alta concentração de adenosina no soro deste grupo foram observadas, sugerindo o envolvimento das ecto-enzimas responsáveis pela metabolização destes substratos, como demonstrado pelas alterações nas atividades da E-NTPDase e da E-ADA nos linfócitos dos animais infectados.

A imunoterapia com antígenos do *P. insidiosum* tem sido desenvolvida e usada com resultados benéficos na pitiose equina, canina e humana (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA et al., 2003; MILLER, 1981; THITITHANYANONT et al., 1998; TROST et al., 2009; WANACHIWANAWIN et al., 2004). No entanto, os mecanismos envolvidos na resposta à imunoterapia não estão completamente elucidados. Segundo Mendoza e colaboradores (2003), acredita-se que a imunomodulação da resposta do tipo T_H2, durante a pitiose clínica, para uma resposta T_H1 após a imunoterapia, esteja envolvida nas propriedades curativas desencadeadas pelo imunoterápico. O seu mecanismo de ação estaria baseado na alteração de uma resposta composta por linfócitos T_H2 com a mobilização de eosinófilos e mastócitos, que protegeriam as hifas do ataque do sistema celular, durante a pitiose clínica, para uma resposta composta por linfócitos T_H1, mobilizadores de células mononucleares, além de citocinas pró-inflamatórias, após a

imunoterapia. Dando suporte a esta hipótese, WANACHIWANAWIN e colaboradores (2004) documentaram uma mudança nos níveis séricos de IL-4 e IL-5 para IL-2, além da diminuição dos níveis de IgE em um dos pacientes com pitiose vascular ativa, sugerindo o deslocamento de uma resposta do tipo T_H2 para T_H1. A mudança do perfil de resposta imunológica que ocorre na pitiose não é um fato isolado. Estudos envolvendo a expressão transgênica de diferentes proteínas da *Leishmania major* podem induzir um comportamento similar ao dos antígenos do *P. insidiosum*, ou seja, um desvio de uma resposta imune não protetora (mediada por T_H2) para uma imunidade T_H1 protetora (JULIA et al., 1996). Já o papel da imunidade humoral na eliminação das hifas do *P. insidiosum* dos tecidos infectados é pequeno, uma vez que os títulos de anticorpos anti-*P. insidiosum* permanecem inalterados após a imunoterapia (MILLER, 1981; THITITHANYANONT et al., 1998).

Neste estudo, nem todos os animais inoculados com zoósporos desenvolveram a pitiose experimental. Nos animais inoculados, que não desenvolveram a doença, as atividades enzimáticas apresentaram-se semelhantes aos dos animais do grupo controle, sugerindo que as alterações encontradas estão relacionadas ao desenvolvimento da doença.

Os oomicetos, agentes de uma variedade de doenças destrutivas em plantas, desenvolveram uma diversidade de estilos de vida infecciosa, podendo se adaptar a diferentes hospedeiros. As espécies do gênero *Pythium* atacam tecidos de plantas com imunidade comprometida, como mudas, frutas e plantas estressadas, sendo que *P. insidiosum* desenvolveu mecanismos de patogenicidade e se adaptou para causar doença em animais. Estes mecanismos dependem extensivamente de uma grande, rapidamente diversificada família de proteínas, incluindo toxinas, enzimas hidrolíticas e inibidores e proteínas efetoras (JIANG; TYLER, 2012).

Em um estudo clínico e epidemiológico, em quatro propriedades rurais, no Pantanal Matogrossense, verificou-se que a incidência média anual de pitiose em bovinos e equinos foi de 0,22% e 12,5%, respectivamente (SANTOS et al., 2011a), mostrando que apenas alguns animais são contaminados. Além disso, até o momento, não foi possível reproduzir a enfermidade por meio de infecção experimental nas espécies que desenvolvem a doença natural, sendo o coelho o único modelo experimental para pitiose (MILLER; CAMPBELL, 1983a). Estes achados corroboram com o fato de que nem todos os animais inoculados

desenvolvem a doença, sugerindo que talvez a pitiose se instale nos animais com algum comprometimento imunológico, como no caso das plantas.

Muito do que se sabe sobre os mecanismos e evolução da virulência foi construído a partir do sequenciamento do genoma dos oomicetos nos últimos 10 anos. A compreensão dos mecanismos moleculares e genéticos da virulência pode desvendar a notória capacidade deste patógeno de se adaptar e causar doença em animais, além de permitir o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da doença (JIANG; TYLER, 2012).

Em resumo, pode-se observar que a atividade aumentada da E-NTPDase e a atividade diminuída da E-ADA durante a pitiose levam à regulação da concentração do ATP e da adenosina no meio extracelular. Em conjunto, baixos níveis extracelulares de ATP poderiam ativar receptores P2Y, enquanto, altos níveis de adenosina poderiam ativar receptores A_{2A} e/ou A_{2B} e consequentemente desencadeariam uma resposta do tipo T_H2, responsável pelos danos teciduais gerados na infecção. Já com a imunoterapia, pode-se observar uma inversão no comportamento das atividades enzimáticas, estimulando uma resposta do tipo T_H1 no hospedeiro. Os resultados reforçam a hipótese de Mendoza e Newton (2005) de que a mudança de uma resposta imune do tipo T_H2 para um padrão de resposta T_H1 pode explicar as propriedades curativas da imunoterapia. Dessa forma, sugere-se a participação do sistema purinérgico na indução do tipo de resposta imune durante a pitiose e após a imunoterapia.

5 CONCLUSÕES

1. Na pitiose observou-se um aumento na atividade da E-NTPDase em relação à hidrólise de ATP, além de uma atividade reduzida da E-ADA. Estas alterações enzimáticas favorecem uma resposta anti-inflamatória do tipo T_H2.

2. A imunoterapia induziu uma diminuição da atividade da E-NTPDase e aumento da atividade da E-ADA nos linfócitos dos coelhos com pitiose experimental. Esta inversão nas atividades das ecto-enzimas estaria contribuindo na alteração do tipo de resposta imune de T_H2 para T_H1, proporcionando a regressão da estrutura granulomatosa desenvolvida.

3. A concentração baixa de ATP e os níveis elevados de adenosina observados no soro dos animais com pitiose experimental contribuem para um ambiente imunológico que favorece o crescimento das hifas do *P. insidiosum*.

4. A confirmação da participação das ecto-enzimas na regulação da resposta imune e inflamatória durante a evolução clínica da pitiose e após a imunoterapia reforça a hipótese de que a pitiose está relacionada a uma resposta do tipo T_H2 e que a imunoterapia é eficaz ao estimular uma resposta T_H1.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica:** funções e distúrbios do sistema imune. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

ABBRACHIO, M.P.; CERUTI, S. P1 receptors and cytocine secretion. **Purinergic Signalling,** v. 3, p. 13-25, 2007.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology,** Phylum Oomycota, New York: John Wiley & Sons.Inc., 4.ed. Chap.23, p. 683-737, 1996.

ALLISON, N.; GILLIS, J.P. Enteric pythiosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 196, p. 462–464, 1990.

ALVES, S.H. et al. Aplicação do “ELISA-conta” no diagnóstico da pitiose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, p.155-157, 2001.

ARGENTA, J.S. et al. In vitro paradoxical growth of *Pythium insidiosum* in the presence of caspofungin. **Veterinary Microbiology,** v. 145, p. 321-323, 2010.

AUSTWICK, P.K.C.; COPLAND, J.W. Swamp cancer. **Nature,** v. 250, p.84, 1974.

BARAL, T. N. et al. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type inflammatory response. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, p. 1513–1520, 2007.

BECKER, L.V. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemisty**, v. 43, p. 1096-1100, 2010.

BENTINCK-SMITH, J. et al. Canine pythiosis - isolation and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p. 295-298, 1989.

BERRYESSA, N.A. et al. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p.1065–1069, 2008.

BISSONNETTE, K.W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical Veterinary Mycology,** v. 29, p. 39–44, 1991.

BOSCO, S.M.G. et al. Human pythiosis, Brasil. **Emerging Infectious Diseases,** v. 11, p. 715-718, 2005.

BOURS, M.J.L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics,** v. 112, p. 358-404, 2006.

BRIDGES, C.H.; EMMONS, C.W. A phycomycosis of horses caused by *Hyphomyces destruens*. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 138, p. 579–589, 1961.

BROWN, C.C.; ROBERTS, E.D. Intestinal pythiosis in a horse. **Australian Veterinary Journal,** v. 65, p. 88–89, 1988.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death, **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology,** v. 22, p. 364-373, 2002.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology,** v. 240, p. 31-34, 2004.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends in Pharmacological Science,** v. 27, p. 166-176, 2006.

CASTRO, V.S.P. Adenosine Deaminase Activity in Serum and Lymphocytes of Rats Infected with *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 174, p. 31-39, 2012.

CAVALHEIRO, A.S. et al. In vitro activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 53, p.2136-2138, 2009.

CHANDLER, F.W.W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. **A Color Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases.** Year Book Medical Publishers**,** Inc., Chicago**,** p.104–105, 1980.

CHINDAMPORN, A. et al. Antibodies in the sera of host species with pythiosis recognize a variety of unique immunogens in geographically divergent *Pythium insidiosum* strains. **Clinical and Vaccine Immunology,** v. 16, p. 330–336, 2009.

COLGAN, S. et al. Physological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling,** v. 2, p. 351-360, 2006.

CRONSTEIN, B.N. et al. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. **The Journal Experimental Medicine**, v. 158, p. 1160-1177, 1983.

CRONSTEIN, B.N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 76, p. 5-13, 1994.

DA SILVA, A. S. et al. Activity of the enzyme adenosine deaminase in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitology**, v. 138, p. 201-208, 2011.

DE COCK, A.W. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v: 25, p. 344–349, 1987.

DE HAAN, J.; HOOGKAMER, L.J. Hypho-mycosis destruens. **Veeartsennijkundige Bld. voor Ned. Indië**, v. 13, p. 350–374, 1901.

DI VIRGILIO, F.; BOREA, P. A.; ILLES, P. P2 receptors meet the immune system. **Trends in Pharmacological Sciences,** v. 22, p. 5-7, 2001.

DI VIRGILIO, F. Purinergic signaling in the immne system. A brief update. **Purinergic Signalling,** v. 3, p. 1-3, 2007

DI VIRGILIO, F.; BOEYNAEMS, J-M; ROBSON, S.C. Extracelular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current Opinion in Pharmacology,** v. 9, p. 507-513, 2009.

DUNWIDDIE, T.; MASINO, S. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience,** v. 24, p. 31-55, 2001.

DWYER, K. et al. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling,** v. 3, p. 171-180, 2007.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R.E.; SITKOVSKY, M.V. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA,** .: 87, p. 1105-1110, 1990.

FISCHER, J.R. et al. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,** v. 6, p. 380–382, 1994.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase much over than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology,** v. 52, p. 283-294, 1997.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p: 1-16, 2010.

GABRIEL, A.L. et al. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 583-587, 2008.

GESSI, S. et al. Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic Signalling,** v. 3, p. 109-116, 2007.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis and zygomicosis in small animals. **The Veterinary Clinicals Small Animal Practice**, v. 33, p. 695-720, 2003.

GROOTERS, A.M. **Pythiosis and Zygomycosis. Equine Infectious Diseases**, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, p. 412–419, 2007.

GROOTERS, A.M. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine,** v. 16, p. 142–146, 2002.

GROOTERS, A.M. et al. Clinicopathologic findings associated with Lagenidium sp. infection in 6 dogs: initial description of an emerging oomycosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine,** v. 17, p. 637–646, 2003.

GUARRO, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 12, p. 454-500, 1999.

HEADLEY, S.A. et al. Cutaneous pythiosis in a slaughtered horse: a case report. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p.109-112, 2002.

HENDRIX, J.W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of Pythium and Phytophtora. **Science,** v. 144, p. 1028–1029, 1964.

HENSEL, P. et al. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, p. 215–218, 2003.

HUDSPETH, D.S.S.; NADLER,S.A.; HUDSPETH, M.E.S. A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. **Mycologia**, v. 92, p. 674–684, 2000.

HUNSUCKER, S.A.; MITCHELL, B.S.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidase as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology & Therapeutics,** v. 107, p. 1-30, 2005.

IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal,** v. 70, p. 558–560, 1994.

IMWIDTHAYA, P.; SRIMUANG, S. Immunodiffusion test for diagnosing human pythiosis. **Mycopathologia**, v. 106: 109–112, 1989.

IWAKI-EGAWA, S.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. **Biological Chemistry,** v. 387, p. 319-321, 2006.

JULIA, V.; RASSOULZADENGA, M.; GLAICHENHAUS, N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. **Science**, v. 274, p. 421–423, 1996.

JIANG, R.H.Y.; TYLER, B.M. **The Annual Review of Phytopathology,** v. 50, p. 295-318, 2012.

JINDAYOK, T. et al. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis **Clinical and Vaccine Immunology,** v. 16, p. 1047–1051, 2009.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood,** v. 6, p. 2157-2162, 2000.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kuby**. 6 ed. São Paulo: ARTMED, 2008.

KRAJAEJUN, T. et al. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,** v. 9, p. 378–382, 2002.

KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analysis of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases,** v. 43, p. 569–576, 2006.

KRAJAEJUN, T. et al. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology,** v. 16, p. 506-509, 2009.

KRAJAEJUN, T. et al. The 74-Kilodalton immunodominant Antigen of the Pathogenic Oomycete *Pythium insidiosum* is a Putative Exo-1,3-β-Glucanase. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, p. 1203-1210, 2010.

KRAUSS, J. S. Laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Annals of Clinical and Laboratory Science,** v. 30, p. 354-365, 2003.

KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectron of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infectious Diseases,** v. 1, p. 1-7, 1994.

LANGSTON, H. et al. Secretion of IL2 and IFNγ, but not IL4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. The **Journal of Immunology,** v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular pythisosis in a thalassemic patient. **Vascular,** v. 17, p. 234–238, 2009.

LEAL, A.T. ***Pythium insidiosum:*** **Caracterização antigênica preliminar e validação de adjuvantes na indução de resposta sorológica em coelhos**.1999.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

LEAL, A.T. et al. Pitiosis equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 21, p. 151–156, 2001.

LEAL, A.T. et al. Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum* antigens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 15, p. 63-68, 2005.

LEAL, D.B.R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1: ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta,** v: 1721, p. 9-11, 2005.

MARCUS, J.A. et al. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/Ectonucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.305, p.9-16, 2003.

MARTIN, F.N. Phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. **Mycologia**, v. 92, p.711–727, 2000.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, D. et al. Adenosine deaminase in the acquired immunodeficiency syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 1949, 1988.

MENDOZA, L. ***Pythium insidiosum***. In: Merz, W.G.; Hay, R.J. (Eds.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Medical Mycology, 10th ed. p. 617–630, 2005.

MENDOZA, L.; ALFARO, A.A. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. **Mycopathologia,** v. 94, p. 123–129, 1986.

MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; STANDARD, P.G. Immunodiffusion test for diagnosing and monitoring pythiosis in horses. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 23, p. 813–816, 1986.

MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; STANDARD, P. G. Antigenic relationship between the animal and human pathogen *Pythium insidiosum* and nonpathogenic *Pythium* spp. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 25, p. 2159–2162, 1987.

MENDOZA, L.; NICHOLSON, V.; PRESCOTT, J.F. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 30, p. 2980–2983, 1992.

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum.* **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2967–2973, 1993.

MENDONZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale,** v. 64, p. 151-164, 1996.

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,** v. 4, p.715–718, 1997.

MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum* vaccine formulation with enhanced therapeutic properties in immune horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, v. 21, p. 2797-2804, 2003.

MENDOZA, L.; PRASLA, S.H.; AJELLO,L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infection, with retrospective review of the literature. **Mycoses,** v. 47, p.14–23, 2004.

MENDOZA, L.; NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum.* **Medical Mycology,** v. 43, p. 477–486, 2005.

MILLER, R.I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal,** v. 58, p. 377-382, 1981.

MILLER, R.I. Granulomatous and neoplastic disease of equine skin: a review. **Veterinary Reviews and Monographs,** James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia, p. 1–92, 1983.

MILLER, R.I; CAMPBELL R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal,** v. 58, p. 227-231, 1982.

MILLER, R.I; CAMPBELL R.S.F. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia,** v. 21, p. 331-341, 1983a.

MILLER, R.I; CAMPBELL R.S.F. Hematology of horses with phycomycosis. **Australian Veterinary Journal,** v. 60, p. 28-29, 1983b.

MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S. The comparative pathology of equine cutaneous phycomycosis. **Veterinary Pathology,** v. 21, p. 325–332, 1984.

MILLER, R.I.; OLCOTT, B.M.; ARCHER, M. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 186, p. 984–986, 1985.

MONTEIRO, A.B. **Imunoterapia da pitiose eqüina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum*.** 1999. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

MORTON, L.D. et al. Chronic eosinophilic enteritis attributed to *Pythium* sp. in a horse. **Veterinary Pathology,** v. 288, p. 542–544, 1991.

OLIVEIRA, C.B. et al. NTPDase activity in lymphocytes of rats infected by *Trypanosoma evansi.* **Parasitology**, v. 139, p. 232-236, 2012.

PATINO-MEZA, F. Role of the zoospores of *Pythium insidiosum* in the experimental reproduction of pythiosis in susceptible species. **DVM Thesis, National University,** Heredia, Costa Rica, p.1–31, 1988.

PEREIRA, D.I.B. et al. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian Pythium insidiosum strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 60, p. 1168–1171, 2007.

PEREIRA, D.I.B. et al. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. **Journal of Medical Mycology,** v. 18, p. 129–133, 2008.

PÉREZ, R.J.J.; LUIS-LEÓN, J.L.; VIVAS, L. Mendoza, L. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology,** v. 109, p. 121–128, 2005.

PRACHARKTAM, R. ET AL. Immunodiffusion test for diagnosis and monitoring of human pythiosis insidiosi. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 29, p. 138–141, 1991.

PRAETORIUS, H.A.; LEIPZIGER, J. ATP release from non-excitable cells. **Purinergic Signal,** v. 4, p. 43-46, 2009.

PUPAIBOOL, J. et al. Human pythiosis **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 517–518, 2006.

PURCELL, K.L. et al. Jejunal obstruction caused by a *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 205, p. 337–339, 1994.

RAKICH, P.M.; GROOTERS, A.M.; TANG, K.N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,** v. 17, p. 262–269, 2005.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. **Drug News & Perspectives**, v. 16, p. 133-140, 2003.

RIET-CORREA, F. et al. Outbreak of rhinopharyngeal zygomycosis in sheep in Paraiba, Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 28, p. 29–35, 2008.

ROBSON, S.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships an pathophysiological significance. **Purinergic Signalling,** v. 2, p. 409-430, 2006.

ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunology Today,** v. 18, p. 263-266, 1997.

ROMANOWSKA, M.; OSTROWSKA, M.; KOMOSKYNSKI, M.A. Adenosine ecto-deaminase (ecto-ADA) from porcine cerebral cortex synaptic membrane. **Brain Research,** v. 1156, p. 1-8, 2007.

ROSA, P.S.; NEWTON, J.C.; TRICHE, P. An ELISA test to detect *Pythium insidiosum* infection in horses. In: **XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, São Paulo, Brasil, p. 151, 1999.

SANTOS, C.E.P.; SANTURIO, J.M.; MARQUES, L.C. Pitiose em animais de produção no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 31, p. 1083-1089, 2011a.

SANTOS, C.E.P. et al. Efficacy of Immunotherapy in the Treatment of Facial Horse Pythiosis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 955, 2011b.

SANTURIO, J.M. et al. Cutaneous Pythsiosis insidiosi in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia,** v. 141, p.123-125, 1998.

SANTURIO, J.M. et al. Teste ELISA para o diagnóstico de Pitiose. In: **III Congresso Brasileiro de Micologia**, Águas de Lindóia, Brasil, p. 126, 2001.

SANTURIO, J.M. et al. Three types of immunotherapics against pythsiosis insidiosi developed and evaluated. **Vaccine**, v. 21, p. 2535-2540, 2003.

SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. **Pitiose:** uma abordagem micológica e terapêutica. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 111 p.

SATHAPATAYAVONGS, B. et al. Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. **Journal Infectious Diseases,** v. 159, p. 274–280, 1989.

SHENEP, J.L. et al. Successful medial therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Diseases,** v. 27, p. 1388–1393, 1998.

SITKOVSKY, M.V.; OHTA, A. The “danger” sensors that stop the immune response: the A2 adenosine receptors? **Trends in Immunology,** v. 26, p. 299-304, 2005.

SOUZA, V.C.G et al. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. **Parasitology International**, v. 61, p. 690-696, 2012.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP- type ectophosphodiesterases: unity and diversity. **Trends in Biochemical Sciences,** v: 30, p. 542-550, 2005.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling,** v. 2, p. 361-370, 2006.

STRÄTER, N. Ecto-5'nucleotidase: structure function relationships. **Purinergic Signalling,** v. 2, p. 343-350, 2006.

SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen Pythium insidiosum from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology,** v. 46, p. 41–52, 2008.

TABOSA, I.M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil **Veterinary Pathology,** v. 41, p. 412–415, 2004.

THIANPRASIT, M. Fungal infection in Thailand **Japanese Journal Dermatology,** v: 96, p. 1343–1345, 1986.

THIANPRASIT, M. Human pythiosis. **Tropical Dermatology,** v. 4, p. 1–4, 1990.

THITITHANYANONT, A. et al. Use of an immunogenic therapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Diseases,** v. 27, p. 1394–1400, 1998.

THOMAS, R.C.; LEWIS, D.T. Pythiosis in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian,** v. 20, p. 63–74, 1998.

TONIN, A.A. et al. Adenosine deaminase activity in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Research in Veterinary Science**, v. 92, p. 197-201, 2012.

TRISCOTT, J.A.; WEEDOM, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis **Journal of Cutaneous Pathology,** v. 20, p. 267–271, 1993.

TROST, M.E. et al. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrintestinal canina **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 29, p. 673-679, 2009

TSUBOI, I. et al. Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 and human immunodeficiency virus type 1 infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,** v. 2, p. 626-630, 1995.

WALKER JR., E.M.; WALKER, S.M. Effects of iron overload on the immune system. **Annals of Clinical and Laboratory Science,** v. 30, 354-65, 2000.

WAN, Y.Y.; FLAVELL, R.A. How Diverse – CD4 Effector T Cells and their Functions **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 1, 20-36, 2009.

WANACHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine,** v. 22, p. 3613–3621, 2004.

WHITE, S.D. et al. Cutaneous pythiosis in a California nontravelled horse. **Veterinary Dermatology,** v: 19, p. 391–394, 2008.

WITKAMP, J. Bijdrage tot de kennis van de Hyphomycosis destruens. **Drukkerij W. C. Goudswaard**, Rotterdam, v: 36, p. 229-245, 1924.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside – converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1783, p. 673-694, 2008.

ZIMMERMANN, H. Extracelular metabolism of ATP and the other nucleotides. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology,** v. 362, p. 299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research,** v. 52, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H. et al. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International,** v. 32, p. 421-425, 1998.

ZIMMERMANN, H. et al. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmácia,** v. 73, p. 537-566, 2007.

7 ANEXOS

Anexo A- Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

Emissão de Parecer
24/2009

Nº Processo:	23081.004001/2009-12
Título:	"Caracterização da NTPDase de linfócitos de modelo experimental de pitiose"
Pesquisador Responsável:	Profª. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Instituição:	UFSM
Área:	Departamento de Microbiologia parasitologia
Data de Entrada:	17.04.2009
Data do Parecer:	18.05.2009

Termo de compromisso com o bem estar animal:

( ) Termo de compromisso assinado pelo Coordenador e outros executores do projeto
(X) Termo de compromisso assinado pelo Coordenador se responsabilizando pelos demais executores do projeto
( ) Termo de compromisso assinado unicamente pelo Coordenador
( ) Termo de compromisso ausente no processo

Adequação e relevância do projeto:

( ) Problema científico relevante
(X) Hipótese adequada
(X) Objetivos relevantes
(X) Metodologia adequada

Caráter do projeto/ Linha de pesquisa quanto aos resultados esperados e benefícios potenciais, para a área em estudo e/ ou setores de aplicação da sociedade brasileira:

( ) Inovador / novo conceito
(X) Incremental (novas informações)
(X) Confirmatório
( ) Pouco relevante

Necessidade da utilização de animais na experimentação:

(X) O projeto necessita de animais para responder a pergunta científica
( ) O projeto não necessita de animais e pode ser realizado com metodologia in vitro ou similar

Análise do número de animais a ser utilizado no projeto: 10 Animais

(X) Adequado
( ) Inadequado
Base científica para classificar como inadequado e sugestão do número de animais que deverá ser utilizado:

Currículo do pesquisador em relação à área de abrangência do projeto:

(X) Adequado
( ) Inadequado

Avaliação global do projeto:

( ) Aprovado
(X) Aprovado com ressalva Qual o destino final dos Animais.
( ) Reprovado (a proposta não está de acordo com a ética e bem estar animal)

Detalhe os pontos relevantes que o(a) levaram a avaliar negativamente o projeto:

Santa Maria, 18 de Maio de 2009.

Declaramos que o projeto "Caracterização da NTPDase de linfócitos de modelo experimental de pitiose" registrado no Comitê de Ética e Bem Estar Animal sob número, 23081.004001/2009-12, coordenado pelo pesquisador Profª.Daniela Bitencourt Rosa Leal, cumpriu todas as exigências em relação ao Bem Estar Animal.

Marta Lizandra do R. Leal

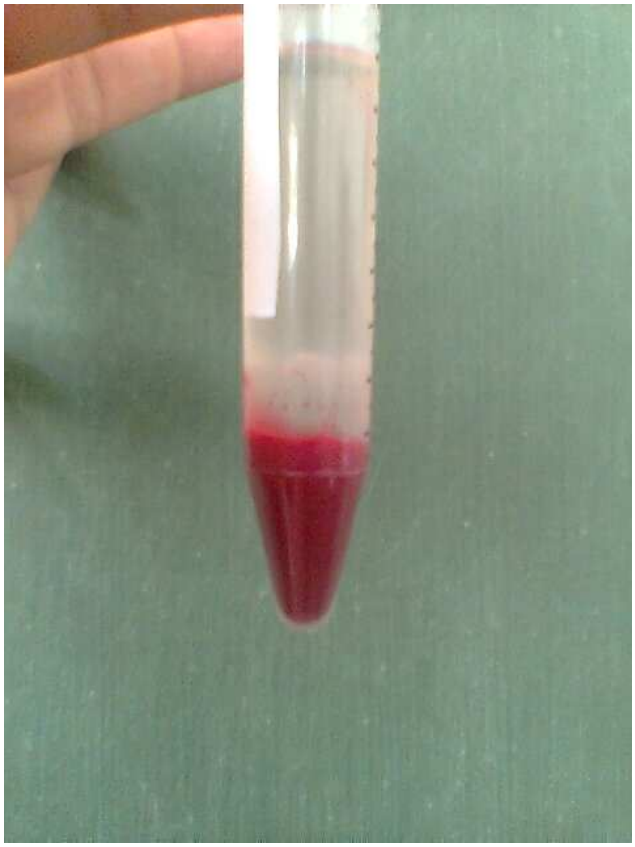
Profª. Marta Lizandra do Rego Leal
Presidente do Comitê de Ética e Bem Estar Animal

OBSERVAÇÃO: ENTREGAR RELATÓRIO AO FINAL DA EXECUÇÃO AO TÉRMINO DO PROJETO.

Anexo B- Fotos dos experimentos

Coelhos inoculados com zoósporos de *P. insidiosum*.

Lesão após 60 dias da inoculação.



Separação das células mononucleares de sangue periférico de coelhos inoculados com *P. insidiosum* através de gradiente de densidade.

Células mononucleares periféricas com predomínio de linfócitos de coelhos com pitiose experimental.

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

Bach, Barbara Charlotte
Avaliação do sistema purinérgico na pitiose experimental em coelhos tratados com imunoterápico / Barbara Charlotte Bach.-2012.
79 p.; 30cm

Orientador: Janio Morais Santurio
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2012

1. Pythium insidiosum 2. Resposta imunológica 3. Sistema purinérgico 4. Imunoterapia I. Santurio, Janio Morais II. Título.