

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE, 5' - NUCLEOTIDASE E
ADENOSINA DEAMINASE EM PLAQUETAS DE RATOS INFECTADOS
POR *Trypanosoma evansi***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Belmonte Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE, 5´-NUCLEOTIDASE E ADENOSINA
DEAMINASE EM PLAQUETAS DE RATOS INFECTADOS POR *Trypanosoma evansi***

por

Camila Belmonte Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE NTPDASE, 5´-NUCLEOTIDASE E ADENOSINA DEAMINASE EM
PLAQUETAS DE RATOS INFECTADOS POR *Trypanosoma evansi***

elaborada por
Camila Belmonte Oliveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Sílvia Gonzalez Monteiro, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Marta Teixeira, Dr^a. (USP)

Cinthia Melazzo Mazzanti, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 12 de Agosto de 2010.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária desta instituição pela oportunidade de realizar mais uma etapa na minha formação.

A minha orientadora Silvia Gonzalez Monteiro pela orientação, carinho e amizade em todos os anos de trabalho no laboratório.

As minhas co-orientadoras Daniela Bitencourt Leal e Sônia Terezinha dos Anjos Lopes pelo grande auxílio em todas as etapas do meu trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Parasitologia Veterinária: Aleks, Lucas, Vinicius, Luisa, João, Marcos Kipper, Marcos Duck, Kelly, Thais, Grazi, Fernanda e a equipe do Laboratório de Patologia Clínica em especial ao Márcio por toda a ajuda.

A equipe do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Microbiologia e Parasitologia em especial a Viviane e Lara.

A Professora Maria Beatriz Moretto e a estagiária Paula Bitencourt.

A CAPES, pela concessão da bolsa

As diversas pessoas (alunos e professores) que auxiliaram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada;

E principalmente, a todos da minha família pela compreensão, ajuda, apoio e carinho. A minha mãe que me ensinou o significado da palavra “sonho” e sempre me incentivou, ao meu irmão, meu parceiro leal de todas as horas e ao marido querido que muitas vezes ajudou-me em experimentos e compartilhou comigo momentos felizes, tensos, sempre com muita paciência e amor.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA- adenosina deaminase

ADP - adenosina difosfato

AMP - adenosina monofosfato

ATP - adenosina trifosfato

BE - brometo de etídio

BHE- barreira hematoencefálica

CaCl₂ - cloreto de cálcio

CMP - citidina monofosfato

EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético

GMP - monofosfato de guanosina

HEPES - ácido N-2-hidroxietilpiperazina

IMP - inosina monofosfato

LCR- líquido cefalorraquidiano

KCl - cloreto de potássio

NaCl - cloreto de sódio

Pi - fosfato inorgânico

PRP - plasma rico em plaquetas

SNC - sistema nervoso central

SNP - sistema nervoso periférico

TCA - ácido tricloroacético

UMP - uridina monofosfato

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE, 5'-NUCLEOTIDASE E ADENOSINA DEAMINASE EM PLAQUETAS DE RATOS INFECTADOS POR *Trypanosoma evansi*

AUTOR: CAMILA BELMONTE OLIVEIRA
ORIENTADORA: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO
Santa Maria, 12 de agosto de 2010

As enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos estão presentes na superfície de plaquetas, células envolvidas em distúrbios de coagulação comumente observados em animais infectados por *Trypanosoma evansi*. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade das enzimas NTPDase, 5'- nucleotidase e adenosina deaminase em plaquetas de ratos infectados experimentalmente pelo protozoário *T. evansi*. Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o grau de parasitemia. As amostras foram coletadas nos dias 3 (grupo A: início da infecção), 5 (grupo B: alta parasitemia) e 15 (grupo C: infecção crônica). O grupo D (grupo controle) foi formado por ratos não infectados. Amostras de sangue armazenadas em citrato de sódio foram utilizadas para a separação de plaquetas, permitindo a realização dos ensaios enzimáticos e os testes de agregação plaquetária. Nos grupos A, B e C ocorreram alterações significativas das plaquetas em relação ao controle. Os grupos A e B apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na atividade das enzimas NTPDase, 5'- nucleotidase e adenosina deaminase (ADA) se comparados ao grupo controle. No grupo C somente as enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$), observada pela hidrólise de ADP e AMP. A correlação entre a contagem de plaquetas e hidrólise de nucleotídeos/nucleosídeos foi positiva e significativa ($p < 0,05$) nos grupos A e B e a agregação plaquetária no grupo A, B e C apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) se comparado ao grupo controle. Com os resultados obtidos, conclui-se que a atividade das enzimas NTPDase, 5'- nucleotidase e adenosina deaminase em plaquetas de ratos infectados com *T. evansi*

apresentaram alterações, como a diminuição da atividade das enzimas no início da infecção, infecção aguda verificadas através da hidrólise de ATP, ADP e AMP e o aumento da atividade enzimática na infecção crônica na utilização do substrato ADP e AMP. As alterações encontradas podem estar relacionadas com a trombocitopenia.

Palavras-chave: NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosina deaminase, trombocitopenia

ABSTRACT

Master's dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ACTIVITY OF THE ENZYMES NTPDASE, 5'-NUCLEOTIDASE AND ADENOSINE DEAMINASE IN PLATELETS OF RATS INFECTED WITH *Trypanosoma evansi*

AUTHOR: CAMILA BELMONTE OLIVEIRA
ADVISER: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO
Santa Maria, August 12, 2010

Nucleotide- and nucleoside-degrading enzymes are present in the surface of platelets, blood cells involved in clotting disturbances of *Trypanosoma evansi*-infected animals. Thus, this study was aimed at evaluating the activity of the enzymes NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase in platelets of rats experimentally infected by *T. evansi*. Animals were divided into four groups, according to the degree of parasitemia. Samples were collected at days 3 (group A: at the beginning of parasitemia), 5 (group B: high parasitemia) and 15 (group C: chronic infection). Group D (control group) was composed of non-infected animals. Blood samples with citrate as the anticoagulant were collected and used for platelet separation and enzymatic assays. NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) activities were decreased ($p < 0.05$) in platelets from rats of groups A and B, when compared to the control group. In group C, only NTPDase and 5'-nucleoside activities were decreased ($p < 0.001$), observed by ADP and AMP hydrolysis. The correlation between platelet count and nucleotide and

nucleoside hydrolysis was positive and statistically significant ($p < 0.05$) in groups A and B. Platelet aggregation of all infected groups was decreased in comparison to the control group ($p < 0.05$). Based upon the results, it is concluded that the alterations observed in the activity of the enzymes NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase in platelets of *T. evansi*-infected animals might be related to thrombocytopenia.

Keywords: NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase, thrombocytopenia.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 - Formas tripomastigotas de <i>T. evansi</i> em esfregaço sanguíneo de ratos infectados experimentalmente.....	14
Figura 2 – Representação de uma plaqueta.....	24
Figura 3 - Ecto-ATPases, Adaptado de Zimmermann (2001).....	28

Capítulo II

Figura 1 - Avaliação da parasitemia por <i>T. evansi</i> em ratos infectados até 15 dias após a inoculação.....	53
Figura 2 - Contagem de plaquetas nos animais infectados e não-infectados nos dias 3, 5 e 15 pós-infecção.....	54
Figura 3 - Hidrólise de ATP (A), ADP (B) and AMP (C) em ratos infectados experimentalmente com <i>T. evansi</i> nos dias 3, 5 and 15 pós-infecção.	55
Figura 4 - Atividade da enzima adenosina deaminase (ADA) em ratos experimentalmente infectados com <i>T. evansi</i> nos dias 3, 5 e 15 pós-infecção.....	56
Figura 5 - Agregação plaquetária nos dias 3, 5 e 15 pós-infecção em ratos infectados com <i>T. evansi</i> em comparação com o grupo controle, usando ADP como agonista na concentração de 10µM.....	57

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	11
2- REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Trypanosoma evansi.....	13
2.1.1. Etiologia.....	13
2.1.2. Epidemiologia	15
2.1.3. Patogênese.....	17
2.1.4. Sinais Clínicos	19
2.1.5. Alterações Laboratoriais	21
2.1.6 Tratamento	22
2.2. Plaquetas.....	23
2.2.1. Agregação plaquetária.....	24
2.2.2. Hemostasia.....	25
2.9. Nucleotídeos de adenina e o sistema vascular.....	25
2.3. Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina	26
2.3.1. NTPDase (ATP difosfoidrolase, Apirase, Ecto/CD39, E.C. 3.6.1.5).....	26
2.3.2. 5'-Nucleotidase (CD73, E.C. 3.1.3.5).....	27
2.3.3. Adenosina deaminase	28
3 - CAPÍTULO II	30
MANUSCRITO	30
4- CONCLUSÃO	57
5- REFERÊNCIAS.....	58

1 – INTRODUÇÃO

O protozoário *Trypanosoma evansi* é o agente causal de uma das tripanossomoses que acomete animais domésticos, a infecção por este flagelado em eqüinos é chamada de “Surra” ou “Mal das Cadeiras”. Possui ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros. Uma das causas de morte em animais infectados por esta tripanossomose na fase aguda da doença é a anemia, que se caracteriza por baixos valores de eritrócitos, menor volume celular e baixa concentração de hemoglobina (JOSHI et al., 2005). A doença causada por este protozoário é caracterizada por rápida perda de peso, graus variáveis de anemia, febre intermitente, edema dos membros pélvicos e fraqueza progressiva (HERRERA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005).

Estes sinais clínicos indicam um processo inflamatório, onde participam biomoléculas, mais conhecidas como os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina, o ATP, ADP, AMP e a adenosina. Estas moléculas no meio extracelular ao interagirem com receptores específicos sinalizam vias que são importantes para o funcionamento das células (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997; RATHBONE et al., 1999).

A interação de nucleotídeos de adenina com os receptores purinérgicos correlaciona-se diretamente à atividade de ectoenzimas, como a NTPDase (ATP difosfohidrolase, apirase, Ecto/CD 39, E.C. 3.6.1.5) e 5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5) e ADA (CD26; E.C. 3.5.4.4.) (ZIMMERMANN, 1999; 2001). Estas hidrolisam os nucleotídeos/nucleosídeo, quando estão em concentrações elevadas no meio extracelular ou condições patológicas. São vários os trabalhos desenvolvidos com

enzimas que degradam nucleotídeos e suas implicações (LEAL et al., 2007; SHETINGER et al., 2008)

As enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina deaminase são essenciais na tromborregulação e hemostasia (BURNSTOCK, 1972). Neste contexto, o estudo da atividade destas enzimas em plaquetas de animais infectados por *T.evansi* possui grande importância. Esta enfermidade provoca coagulopatias, como por exemplo, a trombocitopenia, que ocorre mais comumente na infecção aguda alterando as funções de adesão, agregação e secreção de substâncias das plaquetas.

Vários estudos já foram desenvolvidos acerca dos mecanismos patogênicos da resposta inflamatória e imunológica de tripanosomoses africanas, mas a avaliação da atividade, caracterização e quantificação enzimática das ectonucleotidases não foram realizadas em *Trypanosoma evansi*. Este estudo poderá contribuir para elucidação do mecanismo de patogenicidade nas coagulopatias nas infecções por este protozoário e novas alternativas poderão surgir no controle das tripanossomoses.

2. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Trypanosoma evansi*

2.1.1. Etiologia

Os tripanossomas são microorganismos pertencentes ao reino Protista, filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, superclasse Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*. Os tripanossomas podem ser distribuídos em duas seções, a Salivaria, protozoários transmitidos pela inoculação de vetores biológicos, e a Stercoraria, pela contaminação da pele ou das mucosas do hospedeiro com as fezes do vetor (HOARE, 1972).

Os tripanossomas da seção Salivaria são altamente patogênicos para humanos e animais domésticos e estão distribuídos em quatro subgêneros: *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*), *Nannomonas* (*T. congolense*, *T. simiae*), *Duttonella* (*T. vivax*) e *Pycnomonas* (*T. suis*) (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004).

O ciclo de vida dos tripanossomas necessita de dois hospedeiros, ou seja, é heteroxênico e durante seu desenvolvimento passa por vários estágios de desenvolvimento: amastigota, promastigota, epimastigota e tripomastigota, este último representado por formas alongadas com cinetoplasto pós-nuclear. Nos hospedeiros vertebrados, tripomastigotas e ocasionalmente epimastigotas ocorrem no sangue e nos tecidos corporais, e amastigotas no interior das células do hospedeiro (*T. cruzi*) (HOARE, 1972).

A morfologia dos tripanossomas pode ser observada através de microscopia de luz e de microscopia eletrônica. Na microscopia de luz, observam-se em esfregações

sanguíneos formas alongadas com núcleo evidente, cinetoplasto, membrana ondulante e um flagelo que corre ao longo do corpo com um flagelo livre. A estrutura celular dos tripanossomas é composta por flagelo; corpo basal ou blefaroplasto, local onde se insere o flagelo; núcleo com cromatina; retículo endoplasmático; complexo de Golgi; cinetoplasto; mitocôndria, representada por um longo tubo que vai desde a porção anterior até a posterior; corda paraxial; microtúbulos; ribossomos; e membrana ondulante, constituída por uma série de pregas que são esticadas pelo movimento do flagelo. O cinetoplasto é uma malha de DNA localizada em uma dilatação da mitocôndria que contém DNA (kDNA).

O *T. evansi* foi o primeiro tripanossoma patogênico descoberto em 1880 por Griffith Evans, que encontrou organismos móveis no sangue de cavalos e camelos doentes (MAUDLIN et al., 2004).

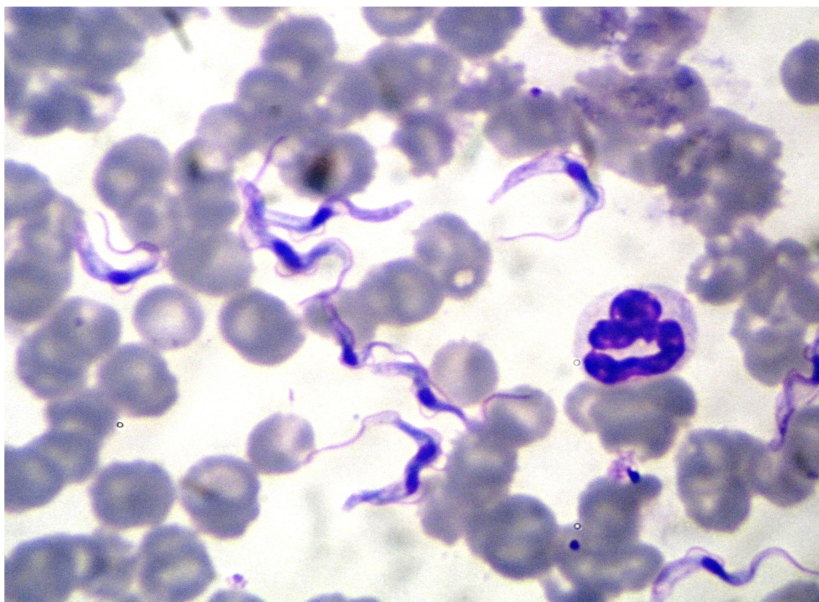


Figura 1: Formas tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos infectados experimentalmente.

2.1.2. Epidemiologia

A transmissão da tripanossomose ocorre pela inoculação dos protozoários pela saliva dos vetores (seção Salivaria), exceção feita a *T. equiperdum* que é transmitido venereamente, ou pela contaminação da mucosa ou da pele lesionada por tripanossomas presentes no material fecal do vetor (seção Stercoraria) (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). Essa transmissão pode ser cíclica, quando há ciclo biológico no vetor (biológico), ou acíclica, quando for essencialmente mecânica (vetor mecânico) (URQUHART et al., 1996). No caso de *T. evansi*, a transmissão é mecânica e as formas sangüíneas são transferidas diretamente de um mamífero para outro por insetos hematófagos, por exemplo, as moscas das famílias Tabanidae (*Tabanus* sp.) e Muscidae (*Stomoxys* sp.) ou artificialmente por agulhas contaminadas com sangue infectado. Em contraste com a transmissão cíclica, que pode ser tão longa quanto à vida do vetor, a capacidade de transmissão mecânica do *T. evansi* é curta (até seis horas), pois, depende da sobrevivência dos parasitas nas peças bucais do vetor (SILVA et al., 2002).

Na América do Sul, *T. evansi* pode também ser transmitido por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), onde os parasitas podem se multiplicar e sobreviver por um longo período. Dessa maneira, morcegos hematófagos atuam tanto como vetores como reservatórios (HOARE, 1972; URQUHART et al., 1996). Além dos clássicos modos de transmissão, carnívoros podem se infectar através da ingestão de animais recentemente mortos infectados por *Trypanosoma evansi* (URQUHART et al., 1996; BARRIGA, 1997; HERRERA et al., 2004). As espécies que causam tripanossomoses em animais na América do Sul são *T. cruzi*, *T. theileri*, *T. equiperdum*,

T. evansi e *T. vivax* (HOARE, 1972). N Brasil, apenas *T. evansi* e *T. vivax* são de importância econômica, representando um potencial de risco para aproximadamente 300 milhões de cabeças de gado, 1,8 milhões de búfalos, e 16 milhões de cavalos.

O relato de animais infectados por *T. evansi* no Rio Grande do Sul é recente, em cães (COLPO et al., 2005, FRANCISCATO et al., 2005) e eqüinos (CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; MORAES et al., 2007, ZANETTE et al., 2008), o surgimento de casos no sul da América do Sul sugere que maiores estudos sobre o agente e a doença, bem como diagnóstico devem ser aprofundados em áreas não endêmicas desta enfermidade.

A tripanossomose causada por *T. evansi* é comumente denominada “Surra” (HOARE,1972), “Derrengadera” (HOARE, 1972; LEVINE, 1973), “Mal das Cadeiras” (SILVA et al., 1995a) ou “Peste Quebra-bunda”.

Este protozoário ocorre em eqüinos (SEILER et al., 1981; QUIÑONES MATEU et al., 1994; FRANKE et al., 1994; SILVA et al., 1995a,b; DÁVILA et al., 1999; LEMOS, 2003), asininos (CADIOLI, 2001; TUNTASUVAN et al., 2003a), bovinos (FRANKE et al.; 1994; TUNTASUVAN et al., 1997, TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998), búfalos (SUDARTO et al., 1990, DAMAYANTI et al., 1994; TUNTASUVAN et al., 1997), veados (TUNTASUVAN et al., 2000), cães (FRANKE et al.; 1994; SILVA et al., 1995b; AQUINO et al., 1999; COLPO et al., 2005), capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (Franke et al.; 1994), quatis (*Nasua nasua*) (NUNES & OSHIRO, 1990; Herrera, 2001), pequenos mamíferos (*Thricomys* sp., *Clyomys* sp., *Myotis* sp., *Noctilio* sp.), marsupiais (*Monodelphis* sp.), tatus (*Euphractus* sp.) (Herrera et al., 2004), suínos (TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998; TUNTASUVAN et al., 2003b), camelos (DELAFOSSSE & DOUTOUM, 2004) e elefantes (LEVINE, 1973). Recentemente, o primeiro caso de tripanossomíase

por *T. evansi* em seres humanos foi descrito em um homem indiano (JOSHI et al., 2005).

No Brasil, *T. evansi* afeta principalmente eqüinos e a prevalência possuem variações de uma região para outra (DÁVILA & SILVA, 2000; HERRERA et al., 2004). A doença é enzoótica no Pantanal mato-grossense, onde assume grande importância, pois esses animais são amplamente usados para o manejo de bovinos (SILVA et al., 1995a; AQUINO et al., 1999). Surtos esporádicos acontecem em algumas regiões do Pantanal, podendo ocorrer com morbidade alta em certas sub-regiões ou estar ausentes em outras (DÁVILA et al., 1999). A tripanossomíase no Pantanal afeta eqüinos (FRANKE et al., 1994; SILVA et al., 1995a; DÁVILA et al., 1999), cães (SILVA et al., 1995b; HERRERA et al., 2004), capivaras (NUNES & OSHIRO, 1990; HERRERA et al., 2004), quatis (NUNES & OSHIRO, 1990), bovinos, búfalos, pequenos mamíferos, marsupiais e tatus (HERRERA et al., 2004). As capivaras são consideradas reservatórios pelos achados clínicos e laboratoriais (FRANKE et al., 1994).

2.1.3. Patogênese

A patogenicidade dos tripanossomas no hospedeiro varia de acordo com a espécie animal e cepa do tripanossoma, fatores inespecíficos afetando o animal como outras infecções e estresse, e condições epizootiológicas locais (HOARE, 1972).

Os tripanossomas multiplicam-se no local da picada, na pele, invadem a corrente sangüínea e o sistema linfático, causando febre recorrente e induzindo uma resposta inflamatória (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). A parasitemia aumenta e é acompanhada por respostas febris, que são seguidas por períodos aparasitêmicos e afebris. Os picos de parasitemia ocorrem devido a variações antigênicas na superfície do parasita. Conforme os anticorpos são produzidos, há eliminação do clone corrente,

mas sucessivos novos padrões de antígenos de superfície são gerados para evadir a resposta do hospedeiro (LUCAS et al., 1992).

A patogênese da anemia na tripanossomíase é bastante complexa e envolve uma série de mecanismos ainda não totalmente elucidados (ANOSA & KANEKO, 1983; JENKINS & FACER, 1985; RUE et al., 2000; AQUINO et al., 2002). A principal causa da anemia é a retirada dos eritrócitos danificados da corrente sanguínea pelas células do sistema fagocítico mononuclear no baço, medula óssea, pulmões e linfonodos. A hemossiderose extensa observada nesses casos e a captura de ferro no citoplasma dos macrófagos irão contribuir para a eritropoiese deficiente (JENKINS & FACER, 1985; RUE et al., 2000; CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004).

O *T. evansi* têm afinidade pelos tecidos, nesses casos, devido às alterações inflamatórias, degenerativas e necróticas resultantes da invasão dos tripanossomas nos espaços extravasculares (LOSOS & IKEDE, 1971). Dessa maneira, os sinais clínicos dependem da distribuição dos parasitas nos tecidos e da gravidade das lesões induzidas nos diferentes órgãos e tecidos. Estes flagelados podem invadir o sistema nervoso central (SNC) levando a uma lesão progressiva (GIBSON, 1998). Os tripanossomas podem induzir lesões na barreira hematoencefálica (BHE), que irão provocar edema e pequenas hemorragias. O edema vasogênico (aumento de água e outros constituintes do plasma no encéfalo causado pela lesão nos elementos vasculares do encéfalo) geralmente ocorre nos estágios finais da infecção (PHILIP et al., 1994).

A multiplicação deste protozoário ocorre principalmente nos espaços teciduais extracelulares. Eventualmente, o parasita é encontrado nos espaços vasculares e, provavelmente, utiliza esta rota apenas como transporte. Sinais clínicos neurológicos

parecem ocorrer com a presença dos tripanossomas no líquido cefalorraquidiano (LCR). Nesses casos, os tripanossomas induzem uma resposta inflamatória nos nervos espinhais, mas com pouco envolvimento do SNC (RADOSTITS et al., 2002b; LUCKINS et al., 2004).

2.1.4. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos comumente observados na infecção por *T. evansi* são febre intermitente, urticária, anemia, edema das patas traseiras e das partes baixas do corpo, perda de pêlos, fraqueza progressiva, perda de condição corporal e inapetência (LEVINE, 1973). Os animais afetados agudamente podem morrer dentro de dias, semanas ou poucos meses, mas infecções crônicas podem durar anos (BRUN et al., 1998). Os casos mais graves ocorrem em eqüinos e cães, enquanto casos crônicos são comumente observados em búfalos e bovinos, que podem não apresentar sinais clínicos.

Eqüinos experimentalmente infectados com *T. evansi* (FRAZER & SIMONDS, 1909) apresentam sinais clínicos como febre intermitente nos últimos estágios da doença, com temperatura constantemente elevada. Outro sinal clínico observado é a emaciação das patas traseiras, do escroto, edema de mamas, no abdômen e tórax. A taquicardia e a taquipnéia ocorrem nos períodos febris e nos estágios finais e a dispnéia poucos dias antes da morte. As mucosas conjuntivas inicialmente congestas tornam-se amarelas e no estágio final da doença apresentam-se pálidas e com petéquias. O lacrimejamento e a descarga nasal aquosa também foram relatadas.

A duração dos sinais clínicos varia de acordo com a condição física do animal: aqueles em mau estado corporal, geralmente sucumbem mais rápido. Além dos sinais

clínicos descritos anteriormente, outros trabalhos sobre a infecção por *T. evansi* em eqüinos descrevem letargia, depressão, fraqueza progressiva, inapetência, anemia acentuada, conjuntivite, tosse, abortos, aumento dos linfonodos superficiais e edema submandibular (SEILER et al., 1981; SILVA et al., 1995b; TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998; MARQUES et al., 2000). Sinais clínicos de distúrbios locomotores também podem ocorrer e caracterizam-se por relutância em se mover, ataxia, fraqueza, paresia e incoordenação dos membros pélvicos; o eqüino pode assumir posição de cão-sentado (SEILER et al. 1981; MARQUES et al., 2000).

Nos bovinos, búfalos e veados, os sinais clínicos são semelhantes aos observados em eqüinos (FRAZER & SIMONDS, 1909; DAMAYANTI et al., 1994; TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998; TUNTASUVAN et al., 2000). Em geral, bovinos e búfalos desenvolvem um curso clínico cuja duração depende da condição do animal. Geralmente o curso é crônico, mas animais em mau estado corporal apresentar doença aguda, e aqueles em bom estado corporal podem não desenvolver doença clínica (FRAZER & SIMONDS, 1909). Vacas de leite e búfalos podem abortar do meio até o final da gestação, podendo haver também retenção de placenta, febre alta e diminuição na produção de leite (TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998).

Em cães descreve-se conjuntivite, febre, conjuntivas pálidas, emaciação progressiva e aumento dos linfonodos palpáveis. O apetite pode permanecer inalterado e a emaciação deve ser relacionada a outras causas (SILVA et al., 1995b; AQUINO et al., 1999; HERRERA et al., 2004; COLPO et al., 2005). Animais silvestres, como capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e quatis (*Nasua nasua*) podem desenvolver uma forma crônica da doença (NUNES et al., 1993; HERRERA et al., 2001). Sinais clínicos geralmente não são observados nas capivaras (FRANKE et al., 1994), mas quando

ocorrem se caracterizam por caquexia e andar cambaleante (NUNES et al., 1993). Os quatis desenvolvem emaciação progressiva, aumento dos linfonodos palpáveis, depressão e letargia (HERRERA et al., 2001). Suínos podem ter inapetência, febre intermitente, petéquias nas orelhas, patas e escroto. Algumas fêmeas abortam e alguns animais podem desenvolver sinais neurológicos, como convulsão e morte (TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998).

Vários estudos têm demonstrado que animais infectados com *T. evansi* podem desenvolver distúrbios neurológicos. Esses sinais caracterizam-se por andar em círculos, excitação, saltos, comportamento agressivo, decúbito lateral, incoordenação e paresia dos membros pélvicos, opistótono, convulsão e, finalmente, morte. Em alguns bovinos que morreram com sinais clínicos neurológicos os parasitas foram encontrados no líquido cefalorraquidiano LCR (TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998).

2.1.5. Alterações Laboratoriais

A principal alteração hematológica identificada em animais com tripanossomose é a anemia acentuada (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). As alterações eritrocitárias podem incluir microesferócitos, acantócitos, dacriócitos, micrócitos, vacuolização eritrocitária, policromasia, poiquilocitose, adesão eritrocitária dos tripanossomas aos eritrócitos circulantes e eritrofagocitose (ANOSA & KANEKO, 1983; SILVA et al., 1995b; CONRADO et al. 2005). A anemia intensa geralmente é seguida por um pico de parasitemia (HERRERA et al., 2002; CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004).

Os valores leucocitários podem estar normais (DAMAYANTI et al., 1994; MARQUES et al. 2000; RUE et al., 2000; HERRERA et al., 2002), aumentados (ANOSA

& KANEKO, 1983; EMERIBE & ANOSA, 1991; MONZON et al., 1991; DAMAYANTI et al., 1994) ou diminuídos (SILVA et al., 1995b; 1999; AQUINO et al., 2002). A contagem dos linfócitos pode estar aumentada (EMERIBE & ANOSA, 1991; MONZON et al., 1991; DAMAYANTI et al., 1994; SILVA et al., 1995; BATISTA et al., 2006) ou diminuída (MARQUES et al., 2000). Em geral, não há alterações significativas na contagem de monócitos, eosinófilos e basófilos (DAMAYANTI et al., 1994; RUE et al., 2000; AQUINO et al., 2002).

Estudos com cães, bovinos, gatos e ratos infectados com *T. evansi*, também relataram diminuição na contagem de plaquetas (DAMAYANTI et al. 1994; RUE et al. 1997; FRANCISCATO et al. 2007, DA SILVA et al., 2009, DA SILVA et al., 2010)

2.1.6 Tratamento

O tratamento das tripanossomoses é baseado nas drogas suramine, diminazene, quinapiramina, melarsoprol, homidium e isometamidium. A escolha da droga, as doses, e a rota de aplicação dependem da espécie animal, do manejo a ser empregado e da quimiosensibilidade da cepa de tripanossoma. Resistência a essas drogas ocorre freqüentemente, e pode restringir seu uso (BRUN et al., 1998)

O aceturato de diminazeno é o produto mais comumente usado no controle do *T. evansi* nos animais domésticos, pois apresenta um maior índice terapêutico na maioria das espécies domésticas. Tem atividade contra tripanossomas que são resistentes a outros medicamentos e apresenta baixa incidência de resistência (PEREGRINE & MAMMAM, 1993). Outro medicamento utilizado para a tripanossomose é a oxitetraciclina, um antibiótico de largo espectro que vem sendo freqüentemente usada em formulações comerciais associada ao aceturato do diminazeno, para tratar as infecções secundárias por agentes bacterianos.

2.2. Plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariócitos, envolvidos por membranas e destituídas de núcleo. Nas plaquetas se reconhecem três zonas: (1) zona externa ou periférica que condiciona a propriedade de adesão. Nessa porção encontram-se antígenos, glicoproteínas e vários tipos de enzimas. Mais internamente existe a membrana plaquetária, onde estão localizadas as glicoproteínas que são receptores específicos para determinados fatores de coagulação. (2) Uma zona sol-gel ou citosol com proteínas actinmiosina e tubulina, formando microtúbulos e microfilamentos, responsáveis pelo esqueleto da plaqueta. (3) Uma zona de organelas contendo corpúsculos densos (Ca^{2+} , ADP, ATP, Serotonina, Pirofosfato), grânulos alfa (fatores de crescimento, fatores de coagulação e proteínas de adesão) e um sistema de membrana, local de síntese de prostaglandinas e tromboxano A₂ (LORENZI et al., 2003).

As plaquetas em média circulam no sangue de 9-10 dias. Durante esse tempo de sobrevivência, o seu metabolismo se baseia na liberação de energia, representada pela transformação do ATP em ADP, a partir da glicólise e do mecanismo oxidativo das mitocôndrias. Essa energia é utilizada para as funções básicas das plaquetas, que são a adesão, a agregação e a secreção de colágeno. Após a adesão das plaquetas no subendotélio, novas plaquetas são ativadas e acabam aderindo a essas plaquetas. Durante esta ativação, as plaquetas mudam sua forma passando de discóide a irregular, emitindo pseudópodes a partir da membrana e se agregam. Os grânulos plaquetários são liberados. O primeiro sinal de ativação plaquetária é sentido na membrana externa, onde os fatores capazes de promover esta ativação como a

trombina, a adrenalina, o colágeno e o ADP se ligam aos seus receptores específicos. A seguir, ocorre a ligação das plaquetas aos receptores das glicoproteínas e ativação das moléculas de integrinas plaquetárias levando ao processo de agregação plaquetária (LEE et al., 1998; LORENZI et al., 2003).

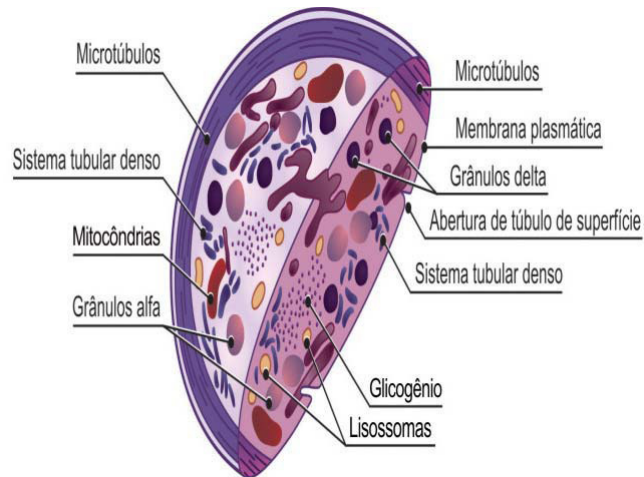


Figura 2: Representação de uma plaqueta, Adaptado de Freitas (2009)

2.2.1. Agregação plaquetária

A agregação plaquetária ocorre devido à formação de pontes de fibrinogênio, pois este se liga ao receptor na membrana plaquetária, GP IIb/IIIa, que na presença de Ca^{2+} forma um complexo estável na superfície das plaquetas ativadas. Também ocorre devido ao metabolismo do ácido araquidônico, sendo o mesmo liberado a partir da membrana fosfolipídica das plaquetas pela ativação da enzima fosfolipase A2 e, subsequentemente, a enzima cicloxigenase 1 (COX-1) converte o ciclo araquidônico em endoperóxidos cíclicos. Esses são então convertidos pela tromboxano sintetase em tromboxano A2 (TXA2), funcionando como um potente agonista que induz a agregação (LEE et al., 1998; ANDREWS et al., 1999; GAETANO, 2001). A amplificação e

propagação contínua da agregação plaquetária são ativadas pela formação de agregados plaquetários e a expulsão ADP e de outras substâncias ativas das organelas plaquetárias (LEE et al., 1998).

2.2.2. Hemostasia

A principal função das plaquetas é a hemostasia, na qual desempenham atividade mecânica e bioquímica. As plaquetas aderem-se as estruturas subendoteliais expostas e tornam-se ativadas; ocorrendo a adesão plaquetária. Posteriormente, ocorre uma intensa atividade metabólica, havendo a síntese de mensageiros intracelulares e formação de agonistas plaquetários. Na seqüência as plaquetas sofrem transformações morfológicas, iniciando a formação de agregados plaquetários também denominados de rolhas, que vão constituir a barreira plaquetária inicial. A liberação de ADP e outras substâncias ativas amplificam o processo de ativação plaquetária. Segue-se a ativação com a liberação o fator 3 plaquetário e tem início o processo de coagulação sangüínea, removendo à consolidação da rolha plaquetária pela fibrina e a conseqüente retração do coágulo (LEE et al., 1998; LORENZI et al., 2003; RAMASAMY, 2004).

2.9. Nucleotídeos de adenina e o sistema vascular

A sinalização purinérgica no sistema vascular tem o potencial de influenciar funções cardíacas, participar de respostas vasomotoras e controlar muitas funções plaquetárias (BURNSTOCK, 2002).

Os nucleotídeos de adenina constituem 90% dos nucleotídeos plaquetários e encontram-se distribuídos em dois pools distintos: o pool metabólico, utilizado na manutenção das funções celulares, constituído principalmente por ATP, e o pool de

armazenamento, que contém ATP e ADP para a liberação durante a secreção plaquetária (LEE et al., 1998).

O ADP constitui-se no principal agonista envolvido no recrutamento e agregação das plaquetas em locais de injúria vascular, enquanto que a adenosina possui efeitos inibitórios sobre esta agregação (ANFONSI et al., 2002; ROZALSKI et al., 2005). O ATP possui um papel complexo nos mecanismos de regulação de agregação plaquetária, sendo que em baixas concentrações ativa e em altas concentrações inibe a agregação de plaquetas induzida pelo ADP (SOSLAU & YOUNPRAPAKON, 1997; BIRK et al., 2002; REMIJIN et al., 2002; ROZALSKI et al., 2005).

2.3. Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina

Os nucleotídeos de adenina extracelulares são hidrolisados por enzimas conhecidas como ecto-nucleotidases. Dentre estas se destaca a NTPDase (apirase, CD39, ATP difosfohidrolase) e a 5'-nucleotidase, duas enzimas capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como ATP, ADP e AMP à seus receptores específicos (ZIMMERMANN, 2001).

2.3.1. NTPDase (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD39, E.C. 3.6.1.5)

E-NTPDases (Ecto – nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) é o termo genérico para designar uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001). Oito membros desta família já foram identificados e diferem quanto à especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; BIGONNESE et al., 2004). Estas enzimas apresentam um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos,

particularmente dentro de cinco regiões que são conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACRs), as quais são de extrema importância para a atividade catalítica (ZIMMERMANN, 1999).

A NTPDase 1 (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD 39) foi a primeira enzima da família E-NTPDase a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Fig.3) (ZIMMERMANN, 2001). Esta enzima hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (ZIGANSHIN et al., 1994).

A presença da NTPDase já foi relatada em plantas, parasitas, insetos e em vários tecidos e células de mamíferos, como por exemplo em córtex cerebral, linfócitos, células endoteliais e plaquetas (BATTASTINI et al., 1991; SARKIS et al., 1995; PILLA et al., 1996, WANG & GUIDOTTI, 1998; LEAL et al., 2005). Esta enzima vem sendo amplamente estudada nos últimos anos tanto em condições fisiológicas e patológicas (LUNKES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005; LEAL et al., 2007). A função geral da apirase tem sido atribuída à hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP e ADP e, portanto, dependendo da localização tecidual a atividade enzimática possui diferentes papéis fisiológicos (SARKIS et al., 1995; ZIMMERMANN, 1999).

2.3.2. 5'-Nucleotidase (CD73, E.C. 3.1.3.5)

A 5'-nucleotidase é uma enzima ancorada à membrana plasmática via molécula de GPI (glicofosfatidil inositol) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Entretanto, formas solúveis e clivadas desta enzima também já foram descritas (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER et al., 2005).

Esta enzima catalisa a desfosforilação de vários nucleotídeos 5'-monofosfatados como CMP, IMP, UMP, GMP e AMP à seus respectivos nucleosídeos (ZIMMERMANN, 1996). No entanto, foi demonstrado que a 5'-nucleotidase hidrolisa mais eficientemente o AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN et al., 1998; ZIMMERMANN, 2001).

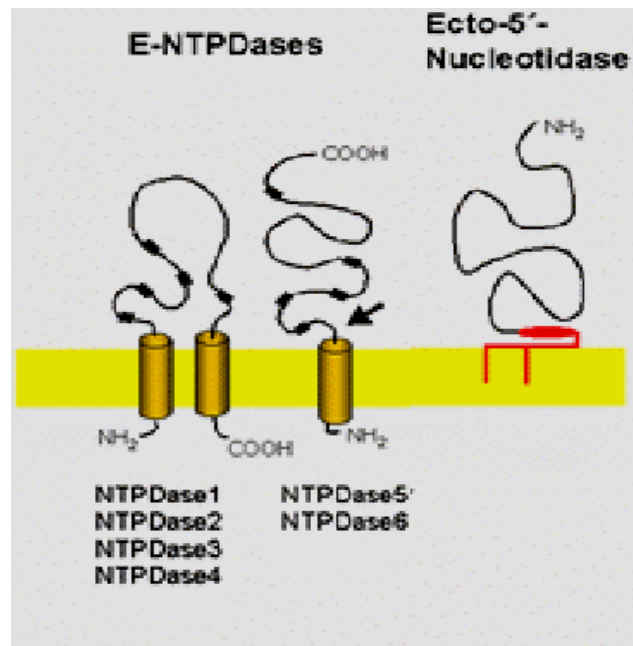


Figura 3: Ecto-ATPases, Adaptado de Zimmermann (2001).

2.3.3. Adenosina deaminase

A adenosina um importante componente do sistema purinérgico que age como um modulador do SNC em mamíferos e regula o metabolismo das células, desencadeando uma série de efeitos fisiológicos que participam da apoptose, necrose e proliferação celular. Em condições patológicas, a adenosina desempenha um papel protetor, modulando a liberação de neurotransmissores. A adenosina também atua como um regulador endógeno da imunidade inata, a defesa do hospedeiro de lesão

tecidual excessiva associada à inflamação (RATHBONE et al., 1999; BERAUDI et al., 2003; HASKO & CRONSTEIN, 2004; SITKOVSKY & OHTA, 2005; BURNSTOCK, 2006; DESROSIERS et al., 2007).

A concentração de adenosina extracelular é regulada pela atividade de um pequeno grupo de enzimas importantes, incluindo a adenosina deaminase (ADA, EC 3.5.4.4), que catalisa a conversão da adenosina em inosina seu metabólito inativo. A adenosina deaminase (ADA) é amplamente distribuída nos tecidos dos animais vertebrados e divide-se em duas isoformas ADA1 e ADA2. Tecidos contêm predominantemente ADA1. Já a ADA2 é o principal componente do soro e é um suposto estimulador de células-T. ADA foi detectada na superfície de muitos tipos celulares, incluindo sinaptossomas do cérebro. A expressão heterogênea da atividade de ADA pode ser encontrada nos tecidos periféricos e no SNC. Conforme pesquisadores, a atividade da ADA apresenta grande variação em áreas cerebrais distintas (GEIGER et al., 1986; FRANCO et al., 1986; 1997).

A atividade da ADA foi detectada na superfície das células hematopoiéticas (ARAN et al., 1991). ADA está presente em todos os tipos de células, mas a atividade é mais alta no timo, tecidos linfóides e em linfócitos periféricos. Tem sido demonstrado que esta enzima desempenha um papel importante na função dos linfócitos e é essencial para o crescimento normal, diferenciação e proliferação de linfócitos T (FRANCO et al., 1997; CODERO et al., 2001).

3 - CAPÍTULO II

MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações da revista ao qual foi submetido:

Activity of adenine nucleotide and nucleoside degradation enzymes in platelets of rats infected by *Trypanosoma evansi*

Camila Belmonte Oliveira^{a*}, Aleksandro Schafer da Silva^a, Lara Vargas Becker^b, Paula Rodrigues Bitencourt^b, Viviane do Carmo Souza^a, Marcio Machado Costa^c, Claudio Alberto Martins Leal^a, Maria Beatriz Moretto^b, Daniela Bitencourt Rosa Leal^a, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes^c, Silvia Gonzalez Monteiro^a

De acordo com normas para publicação em:

Veterinary Parasitology

Activity of adenine nucleotide and nucleoside degradation enzymes in platelets of rats infected by *Trypanosoma evansi*

Camila B. Oliveira^a, Aleksandro S. Da Silva^a, Lara B. Vargas^a, Paula E.R. Bitencourt^b,
Viviane C.G. Souza^a, Marcio M. Costa^c, Claudio A. Leal^a, Maria B. Moretto^b, Daniela B.
Leal^a, Sonia T.A. Lopes^c, Silvia G. Monteiro^a

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

^b Department of Clinical Analysis and Toxicology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

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

*Corresponding author: Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM.
Faixa de Camobi - Km 9, Campus Universitário, Santa Maria - RS, Brasil. 97105-900,
Prédio 20, Sala 4232. Fax: +55 55 3220-8958. camilabelmontevet@yahoo.com.br

Activity of adenine nucleotide and nucleoside degradation enzymes in platelets of rats infected by *Trypanosoma evansi*

Abstract

Nucleotide and nucleoside-degrading enzymes are present in the surface of platelets, blood cells involved in clotting disturbances of *Trypanosoma evansi*-infected animals. Thus, this study was aimed at evaluating the activity of the enzymes NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) in platelets of rats experimentally infected by *T. evansi*. Animals were divided four groups according to the degree of parasitemia. Samples were collected at days 3 (group A: at the beginning of parasitemia), 5 (group B: high parasitemia) and 15 (group C: chronic infection). Group D (control group) was composed of non-infected animals. Blood samples with citrate as the anticoagulant were collected and used for platelet separation and enzymatic assays. NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activities were decreased ($p < 0.05$) in platelets from rats of groups A and B, when compared to the control group. In group C, only NTPDase and 5'-nucleoside activities were increased ($p < 0.001$), observed by ADP and AMP hydrolysis. The correlation between platelet count and nucleotide/nucleoside hydrolysis was positive and statistically significant ($p < 0.05$) in groups A and B. Platelet aggregation was decreased in all infected groups, in comparison to the control group ($p < 0.05$). Based upon the results, it is concluded that the alterations observed in the activity of the enzymes NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA in platelets of *T. evansi*-infected animals might be related to thrombocytopenia.

Keywords: NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase, thrombocytopenia.

1. Introduction

The protozoan *Trypanosoma evansi* is the etiologic agent of the disease known as “Mal das Cadeiras” or “Surra” in equines. This parasite is reported affecting domestic and wild mammals and, in rare cases, humans (Powar et al., 2006). The disease is widely distributed, occurring in Africa, India, Malaysia, Indonesia, China, Russian, Philippines and Latin America (Silva et al., 2002). The trypomastigote forms are mainly transmitted by blood-sucking insects (Hoare, 1972). Trypanosome-infected animals present clinical signs as fever, poor body condition, weakness, subcutaneous edema, petechiae of the serous membranes and instability of the hind limbs (Silva et al., 1995). Low platelet count and clotting disturbance may occur in the acute phase of the disease, as reported in dogs, cats and rats infected by *T. evansi* (De La Rue et al., 1997; Franciscato et al., 2007; Da Silva et al., 2010a; Da Silva et al., 2010b).

Coagulopathies are alterations related to the number of platelets or to the coagulation cascade that consequently interfere in the coagulation process (Jain, 1993). The platelet reduction may be a consequence of bone marrow impairment, short life span, immunomediated thrombocytopenia, disseminated intravascular coagulation (DIC) and splenic sequestration (Jenkins and Facer 1985; Stephen 1986). Platelets truly play important homeostatic functions, through the mechanisms of adhesion, aggregation and subsequent formation of clots at sites of vascular damage (Harker, 1997; Marcus et al., 2002; Wagner and Burger, 2003).

The platelet surface contains purinergic receptors for the nucleotides ATP and ADP. These nucleotides are controlled by the enzymes NTPDase and 5'-nucleotidase, through the degradation of adenosine to inosine (Pilla et al., 1996). Adenine nucleotides are considered important endogenous signaling molecules in inflammatory and

immunological processes and in vasomotor responses, through the control of platelet functions and thromboregulation (Burnstock, 2002; Illes and Ribeiro, 2004).

Platelet nucleotides play a fundamental role in normal homeostasis and in the prevention of excessive ADP-induced platelet aggregation (Lunkes et al., 2004). They are distributed in two distinct pools; the metabolic, used for maintaining cellular functions, mainly constituted of ATP; and the storage pool, which contains ATP and ADP that are released during platelet secretion (Lee et al., 1998).

Enzymatic activities of NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) represent essential mechanisms for thromboregulation and homeostasis. Within this context, the study of such enzymatic activities in platelets of *T. evansi*-infected animals is important, since the acute phase of the disease course with thrombocytopenia. Thus, the aim of this study was to evaluate the NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activities, which participate in ATP/ADP hydrolysis and in ADA deamination, in platelets of *T. evansi*-infected rats during different periods of the infection.

2. Material and methods

2.1 Animals

We used 45 male rats (*Rattus norvegicus*) with 70 days old (250 to 300g). The animals were kept in cages and placed in an experimental room with controlled temperature and humidity (25 °C and 80% RH) and had free access to water and commercial chow throughout the experiment. All animals were treated with pyrantel pamoate, praziquantel and fenbendazole, and were submitted to a period of 15 days for adaptation before the beginning of the experimental period (day 0). The procedure was

approved by the Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), number 23081.014999/2009-63, in accordance to brazilian laws and ethical principles published by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2 Inoculation and estimation parasitemia

The *T. evansi* strain used in this study had been obtained from a naturally infected dog (Colpo et al., 2005) and had been kept in liquid nitrogen and in Wistar rats. Thirty animals were inoculated intraperitoneally (Day 0) with 0.2ml of blood containing an average of 2.5×10^6 parasites, according to methodology described by Assoku (1975). Fifteen rats received 0.2ml of saline by the same route and were used as control. Parasitemia was estimated daily by microscopic examination of smears (Da Silva et al., 2006). Each slide was mounted with blood collected from the tail vein, stained by the panoptic method and visualized at a magnification of 1000x.

2.3 Experimental design

The animals were grouped (n=10) according to the degree of parasitemia and time of infection (Wolkmer et al., 2007). Thus, group A (early infection) consisted of rats with 3 days post-infection (PI), group B (acute infection) consisted of rats with 5 days PI and group C (chronic infection) consisted of rats with 15 days PI. Group D (non-infected rats) was divided into subgroups D1, D2 and D3 (n=5) for comparison with the infected animals of groups A, B and C, respectively.

2.4 Samples collection

The animals were anesthetized in a chamber with isoflurane for collection of blood by cardiac puncture (8.5ml). Thereafter, rats were decapitated following recommendations of the Ethics Committee. Part of the material collected was allocated in tubes containing citrate anticoagulant for separation of platelets.

2.5 Platelet counts

Platelet counts were performed by using a Neubauer chamber filled with whole blood diluted in calcium oxalate.

2.6 Platelet preparation

Platelets were isolated from plasma obtained from blood collected with sodium citrate as anticoagulant (0.129M, 1:9 v/v), according to described by Pilla et al. (1996) and modified by Lunkers et al. (2003). Cell viability was estimated by lactate dehydrogenase release before and after incubation at 37 °C. Values of the sample were compared to the enzymatic activity obtained from cells lysed with 0.1% Triton X-100, as described by Bergmeyer (1983). Cell viability was also estimated by trypan blue dye exclusion.

2.7 Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard, as described by Bradford (1976).

2.8 NTPDase and 5'-nucleotidase activity determination

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 50 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μl as described by Lunkes et al. (2004). Twenty microliters of the enzyme preparation (8-12 μg of protein) were added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM, and the time of incubation was 60 minutes.

5'-Nucleotidase activity was determined essentially as described by Heymann et al. (1984) in a reaction medium containing 10 mM MgSO_4 and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 at a final volume of 200 μl . Twenty microliters of enzyme preparation (8-12 μg of protein) was added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of AMP at a final concentration of 2.0 mM. The time of incubation was 60 minutes.

Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 μl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1986) using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolysis of nucleotides by adding platelets after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.9 ADA enzyme assay

ADA activity was measured spectrophotometrically in serum, lymphocytes and erythrocytes by the method of Giusti and Gakis (1971). The reaction was started by

addition of the substrate (adenosine) to a final concentration of 21 mmol/l and incubations were carried out for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped by adding 106 mmol/l/0.16 mmol/l phenol-nitroprusside/ml solutions. The reaction mixtures were immediately mixed to 125 mmol/l/11 mmol/l alkaline hypochlorite (sodium hypochlorite) and vortexed. Ammonium sulphate of 75 μ mol/l was used as ammonium standard. The ammonia concentration is directly proportional to the absorption of indophenol at 650 nm. The specific activity is reported as U/l in platelets.

2.10 Platelet aggregation

Platelet aggregation was assessed by the method of Born and Cross (1963) by turbidimetric measurement with a Chrono-log optical aggregometer, with AGGRO/LINK® Model 810-CA software for Windows version 5.1. The preparation of platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of blood for 20 min at 1000 rpm and the preparation of platelet poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation of the sample at 3700 rpm for 30 minutes. After calibration of the aggregometer, the animals data concerning the assays and reagents were entered on a computer coupled to the equipment, and the animals test was then performed. Aggregation was measured at 37 °C and expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline at 5 min after the addition of the agonist ADP at concentrations of 10 μ M, with PPP as a reference. The results were expressed as percentage of aggregation.

2.11 Statistical analysis

Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test ($P < 0.05$). The correlation of NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA in platelets was

analyzed by linear regression. The analyses were performed using SAS statistical package (SAS Institute, Cary, NC, USA) with a significance level of 5% ($P < 0.05$).

3. Results

3.1 Parasitemia and clinical signs

Examination of the peripheral blood smears showed a prepatency period ranging between 24 and 48 h in the infected rats. The parasitemia curve can be observed at Fig. 1. Mild parasitemia and absence of clinical signs (two trypanosomes per microscopic field at 1000x magnification) were observed in group A animals. Moderate parasitemia (144 trypanosomes per microscopic field) and clinical signs characteristic of the trypanosomosis, as apathy, anorexia and pyrexia, as well as neurological signs and motor incoordination, were observed in group B rats (day 5). Low parasitemia (zero to one parasite per microscopic field) and no clinical signs were observed in group C animals.

3.2 Platelet counts

Animals from groups A and B showed marked thrombocytopenia, and an increase in platelet count was observed in chronically infected rats (Fig. 2).

3.3 Enzymatic activities

Results of ATP, ADP and AMP hydrolysis can be observed in Fig. 3, and ADA activity in platelets can be observed at Fig 4. Significant reductions of 48 and 44% were observed in the conversion of adenosine to inosine in groups A and B, respectively ($p < 0.05$). The hydrolysis of ATP by the enzyme NTPDase was decreased ($p < 0.05$) in

groups A (63%) and B (47%), when compared to the control group. Similarly, reductions of 66% (group A) and 42% (group B) were observed in ADP hydrolysis ($p < 0.05$), whereas in group C a significant increase ($p < 0.001$) of 50% was observed in comparison to the control group.

A positive and significant correlation ($p < 0.05$) between platelet count and ATP ($r = 0.64$), ADP ($r = 0.69$), AMP ($r = 0.66$) and adenosine ($r = 0.58$) hydrolysis was observed in group A. Similar correlation was observed between platelet count and ATP ($r = 0.73$), ADP ($r = 0.67$), AMP ($r = 0.71$) and adenosine ($r = 0.75$) hydrolysis in group B ($p < 0.05$). No statistically significant correlation was observed between platelet count and enzyme activities in group C.

Platelet aggregation was decreased ($p < 0.05$) in groups A, B and C, in comparison to the control group using ADP agonist, as observed in Fig. 5.

4. Discussion

Several studies with ectonucleotidases have been reported in protozoa as *T. cruzi*, *Tritrichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* sp. (Jesus et al., 2002; Asai et al., 1995; Meyer-Fernandes et al., 1997; Fietto et al., 2002). However, only few reports on the activity of these enzymes in the infected hosts are available. Altug et al. (2007) and Yasuda et al. (1996) reported serum ADA activity in cattle affected with naturally acquired theileriosis and babesiosis, respectively. The present study is the first report of enzymes that degrade adenine nucleotides/nucleosides in platelets of *T. evansi*-infected rats.

The decrease in the number of platelets observed in groups A (beginning of the infection) and B (acute infection) had been previously reported and may be associated

to reduced platelet life span, bone marrow impairment, immunomediated thrombocytopenia and DIC (Facer and Jenkins 1985; Stephen 1986; Murray and Dexter, 1988; Rue et al., 1997). Reduced number of circulating platelets may also be a consequence of splenic and hepatic sequestration, as previously reported in *T. evansi* infections (Rue et al., 1997; Da Silva et al., 2009; Da Silva et al., 2010).

The thrombocytopenia observed in the animals of groups A and B of our study, can also be a predictable outcome of self immune response of the host against alterations in the surface proteins of the protozoan (Maudlin et al., 2004). This is likely due to the increase in the number of megakaryocytes, an indicative of bone marrow response, as reported in rats acutely infected by *T. evansi* (Da Silva et al., 2010).

During the process of immunological stimulation, platelets are exposed to cryptoantigens that bind to antibodies or make the connection to immunocomplexes (Feldman et al., 2003). This work, the thrombocytopenia may be attributed to the presence of the parasite in the bloodstream, in animals chronically infected platelet count was higher than in other periods of infection and leading to a compensatory mechanism, as the thrombopoiesis and the increased platelet life span with reduction of the immunomediated thrombocytopenia (Jain, 1993).

Studies with NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA have demonstrated the involvement of these enzymes in the thromboregulation mechanisms, and altered enzymatic activities have been reported in many diseases (Silva et al., 2005; Shetinger et al., 2007). Decreased enzymatic activities were observed in our study, in comparison to the control group. This may be a consequence of the reduced number of platelets in groups A and B, as these cells present specific receptors for ATP and ADP nucleotides. Nucleotides/nucleosides have a key role in modulating diverse effects on the vascular

system through the interaction with platelet-specific receptors (Di Virgilio et al., 2001). Contradictory, an increase in NTPDase and 5'-nucleotidase activities was observed in group C, probably due to the increased number of platelets and ATP/ADP receptors, yielding the hydrolysis of these nucleotides. However, the augmented enzymatic activity could also represent a compensatory mechanism to the increased extracellular nucleotide levels (Spanevello et al., 2010).

No aggregation tendency was observed in platelets of *T. evansi*-infected rats, in comparison to the control group. Conversely, groups A, B and C showed a decrease in aggregation amplitude throughout the experiment. In groups A and B, this can be explained by the thrombocytopenia and consequent decrease in ADP release. The positive correlation among platelet aggregation, platelet count and ADP in these groups suggests an association of the results.

Chronically infected animals showed normal platelet count, what could contribute to platelet aggregation due to ADP metabolism and platelet recruitment and aggregation (Ziganshin et al., 1994; Pilla et al., 1996; Gayle et al., 1998; Lunkes et al., 2004; Araújo et al., 2005). Contradictory, the adenosine resulting from ATP/ADP hydrolysis is a potent inhibitor of this aggregation and an important modulator of vascular tonus via acting on A₂ receptors (Buffon et al., 2006). Thus, in the chronic infection (group C), where the platelet count was inside normal physiological range and therefore a greater aggregation would be expected, the decrease aggregation amplitude observed was attributed to the increase in ADP and AMP levels and consequent adenosine accumulation.

NTPDases are present in many tissues, including the platelet surface membrane. NTPDase expression in platelets regulates nucleotide-mediated signaling in the vasculature in a temporal and spatial manner with consequences for thrombogenesis

and platelet activation (Atkinson et al., 2006). Considering this, it can be hypothesized that alterations in platelet membranes may have corroborated with the reduction of the activity and expression of the enzymes NTPDase and 5'-nucleotidase in platelets of *T. evansi*-infected rats.

ATP, ADP and AMP hydrolysis and adenosine deamination were altered in platelets of *T. evansi*-infected rats. During the infection period, the decrease in the enzymatic activities may be related to thrombocytopenia, whereas in the chronic infection the increase in the activity may be attributed to a compensatory mechanism. Alterations in the activities of these enzymes may implicate in the pathophysiology of trypanosomosis.

References

Araújo, M.C., Rocha, J.B.T., Morsch, A., Zanin, R., Bauchspiess, R., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2005. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 421-426.

Assoku, R.K., 1975. Immunological studies of the mechanism of anaemia in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rats. *Int. J. Parasitol.* 5, 137-145.

Atkinson, B., Dwyer, K., Enjyoji, K., Robson, S.C., 2006. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic target. *Blood cells Mol. Dis.* 36, 217-222.

Battastini, A.M.O., Rocha, C.K. Barcellos, R.D., Sarkis, J.J.F., 1991. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in 200 synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16, 1303–1310.

Buffon, A., Ribeiro, V.B., Fürstenau, C.R., Battastini, A.M.O., Sarkis, J.F., 2004. Acetylsalicylic acid inhibits ATP diphosphohydrolase activity by platelets from adult rats. *Clin. Chim. Acta* 349, 53-60.

Burnstock, G., 2002. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 364-372.

Born, G.V.R, Cross, M.J., 1963. The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 95, 168-78.

Braford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities 207 of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Cananzi, A.R., Ferro-Milone, F., Grigolletto, F., Toldo, M., Menehini, F., Bortolon, F., D'Andrea, G., 1987. Relevance of platelet factor four (PF4) plasma levels in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scan.* 76, 79-85.

Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for the Ca²⁺ - ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380.

Colpo, C.B., Monteiro, S.G.; Stainki, D.R.; Colpo, T.B.; Henriques, G.B., 2005. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. Ciênc. Rural 35, 717-719.

Chiang, T.M., Whitaker, J., Kang, A.H., Beachey, E., 1982. The effect of myelin basic protein on the endogenous phosphorylation of platelets. Thromb. Res. 25, 487-499.

Da Silva, A.S., Doyle, R.L., Monteiro, S.G., 2006. Métodos de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos e camundongos. Rev. Fac. Zoot., Vet. Agr., 13, 83-87.

Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Zanette, R.A., Oliveira, C.B., Costa, M.M., Gressler, L.T., Otto, M.A., Santurio, J.M., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2010a. Clotting disturbances in *Trypanosoma evansi*-infected cats. Comp. Clin. Pathol. 19, 207-210.

Da Silva, A. S., Wolkmer, P., Zanette, R.A., Otto, M.A., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2010b. Thrombocytopenia and increased clotting time in rats acutely infected by *Trypanosoma evansi*. Comp. Clin. Pathol. *In press*.

Faye, D., Fall, A., Leak, S., Lossen, B., Geerts, S., 2005. Influence of an experimental *Trypanosoma congolense* infection and plane of nutrition on milk production and some biochemical parameters in West African Dwarf goats. Acta Trop. 93, 247-257.

Franciscato, C., Lopes, S.T.A., Teixeira, M.M.G., Monteiro, S.G., Wolkmer, P., Paim, C.B., 2007. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. Ciênc. Rural 37, 288-291.

Gayle, R.B., Maliszewski, C.R., Gimpel, S.D., Schoenborn, M.A., Caspary, R.G., Richards, C., Brasel, K., Price, V., Marcus, A.J., 1998. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. J Clin Invest. 101, 1851-1859.

Giusti, G., Gakis, C., 1971. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. Enzyme 12, 417-425.

Maudlin, I., Holmes, P., Miles, M.A. The Trypanosomiases. CABI, Wallingford, 2004.

De La Rue, M., Silva, R.A.M.S., Carli, G.A., 1997. Coagulopathy in dogs infected with *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. Parasitol. Día 21, 92-96.

Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D.; Falzoni, S., Sanz, M.J., Morelli, A., Torboli, M., Bolignesi, G., Baricordi, R., 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. Blood 97, 587-600.

Gaunt, S.D., 2000. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. Schalm's veterinary hematology. Philadelphia: Lippincott. 27, 154-162.

Harker, L., 1997. The role of platelets in the early and the late vascular responses initiated by mechanical vascular injury. *Fibrinol. Proteol.* 11, 97-103.

Heymann, D., Reddington, M., Kreutzberg, G.W., 1984. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43, 971-978.

Illes, P., Ribeiro, J.A., 2004. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 483, 5-17.

Jain, N.C., 1993. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: Jain, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 417p.

Jenkins, G.C, Facer, C.A., 1985. Hematology of African Trypanosomiasis, In: Tizardi, I. (ed). *Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis*. CRC Press, Boca Raton, USA, 13-44.

Khan, S.N., Belin, J., Smith, A.D., Sidey, M., Zilkha, K., 1985. Response to platelet-activating factor of platelets from patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 71, 212-220.

Lee, R.G., Bithell, T.C., Foerster, J., Athens, J.W., Lukens, J.N., 1998. Hematologia Clínica. São Paulo: Manole, 2623p.

Lunkes, G.I., Lunkes, D., Stefanello, F., Morsch, A., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Schetinger, M.R.C. 2003. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb. Res.* 109, 189-194.

Lunkes, G., Lunkes, D., Morsch, V., Mazzanti, C., Morsch, A., Miron, V., Schetinger, M.R.C., 2004. NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan induced diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 65, 1-6.

Marques, L.C., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Aquino, L.P.C.T., Pereira, G.T., 2000. Experimental infection with *Trypanosoma evansi* in horses: clinical and haematological observations. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 9, 11-15.

Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J., Islam, N., Pinsky, D., 2003. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J. Thromb. Haemost.* 1, 2497-2509.

Moraes, C.M., Curcio, B.R., Junior, F.F., Ribas, L.M., Nizoli, L.Q., Nogueira, C.E.W., 2007. Infecção por *Trypanosoma evansi* em equinos do Brasil. *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 102, 561-562.

Murray, M., Dexter, T., 1998. Anaemia in bovine African trypanosomiasis. A review. *Acta Trop.* 45, 389-432.

Neu, I.S., Prosiegel, M., Pfaffenrath, V., 1982. Platelet aggregation and multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scan.*, 1, 497-504.

Pilla, C., Emanuelli, T., Frasseto, S.S., Battastini, A.M.O., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F., 1996. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7, 225-230.

Powar, R.M., Shegokar, V.R., Joshi, P.P., Dani, V.S., Tankhiwale, N.S., Truc, P., Jannin, J., Bhargava A., 2006. A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. *Indian J. Med. Microbiol.* 24, 72-74.

Rodrigues, A., Figuera, R.A., Souza, T.M., Schild, A.L., Soares, M.P., Milano, J., Barros, C.S.L., 2005. Outbreaks of trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. *Pesq. Vet. Bras.* 25, 239–249.

Silva, R.A.M.S., Barros, A.T.M., Herrera, H.M., 1995. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects. *Ciênc. Rural*, 25, 233-238.

Silva, R.A.M.S, Arosemena, N.A.E, Herrera, H.M, Sahib, C.A, Ferreira, M.S.J., 1995. Outbreak of trypanosomosis to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-Grossense, Brazil. Vet. Parasitol. 60, 167-171.

Silva, R.A.M.S, Dávila, A. M. R, Seid, A., Ramires, L., 2002. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia, diagnóstico e controle. Embrapa Pantanal: Corumbá. 141p.

Spanevello, R.M., Mazzanti, C.M., Bagatini, M., Correa, M., Schmatz, R., Stefanello, N., Thomé, G., Morsch, V.M., Becker, L., Schetinger, M.R.C., 2010. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. J. Neurol. 257, 1432-1459.

Stephen, L.E., 1986. Trypanosomiasis: a veterinary perspective. Pergamon Press, New York. 533p.

Tuntasuvan, D., Luckins, A.G., 1998. Status of Surra in Thailand. J. Protozool. Res. 21, 1-8.

Wagner, D.D., Burger, P., 2003. Platelets in inflammation and thrombosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23, 2131-2137.

Wolkmer, P., Silva, A.S., Carnelutti, J.F., Costa, M.M., Traesel, C., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2007. Resposta eritropoética de ratos em diferentes de graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. *Ciênc. Rural* 37, 1682–1687.

Ziganshin, A.U., Hoyle, C., Burnstock, G., 1994. Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. *Drug Dev. Res.* 32, 134-146.

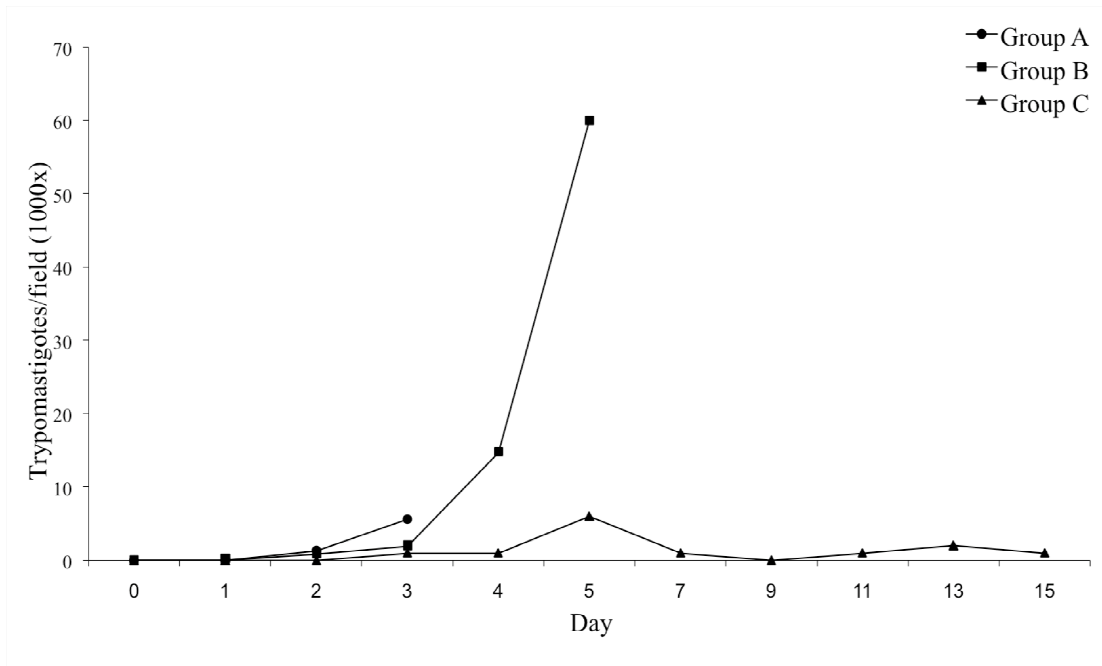


Fig.1. Parasitemia by *T. evansi* in infected rats 15 days post-inoculation. The collection of material was performed in groups A, B and C groups in 3 days, 5 and 15 post-infection, respectively.

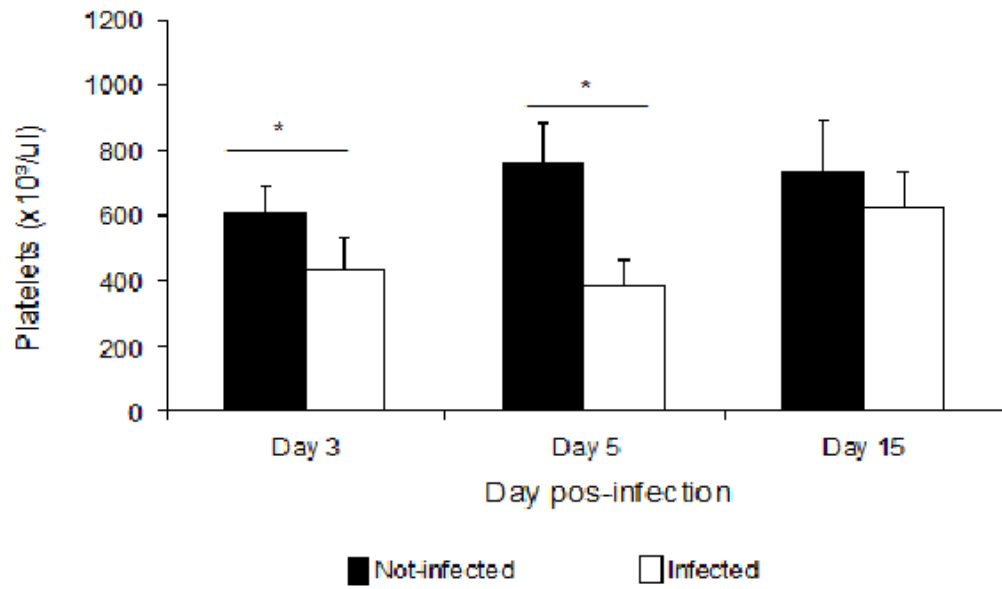


Fig.2. Platelet counts in rats infected and uninfected at days 3, 5 e 15 post-infection. * Represents significant difference between groups ($p < 0, 05$). The columns are represent as mean \pm standart deviation, $n=15$ (Teste de Tukey).

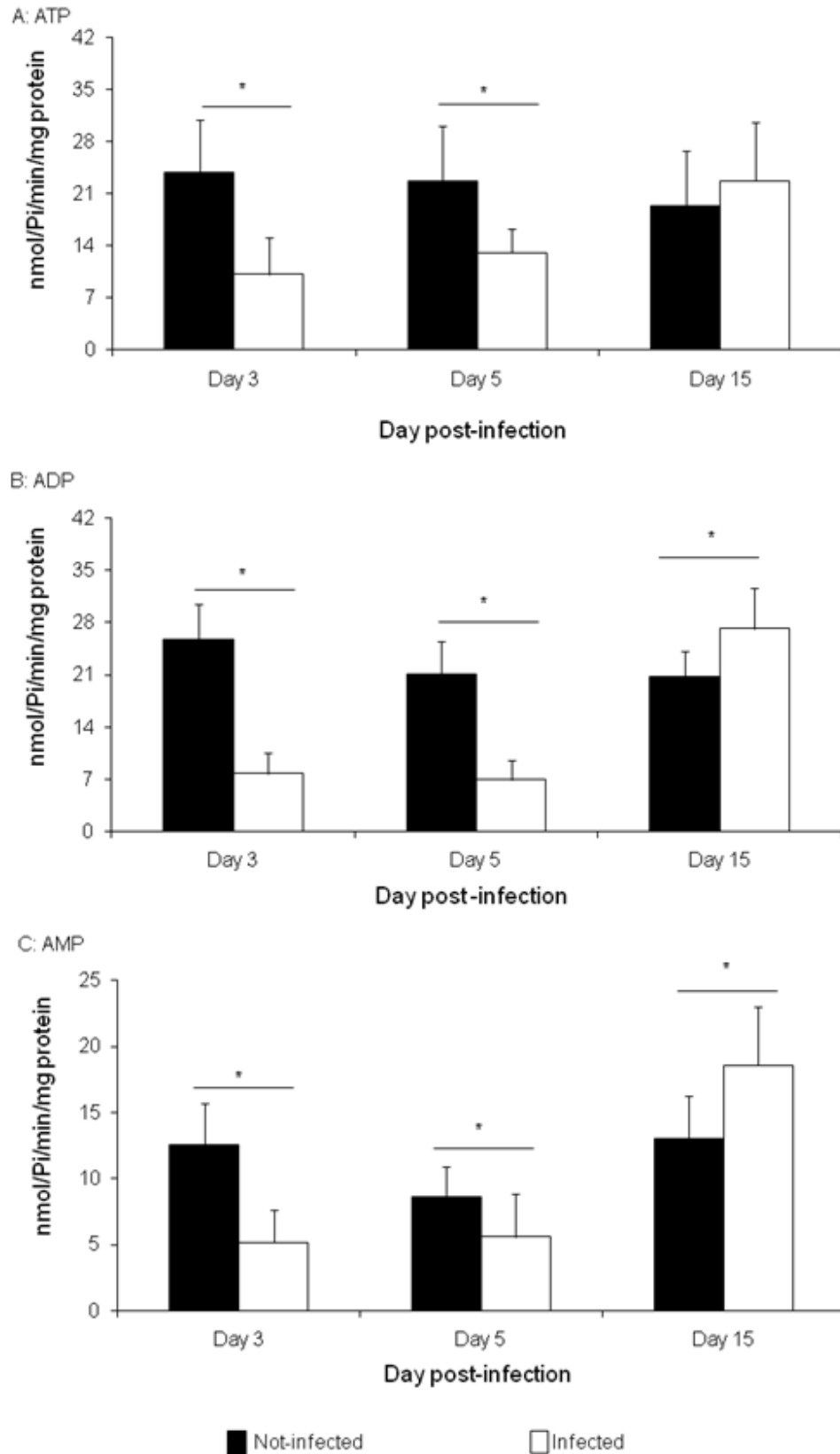


Fig.3. Hidrolysis of ATP (A), ADP (B) and AMP (C) from rats experimentally infected with *T. evansi* on 3, 5 and 15 post-infection. * Represents significant difference between groups ($p < 0.05$). The columns are represented as mean \pm standard deviation, $n=10$. (Teste de Tukey)

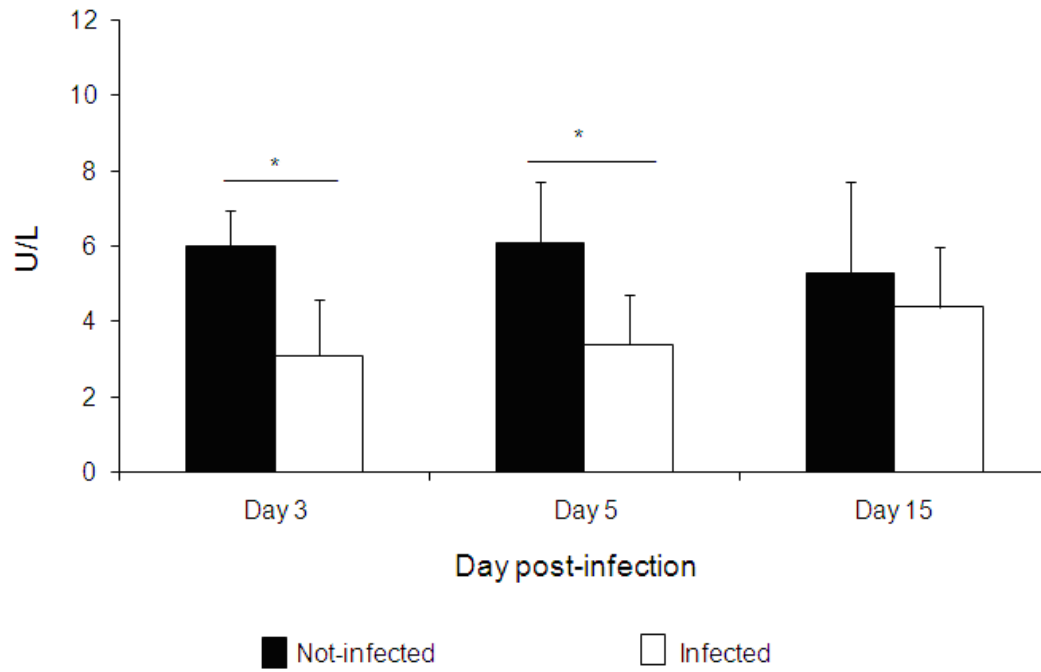


Fig.4. Activity of enzyme adenosine deaminase (ADA) from rats experimentally infected with *T. evansi* on 3, 5 and 15 post-infection. * Represents significant difference between groups ($p < 0, 05$). The columns are represented as mean \pm standard deviation, $n=15$ (Teste de Tukey)

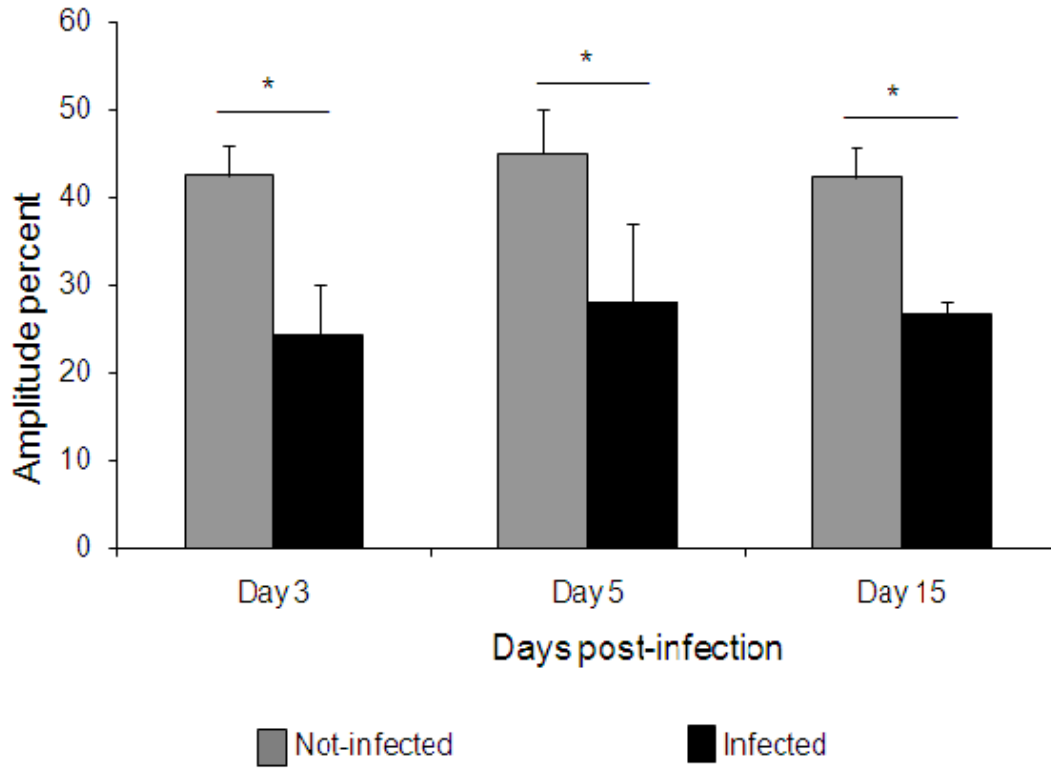


Fig.5. Platelet aggregation on days 3, 5 and 15 post-infection in mice infected with *T. evansi* compared to uninfected animals, using ADP as an agonist at concentration of 10 μ M. The results are expressed as percentage of aggregation (n=15)

4- CONCLUSÃO

A hidrólise de ATP, ADP e AMP e a desaminação de adenosina apresentaram-se alteradas em plaquetas de ratos infectados por *T. evansi*. Durante o período de infecção a diminuição na atividade enzimática pode estar relacionada à trombocitopenia e na infecção crônica o aumento da atividade pode ser atribuído a uma resposta compensatória do organismo. As alterações na atividade destas enzimas podem ter implicações na patogenicidade da enfermidade.

5- REFERÊNCIAS

ALDRICH M; BLACKBURN, M.; KELLEMS, R. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. **Biochem Biophys Res**, v. 272, p. 311–35, 2000.

ANDREWS, R.K.; SHEN, Y.; GARDINER, E.G. The glycoprotein Ib- IX-V complex in platelet adhesion and signaling. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 357- 364, 1999.

ANFOSSI, G.; RUSSO, I.; MASSUCCO, P.; MATTIELLO, L.; CAVALOT, F.; BALBO, A.; TROVATI, M. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through nitric oxide, possible role in its antiaggregating effect. **Thrombosis Research**, v.105, p.71-78, 2002.

ANOSA, V.O.; KANEKO, J.J. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): light and electron microscopic studies on erythrocyte pathologic changes and phagocytosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 4, p. 645- 651, 1983.

AQUINO, P. L. C. T.; MACHADO, R. Z.; ALESSI,A.C.; MARQUES,L.C.; CASTRO, M.B; MALHEIROS, E.B. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 255-260, 1999.

ARAÚJO, M.C.; ROCHA, J.B.T.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1740, p. 421-426, 2005.

BARRIGA, O.O. The class mastigophora or flagellates. In:____. **Veterinary parasitology for practioners**. 2nd ed. Minessota: Burgers International Group, 1997. cap. 25, p. 25.1- 25.12.

BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T.; BARCELLOS, C.K.; DIAS, R.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochemical Research**. v.16, p.1303-1310, 1991.

BIGONESSE, F.; LÉVESQUE, S.A.; LULKUSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S.C.; FERNANDES, M.J.; SEVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**. v. 43, p. 5511-5519, 2004.

BIRK, A.; BROEKMAN, M.; GLADEK, E.; ROBERTOSON, H.; DROSOPOULOS, J.; MARCUS, A.; SZETO, H. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v.40, p. 166- 175, 2002.

BONAN, C.D.; WALZ, R.; PEREIRA, G.S.; WORM, P.V.; BATTATISNI, A.; CAVALLEIRO, E.; IZQUERDO, I.; SARKIS, J. Changes in synaptosomal ectonucleotidases activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 39, p. 229-238, 2000.

BONAN, C.D.; SCHETINGER, M.R.C.; BBATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: implications in physiological and pathological conditions. **Drug Development Research**, v. 52, p. 57-65, 2001.

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

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.22, p. 364-372, 2002.

CADIOLI, F.A. **Infecção experimental em jumento (*Equus asinus*) com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885** (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae). 2001. 135f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

CODERO O, SALGADO F, FERNÁNDEZ-ALONSO C. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. **J Leukoc Biol**, v. 70, p. 920–30, 2001.

COLPO, C.B., MONTEIRO, S.G.; STAINKI, D.R.; COLPO, T.B.; HENRIQUES, G.B. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 717-719, 2005.

CONRADO, A.C. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, p. 928-931, 2005.

CONNOR, R.J.; VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press, 2004. v. 1. cap. 12, p. 251-296.

DAMAYANTI, R.; GRAYDON, R.J.; LADDS, P.W. The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 110, n. 3, p. 237-52, 1994.

DA SILVA, A.S., WOLKMER, P., ZANETTE, R.A., OLIVEIRA, C.B., COSTA, M.M., GRESSLER, L.T., OTTO, M.A., SANTURIO, J.M., LOPES, S.T.A., MONTEIRO, S.G. Clotting disturbances in *Trypanosoma evansi* infected cats. **Comp. Clin. Pat**, v. 19, p. 207-210, 2010.

DA SILVA, A. S., WOLKMER, P., ZANETTE, R.A., OTTO, M.A., LOPES, S.T.A., MONTEIRO, S.G. Thrombocytopenia and increased clotting time in rats acutely infected by *Trypanosoma evansi*. **Comp. Clin. Pat.**, 2010b. *In press*.

DÁVILA, A. M. R.; SOUZA, S.S.; CAMPOS, C.; SILVA, R. A. M. S. The soroprevalence of equine trypanosomiasis in the Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 199-202, 1999.

DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S. Animal trypanosomiasis in South America. Current Status, Partnership, and Information Technology. **Annual New York Academy of Science**, v. 916, p. 199-212, 2000.

EMERIBE, A.O.; ANOSA, V.O. Hematology of experimental *Trypanosoma brucei gambiense* infection. II. Erythrocyte and leucocyte changes. **Revue d Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v. 44, n. 1, p. 53-57, 1991.

FRANCO, R., VALENZUELA, A., LLUIS, C., AND BLANCO, J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunol. Rev**, 161, p. 27- 42, 1998.

GIUSTI G, GAKIS C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. **Enzyme**, v.12:p. 417–25, 1971.

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

FRAZER, H.; SYMONDS, S.L. Surra in federated Malay states. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 22, p. 185-192, 1909.

GAETANO, G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and trombosis. **Haematologica**, v.4, p. 349-356, 2001.

GIBSON, W. African trypanosomosis. In: PALMER, S.R., SOULSBY, L., SIMPSON, D.I.H. **Zoonoses. Biology, clinical practice, and public health control**. New York: Oxford University Press, cap. 41, p. 501-512, 1998.

HERRERA, H.M; AQUINO, L.P.C.T.; MENEZES, R.F.; MARQUES, L.C.; MORAES, M.A.V.; WERTHER, K.; MACHADO, R.Z. *Trypanosoma evansi* experimental infection in South american coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 209-216, 2001.

HERRERA, H.M; DÁVILA, A.M.R.; NOREK, A.; ABREU, U.G.;S.S. SOUZA, S.S.; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263-275, 2004.

HOARE, C.A. **The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph**. Oxford: Blackwell, 1972. 749p.

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

JENKINS, G.C.; FACER, C.A. Hematology of African trypanosomiasis. In: TIZARD, I. (Ed.). **Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p.13-44.

JOSHI P.P., SHEGOKAR V.R., POWAR R.M., HERDER S., KATTI R., SALKAR H.R., DANI V.S., BHARGAVA A., JANNIN J. & TRUC. P. Human trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: The first case report. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.73, n. 3, p. 491- 495, 2005.

LEAL, C.A.M.; SCHETINGER, M.R.; LEAL, D.B.; BAUCHSPIESS, K.;SCHEREKKER, C.M.; MALDONADO, P.A.; MORSCH, V.M.; DA SILVA, J.E. NTPDase and 5' nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.304, p.325-330, 2007.

LEAL, D.; STREHER, C.; NEU, T.; BITTENCOURT, F.; LEAL, C.; SILVA, J.; MORSCH, V.; SCHETINGER, M. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1721, p.9-15, 2005.

LEE, R.G., BITHEL, T., FOERSTER, J., ATHENS, J.W., LUKENS, J.N. WINTROLE. **Hematologia Clínica**. v. I/II. São Paulo: Manole, 1998, p.2623.

LEMOS, K. R. **Resposta imune celular e alterações histopatológicas no sistema nervoso central de eqüinos infectados experimentalmente com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885** (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae). 2003. 85f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

LEVINE, N.D. **Protozoan parasites of Domestic Animals and of Man**. 2nd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973. 406p.

LORENZI, T.F.; AMICO, E.; DANIEL, M. M.; SILVEIRA, P. A. A.; BUCCHERI, V. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3ª ed., Ed. Medsi., Rio de Janeiro, 2003.

LOSOS, G.J.; IKEDE, B.D. Review of pathology of diseases of domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **Veterinary Pathology**, v. 9 (Suppl.), p. 1-71, 1972.

LUCAS, S. Pathology of tropical infections. In: MCGEE, J.O.D.; ISAACSON, P.G.; WRIGHT, N.A. **Oxford textbook of pathology**. New York: Oxford University Press. v. 2b. cap. 29, p. 2187-2265, 1992.

LUCKINS, A.G. et al. Dourine. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press. v.1. cap. 13, p. 297-304, 2004.

LUNKES, G.I.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, V.; MAZZANTI, C.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**. v. 109, p. 189-194, 2003.

MARQUES, L. C.; MACHADO, R. Z.; ALESSI, A. C.; AQUINO, L. P. C. T.; PEREIRA, G. T.. Experimental infection with *Trypanosoma evansi* in horses: clinical and haematological observations. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p. 11-15, 2000.

MAUDLIN I. et al. The Trypanosomiases. Wallingford: CABI Publishing. 2004. 640p.

MONZON, C.M. et al. Estudos hematológicos en cobaios y eqüinos infectados com el *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). **Veterinaria Argentina**, v. 8, p. 668-676, 1991.

NUNES, V.L.B.; OSHIRO, E.T. *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p. 692, 1990.

PEREGRINE, A.S. & MAMMAN, M. Pharmacology of Dimenazene: A Review. **Acta Tropical**, Basel, v. 54, p.185-203, 1993.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225-230, 1996.

PHILIP, K.A.; DASCOMBE, M.J.; FRASER, P.A.; PENTREATH, V.W. Blood-brain barrier damage in experimental African trypanosomiasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 88, p. 607-616, 1994.

QUIÑONES MATEU, M.E.; FINOL, H.J.; TORRES, S.H. Muscular changes in Venezuelan wild horses infected with *Trypanosoma evansi*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 110, n. 1, p. 79-89, 1994.

RADOSTITS, O.M. et al. Doenças causadas pelos protozoários. In:____. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002b. p. 1156-1202.

RAMASAMY, I. Inherited bleeding disorders: disorders of platelet adhesion and aggregation. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, p. 1-35, 2004.

RATHBONE, M.; MIDDLEMISS, P.; GYSBERS, J.; ANDREW, C.; HERMANN, M.; REED, J.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; CACIAGLI F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p.663-690, 1999.

RODRIGUES, A.; FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P.; BARROS, C. S. L. Outbreaks of trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. **Pesq Vet Bras.** v.25, p. 239-249, 2005.

ROZALSKI, M.; NOCUN, M.; WATALA, C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets – potencial new targets for antiplatelet therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, p 411-415, 2005.

DE LA RUE, M., SILVA, R.A.M.S., CARLI, G.A.. Leucocyte and reticulocytes counts in acute infection of dogs with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 42, p. 163-166, 2000.

SARKIS, J.; BATTASTINI, A.; OLIVEIRA, E.; FRASSETO, S.; DIAS, F. ATP diphosphohydrolases: and overview. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 43, p. 131-136, 1995.

SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; BONAN, C.D.; WYSE, A.T.S. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. **Bio Factors**, v. 31, p. 77-98, 2008.

SEILER, R.J.; OMAR, S.; JACKSON, A.R.B. Meningoencephalitis in naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection (Surra) of horses. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 1, p. 120- 122, 1981.

SHI, J.; KUKAR, T.; WANG, C.; LI, Q.; CRUZ P. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.17471-17478, 2001.pp

SILVA, R. A. M. S.; AROSEMENA, N. A. E.; HERRERA, H. M.; SAHIB, C. A.; FERREIRA, M. S. J. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 60, p. 167-171, 1995.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 141 p.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1355, p. 131-140, 1997.

SUDARTO, M.W.; TABEL, H.; HAINES, D.M. Immunohistochemical demonstration of *Trypanosoma evansi* in tissues of experimentally infected rats and a naturally infected water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 2, p. 162-167, 1990.

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

TUNTASUVAN, D.; LUCKINS, A.G. Status of Surra in Thailand. **Journal of the Tropical Medicine and Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 1-8, 1998.

TUNTASUVAN, D. et al. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 227-233, 2003.

URQUHART, G.M. et al. Veterinary protozoology. In:____. **Veterinary Parasitology**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 1996. p. 207-255.

WANG, T., GUIDOTTI, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. **Brain Research**. v. 790, p. 318-322, 1998.

ZANETTE R.A.; DA SILVA A.S.; COSTA M.M.; MONTEIRO S.G.; SANTURIO J.M.; LOPES S.T.A. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em eqüinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n.5, p. 1468-1471, 2008.

ZIGANSHIN, A.; HOYLE, C.; BURNSTOCK, G. Ecto-Enzymes and metabolism of extracellular ATP. **Drug Development Research**, v. 32, p. 134-146, 1994.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 49, p. 589–618, 1996.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structure, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 231-236, 1999.

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