

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

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA DAS ECTONUCLEOTIDASES EM RATOS
INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi* ATRAVÉS DO USO DE
CURCUMINA COMO PRÉ-TRATAMENTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANDREIA BUGNOTTO PEREIRA

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA DAS ECTONUCLEOTIDASES EM RATOS
INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi* ATRAVÉS DO USO DE
CURCUMINA COMO PRÉ-TRATAMENTO**

Andreia Bugnotto Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária: Patologia Clínica**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinthia Melazzo de Andrade

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**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

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA DAS ECTONUCLEOTIDASES EM RATOS
INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi* ATRAVÉS DO USO DE
CURCUMINA COMO PRÉ-TRATAMENTO**

elaborada por
Andréia Bugnotto Pereira

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

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Prof. Dr. Jessié Martins Gutierrez (UFSM)

Prof^a. Dr^a Rosélia Maria Spanevello (UFPel)

Santa Maria, 8 de setembro de 2014.

Como já dizia Camelo: “É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”. Hoje, vivo uma realidade que parece um sonho, mas foi preciso muito esforço, determinação, paciência e perseverança para chegar até aqui, mesmo sabendo que ainda não cheguei ao fim da estrada, mas há ainda uma longa jornada pela frente. Eu jamais chegaria até aqui sozinha. Minha terna gratidão a todos aqueles que colaboraram para que este sonho pudesse ser concretizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus queridos pais Aroldo e Aleise não só por terem me dado a vida, mas por toda a educação, sei que muitas vezes abriram mão dos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus, não tenho palavras para agradecer o amor, o carinho, a compreensão e as orações de vocês.

Ao meu mestre de vida Sr. Daisaku Ikeda por sempre ter me dado força, coragem e determinação para trilhar meu caminho para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu esposo Altair, obrigada por tudo que já tem feito por mim, por ser esta pessoa especial e essencial, por estar sempre ao meu lado me apoiando em todos os momentos.

As minhas irmãs Anelise e Adriane, obrigada pela força e carinho.

A todos meus filhos de 4 patas que ainda estão ao meu lado, ou que já partiram, saibam que o amor de vocês foi meu primeiro grande impulso para tornar-me Médica Veterinária, e seguir com meus estudos...especialmente você minha July.

A família Bugnotto e Soka Gakkai, o apoio, o incentivo e a fé de vocês foram essenciais, em especial minha prima “louca” Janaína pelo bom humor e companhia diária, e minha tia Lenir pelos telefonemas e orações.

A minha orientadora Cinthia Melazzo e Co-orientadora Patrícia Wolkmer, muito obrigada pelo apoio, contribuição e ensinamentos neste trabalho. Com certeza levo grandes aprendizados de nossa convivência.

Aos meus queridos colegas de laboratório Andressa, Jessié, e Fabiano obrigada pelo companheirismo e amizade, e pelo grande auxílio na realização deste trabalho.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, fica expresso aqui a minha gratidão. À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa e aos professores da Pós-Graduação em Medicina Veterinária desta instituição, a equipe LacVet pelo acolhimento e apoio durante estes dois anos, ao LAPAVET

pela contribuição neste experimento, enfim...a todos pela oportunidade de realização de mais uma etapa na minha formação.

A CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro.

Aos professores Sônia T. Lopes, Roselia Spanevello, Aleksandro Schaefer, e Jessié Gutierres obrigada por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

“Seria maravilhoso não ter que encontrar dificuldades, no entanto da mesma forma que os exames estimulam os estudos de uma pessoa, sem as dificuldades não pode haver progresso ou desenvolvimento. Não agir pelo bem é o mesmo que corresponder ao mal. Não avançar é o mesmo que retroceder. Fugir perante a luta é o mesmo que abandonar a fé. Enquanto mantiverem a esperança, enquanto empreenderem ações corajosas para lutar, podem estar certos de que a primavera irá chegar novamente”

Daisaku Ikeda

Resumo

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

MODULAÇÃO DA RESPOSTA DAS ECTONUCLEOTIDASES EM RATOS INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi* ATRAVÉS DO USO DE CURCUMINA COMO PRÉ-TRATAMENTO

AUTORA: Andréia Bugnotto Pereira
ORIENTADORA: Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade
Data e Local: Santa Maria, 8 de setembro de 2014.

O *Trypanosoma evansi* é um protozoário o qual infecta uma grande diversidade de hospedeiros mamíferos levando ao desenvolvimento da tripanossomíase. Diversos trabalhos têm investigado as alterações enzimáticas em linfócitos, importantes células envolvidas com respostas imunológicas, as quais são importantes para a compreensão do mecanismo patológico da tripanossomíase em animais. Dentre elas se destacam as NTPDases, enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares de adenina. A curcumina (Cur) tem sido relacionada com diversos efeitos benéficos associados ao seu uso em animais experimentalmente infectados com o *T. evansi*, uma vez que este composto apresenta dentre suas propriedades efeitos antiinflamatórios e antiparasitários. Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade das enzimas do sistema purinérgico nos linfócitos de ratos, suplementados ou não com curcumina 30 dias antes da infecção por *Trypanosoma evansi*. Trinta e dois ratos Wistar adultos foram distribuídos em grupos controle não infectado (C), recebeu solução fisiológica via intraperitoneal (IP), o grupo controle infectado (CI) recebeu pela mesma via 0,2ml de sangue com 1×10^6 parasitas e tratamento com óleo de milho. O grupo pré-infecção 20 (Prel20) recebeu 20mg/kg de curcumina e o grupo pré-infecção 60 (Prel60) recebeu 60mg/kg de curcumina por 30 dias prévios à inoculação com *T. evansi*. Após a inoculação, os 3 grupos tratados continuaram a receber a curcumina diariamente no período de 15 dias até a eutanásia. A atividade da NTPDase tanto para a hidrólise do ATP quanto do ADP

aumentou significativamente no grupo CI quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). A atividade da ADA diminuiu significativamente no grupo CI em relação ao controle ($P < 0,05$). A utilização da Curcumina nas doses de 20 e 60mg/Kg por 30 dias prévios a infecção com o *T. evansi* reduziu significativamente a atividade da NTPDase e aumentou significativamente a atividade da ADA nos grupos tratados ($P < 0,05$). Os resultados deste trabalho reforçam a evidencia que o uso da curcumina previamente a infecção por *T. evansi* induz efeitos imunomodulatórios, pois mantém a atividade da NTPDase nos linfócitos reduzida, e mantém alta a atividade da ADA, favorecendo a resposta contra o parasita. Desta forma, sugere-se que a curcumina possa ser utilizada como suplemento alimentar para animais em áreas onde a tripanosomose é endêmica.

Palavras-chave: Tripanossomíase, sistema purinérgico, ADA, NTPDase.

ABSTRACT

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

RESPONSE OF ECTONUCLEOTIDASES MODULATION OF RATS INFECTED WITH *Trypanosoma evansi* THROUGH THE USE OF PRE-TREATMENT WITH CURCUMIN

AUTHOR: Andreia Pereira Bugnotto
GUIDANCE: Dr. Cinthia Melazzo de Andrade
Date and Location: Santa Maria, 8 September 2014.

Trypanosoma evansi is a protozoan parasite which infects a wide variety of mammalian hosts leading to the development of trypanosomiasis. Several papers have investigated the enzymatic changes in lymphocytes, important cells involved in immune responses, which are important for understanding the pathological mechanism of trypanosomiasis in animals. Among them we highlight the ectoATPases, enzymes that hydrolyze extracellular nucleotides and nucleosides of adenine. The curcumin (cur) has been associated with several beneficial effects associated with its use in animals experimentally infected with *T. evansi*, since this compound exhibits its properties among inflammatory and anti-parasitic effects. This study aimed to evaluate the activity of enzymes of the purinergic system in lymphocytes of rats supplemented or not with curcumin 30 days before infection with *Trypanosoma evansi*. Thirty-two adult male Wistar rats were divided into four groups. The uninfected control group (C) received saline intraperitoneally (IP), the infected control group (CI) received by the same route 0.2 ml of blood with 1×10^6 parasites and treatment with corn oil. The group pre-infection 20 (Prel20) received 20mg/kg curcumin and pre-infection group 60 (Prel60) received 60mg/kg of curcumin for 30 days prior to inoculation with *T. evansi*. After inoculation, the 03 treated groups continued to receive daily curcumin within 15 days before euthanasia. The NTPDase activity for both the hydrolysis of ATP to ADP increased significantly in the infected control group compared to the control group ($P < 0.05$). The ADA activity

decreased significantly in the infected control group compared to the control ($P < .05$). The use of curcumin at doses of 20 and 60 mg / kg for 30 days prior to infection with *T.evansi* reduced significantly NTPDase activity and increased significantly ADA activity in the treated groups ($P < 0.05$). The results of this study support the evidence that the use of curcumin prior infection with *T. evansi* induces immunomodulatory effects, since they maintain the NTPDase activity reduced in lymphocytes, and maintains high ADA activity, favoring the response against the parasite. Thus, it is suggested that curcumin can be used as a food supplement for animals in areas where trypanosomosis is endemic.

Keywords: trypanosomiasis, purinergic system, ADA, NTPDase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Formas tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos infectados experimentalmente 17
- Figura 2 – Esquema representativo do *Trypanosoma evansi*. O flagelo da direita representa as cepas brasileiras 17
- Figura 3: Transmissão e multiplicação (fissão binária) do *T. evansi* 18
- Figura 4 - Enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina 21
- Figura 5: Rizomas da *Curcuma longa L.*, e o pó amarelo extraído da planta..... 25
- Figura 6 - Representação gráfica dos três compostos corantes da cúrcuma: I) curcumina, 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona; II) demethoxicurcumina, 1-(4-hidroxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona; III) bisdemethoxi-curcumina, 1,7-bis(4-hidroxifenil) hepta-1,6-dien-3,5-diona..... 27

MANUSCRITO

- Figure 1 – Effect of oral curcumin pre-treatment for 30 days in the NTPDase (ATP) activity in lymphocytes on the parasitemia of *Trypanosoma evansi* infected rats. Curcumin was administered daily by oral gavage. All rats were infected by *T. evansi* at same day. The treatment of the groups continued until the day of euthanasia (15 days after inoculation). (C) control group - non-infected; (IC) *T. evansi* infected control group; (Prel20) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 20 mg/kg body weight for 30 days; (Prel60) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 60 mg/kg body weight for 30 days; Values represent mean \pm SEM (n = 5-8 per group);..... 47

Figure 2 -Effect of pre-treatment for 30 days with curcumin in the NTPDase (ADP) activity in lymphocytes from rats infected with *Trypanosoma evansi* (C) control group - non-infected; (IC) *T. evansi* infected control group; (Prel20) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 20 mg/kg body weight for 30 days; (Prel60) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 60 mg/kg body weight for 30 days. Values represent mean \pm SEM, ++ represents statistical difference between C and IC groups ($P < 0.001$); * represents statistical difference between IC and groups that 48

Figure 3 -Effect of pre-treatment for 30 days with curcumin in the ADA activity in lymphocytes from rats infected with *Trypanosoma evansi* (C) control group - non-infected; (IC) *T. evansi* infected control group; (Prel20) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 20 mg/kg body weight for 30 days; (Prel60) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 60 mg/kg body weight for 30 days. Values represent mean \pm SEM, ++ represents statistical difference between C and IC groups ($P < 0.001$); * represents statistical difference between IC and groups that receive curcumin ($P < 0.05$, $n = 5-8$ per group)..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrometro
ADP	Adenosina difosfato
AP	Área postrema
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHE	Barreira hemato-encefálica
Ca^{+2}	Cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
H^{+}	Hidrogênio
HMGB1	Proteína do tipo <i>high mobility group box 1</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
Ig	Imunoglobulina
K^{+}	Potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
mRNA	RNA mensageiro
Na^{+}	Sódio
NK	<i>Natural killer</i>
Pi	Pós infecção
PGE2	Prostaglandina E2
SNC	Sistema nervoso central
<i>T.</i>	<i>Trypanosoma</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VSG	Glicoproteína variável de superfície

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	29
2.1 Geral.....	179
2.2 Específicos.....	179
3 MANUSCRITO	30
Curcumin pre-treatment capacity to modulate the ectonucleotidases in rats infected with <i>Trypanosoma evansi</i>	30
ABSTRACT	31
1. INTRODUCTION	32
2. MATERIALS AND METHODS	33
2.1. Reagents.....	33
2.2 Animals.....	33
2.3. Experimental design and curcumin treatment.....	34
2.4. Etiological agent and inoculation.....	34
2.5. Parasitemia estimation.....	34
2.6. Collection and preparation of blood samples.....	34
2.7. NTPDase determination.....	35
2.8. ADA Activity in Lymphocytes.....	35
2.9. Statistical analysis.....	36
3. RESULTS	377
3.1 Parasitemia.....	377
3.2 NTPDase activity.....	377
3.3 Adenosine deaminase activity.....	377
4. DISCUSSION	377
5. CONCLUSION	40
REFERENCES	41
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Desta forma, as seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representa a íntegra deste estudo.

Ao término do manuscrito serão encontradas as conclusões obtidas através do referido estudo, assim como o referencial teórico utilizado para a elaboração da introdução deste estudo.

1. INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) é um protozoário da seção salivaria altamente patogênico para pessoas e animais domésticos. É o agente etiológico da doença tripanossomíase também conhecido como “Mal das Cadeiras” ou “Surra” em equinos (SILVA et al., 2002). Apresenta ampla distribuição geográfica parasitando animais domésticos, silvestres, pequenos roedores (SILVA et al., 2002) e humanos (JOSHI et al., 2005). 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).

Este protozoário teve sua origem no continente africano e foi introduzido nas Américas pelos primeiros colonizadores europeus. Desde então, tem causado numerosos surtos em equinos, resultando em morte e elevados prejuízos aos pecuaristas (SILVA et al., 2002). Surtos ou casos isolados de tripanossomíase têm sido relatados, há vários anos, em diversas regiões brasileiras (FRANKE et al., 1994; SILVA et al., 1995; HERRERA et al., 2004). Na região sul do país, onde até 2005 não havia registro de ocorrência desse flagelado, o número de casos tem aumentado gradativamente ano após ano (COLPO et al., 2005; CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007). Sugere-se que o aumento de casos da doença esteja relacionado à presença de animais silvestres, como capivaras, quatis e demais roedores próximos dos animais com sinais clínicos. (ZANETTE et al., 2008).

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

brasileiras são comprovadamente acinetoplásticas. (ZWEYGARTH et al., 1990; VENTURA et al., 2000).

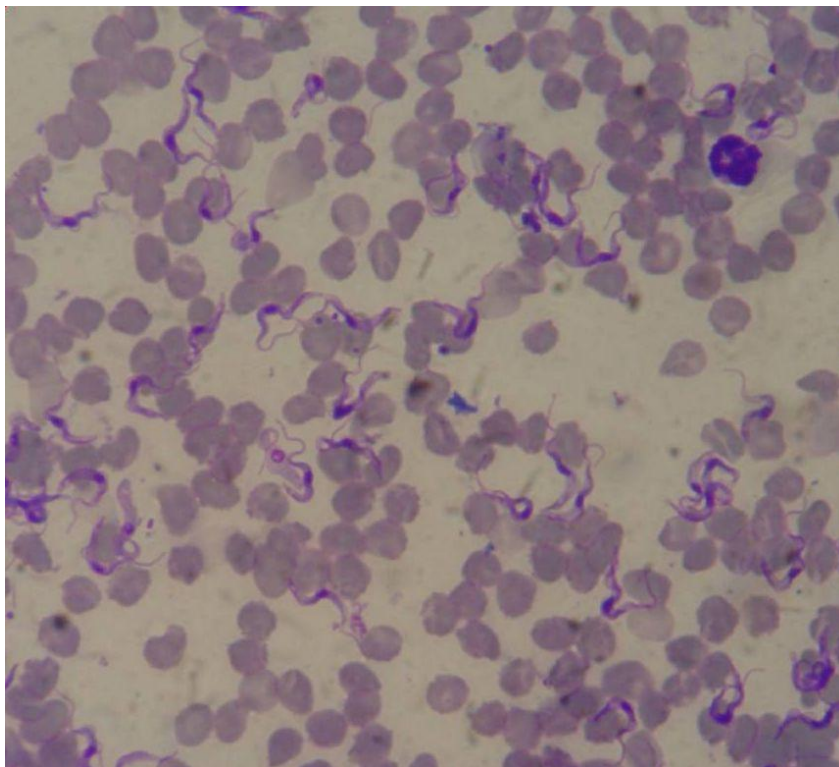


Figura 1 – Formas tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos infectados experimentalmente.

Fonte: PAIM et al., 2011

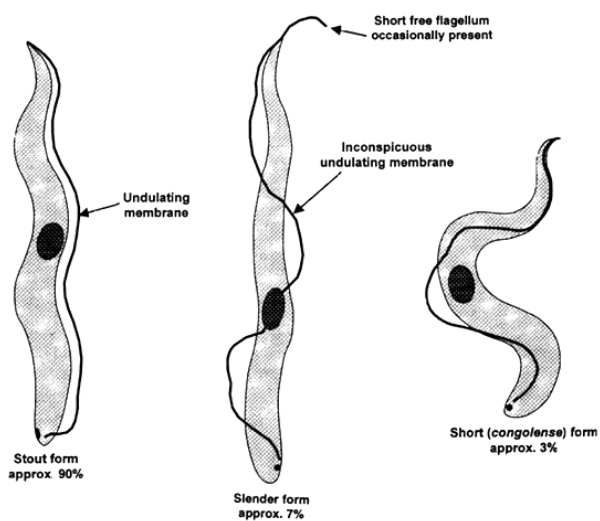


Figura 2 – Esquema representativo do *Trypanosoma evansi*. O flagelo da direita representa as cepas brasileiras.

Fonte: <http://www.fao.org/docrep/006/x0413e/x0413e02.htm>

Os principais vetores transmissores pertencem aos gêneros *Tabanus* sp. (mutucas), porém insetos dos gêneros *Stomoxys* sp, *Haematopota* sp. e *Lyperosia* sp. podem transmitir o parasita (SILVA et al., 2002). Na América Central e do Sul o morcego hematófago *Desmodus rotundus* é considerado um vetor importante, uma vez que também atua como hospedeiro do protozoário. Além disso, carrapatos têm sido sugeridos como vetores na transmissão do *T. evansi* e *T. vivax* (CAMARGO et al., 2004). Isso levanta a possibilidade de um carrapato estar envolvido na transmissão de *T. evansi* de capivaras para equinos. O carrapato-estrela (*Amblyomma cajennense*) parasita capivaras e equinos (FIGUEIREDO et al., 1999)

A via oral pode ser importante na dispersão de infecção de *T. evansi* em cachorros, quatis e capivaras, que podem ser infectados em consequência das brigas frequentes entre animais infectados e não infectados. Além disso, espécies gregárias como coatis e capivaras têm um comportamento agressivo facilitando a transmissão oral do protozoário entre eles, e mantendo a infecção no grupo social, já que a forma crônica da doença causada por *T. evansi* foi identificada em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e quatis (*Nasua nasua*), possíveis reservatórios do agente. Os cães e ruminantes também podem atuar como reservatórios do *T. evansi* quando o curso da doença for crônico (HERRERA et al., 2004).

Os *T. evansi* se reproduzem por fissão binária quando estão no sangue de seu hospedeiro. Esta multiplicação inicia-se no local da picada, na pele, invadindo a corrente sanguínea e o sistema linfático do hospedeiro, levando a picos de febre e induzindo a uma resposta inflamatória (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004).

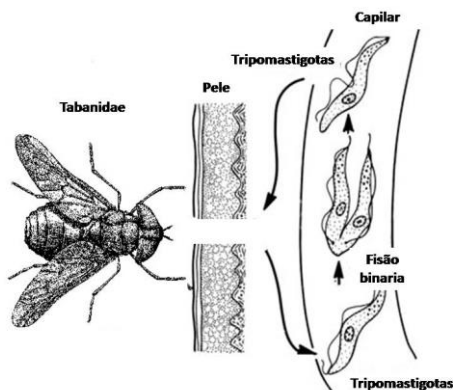


Figura 3: Transmissão e multiplicação (fissão binária) do *T. evansi* (Modificado de GARDINER et al., 1988)

Em infecções naturais e experimentais, observou-se que a tripanossomíase por *T. evansi* pode apresentar-se com um quadro clínico agudo e crônico. Geralmente, a fase aguda da infecção é caracterizada pelo surgimento de febre intermitente, edema subcutâneo, anemia progressiva, cegueira, letargia e alterações hemostáticas. Os animais afetados agudamente podem morrer dentro de semanas ou poucos meses. No entanto, as infecções crônicas podem durar anos (BRUN et al., 1998). Durante a fase crônica, ocorre o agravamento dos sinais clínicos e conseqüentemente observa-se nos animais infectados caquexia, edema, incoordenação motora e paralisia de posterior (BRANDÃO et al., 2002; SILVA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005). Os sinais neurológicos têm sido descritos na fase terminal da doença, principalmente em equinos, bovinos, veados e búfalos infectados naturalmente (TUNTASUVAN et al., 1997; TUNTASUVAN & LUCKINS, 1998; TUNTASUVAN et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005).

Nas infecções aguda, subaguda, ou crônica desencadeadas pela tripanossomíase, os linfócitos possuem um importante papel realizando múltiplas funções na defesa pelo organismo (PAIM et al., 2011). Responsáveis pelo reconhecimento e destruição de antígenos não-próprios, participam de várias funções do sistema imune. São células de defesas pertencentes aos glóbulos brancos perfazendo de 20 a 30% dos leucócitos no sangue. Este número varia muito de acordo com a higidez do paciente (SASSON & SILVA, 1989). A linfopoiese (aumento de seu número na corrente sanguínea) é estimulada por exposição antigênica e deprimida por corticóides, hormônios sexuais e má nutrição. Dentre suas funções incluem a imunidade humoral, imunidade celular, regulação imune, atividade citotóxica e vigilância imune e secreção de linfocinas (JANEWAY et al., 2001).

São produzidos pela medula óssea vermelha, através das células-tronco linfóides que se diferenciam em células pré-búrsicas e pré-timócitos. Os pre-timócitos dão origem aos Linfócitos T que por sua vez vão amadurecer nos tecidos linfoides, já as células pre-búrsicas dão origem aos Linfócitos B. Há ainda uma terceira classe os chamados linfócitos Natural Killer (células NK ou exterminadoras naturais), células linfocíticas granulares com tamanhos maiores. (SASSON & SILVA, 1989).

Os linfócitos T são o principal responsável pela chamada imunidade celular, agindo ora de forma a estimular ou atenuar a produção de anticorpos pelos linfócitos B, ora diretamente sobre os antígenos ou células corporais infectados por esses, destruindo-os através de um complexo mecanismo (CHAN et al., 1988). Dentre os vários tipos que os correspondem destacam-se os linfócitos CD8 ou Citotóxicos os quais destroem as células infectadas através do mecanismo de apoptose, e os linfócitos CD4+ ou Auxiliares, intermediários da resposta imunitária que proliferam após o contato com o antígeno ativando outros tipos celulares. Existem 2 subtipos conhecidos de linfócitos T auxiliares: Th1 e Th2. (SEBASTIÃO et al., 1994).

Os linfócitos B dão origem aos plasmócitos e células B de memória que geram os anticorpos. São os principais responsáveis pela chamada imunidade humoral, que se dá via produção e diluição de anticorpos nos fluidos teciduais ou corporais. São responsáveis pela produção de imunoglobulinas, contra antígenos estranhos, fazendo reconhecimento direto de antígenos, através de proteínas de superfície e marcadores fenotípicos (SASSON & SILVA, 1989)

Dentre os mediadores capazes de modular as ações dos linfócitos destacam-se os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina que fazem parte do sistema purinérgico. Em especial, o ATP extracelular é capaz de regular as interações célula-célula, sendo importante nos processos de ativação, diferenciação, desenvolvimento, proliferação, morte celular e respostas efetoras dos linfócitos (DI VIRGILIO, 2000). Enquanto isso, a adenosina apresenta-se como uma molécula anti-inflamatória (GESSI et al., 2007).

Três componentes principais fazem parte do sistema purinérgico: Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, seus receptores e ectoenzimas responsáveis pela regulação de níveis destas moléculas. Os nucleotídeos de adenina como ATP, ADP e AMP são considerados importantes moléculas sinalizadoras em tecidos (YEGUTKIN, 2008).

O controle dos níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina são realizados por enzimas ancoradas na membrana celular ou meio intersticial (Figura 4). Dentre estas enzimas destacamos as ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), ectonucleotídeo pirofosfatase (E-NPPs), 5'-nucleotidase e adenosina desaminase (ADA) (YEGUTKIN, 2008). Estas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática que tem início com

a ação da E-NTPDase e da E-NPP as quais hidrolisam o ATP e ADP, formando o AMP, que em seguida é hidrolisado pela 5'-nucleotidase formando adenosina. Finalmente, a adenosina é desaminada pela ADA em inosina (YEGUTKIN, 2008).

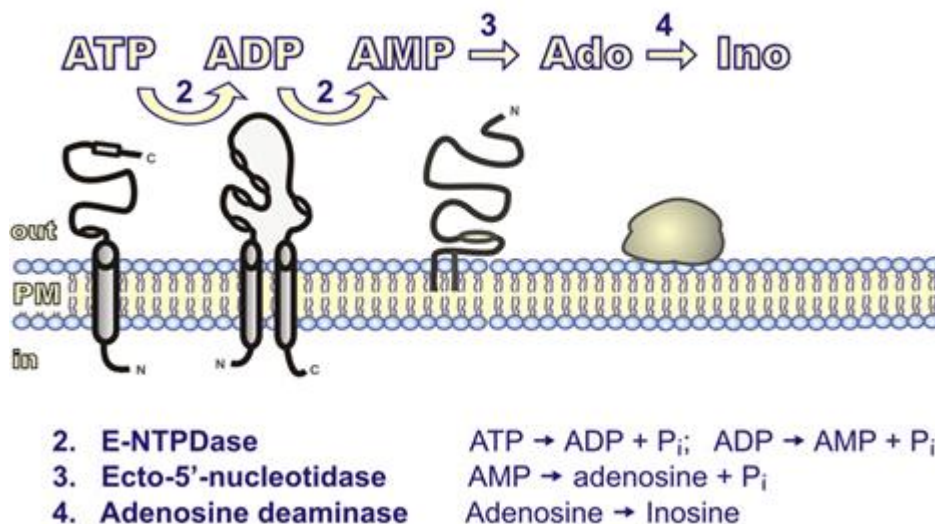


Figura 4 - Enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.

Fonte: YEGUTKIN, 2008.

A adenosina é um importante componente do sistema purinérgico em mamíferos, regulando o metabolismo das células e desencadeando uma série de efeitos fisiológicos que participam na apoptose, necrose e proliferação celular. Em condições patológicas, a adenosina desempenha um papel protetor atuando como um regulador endógeno da imunidade inata e na defesa do hospedeiro de lesões teciduais excessivas associadas à inflamação (RATHBONE et al., 1999; HASKO & CRONSTEIN, 2004; SITKOVSKY & OHTA, 2005; BURNSTOCK et al., 2006; DESROSIERS et al., 2007).

A concentração de adenosina extracelular é regulada pela atividade de um pequeno grupo de enzimas importantes, incluindo a adenosina desaminase (ADA, EC 3.5.4.4), que catalisa a conversão da adenosina em inosina. Altos níveis desta enzima são encontrados no sistema linfóide (linfonodos, baço e timo), podendo também ser encontrada, mas em menor quantidade, nos eritrócitos (CRISTALLI et al., 2001; SABOURY et al., 2003).

A ADA está presente em todos os tipos celulares, mas encontra-se em elevada atividade no timo, tecidos linfoides e linfócitos periféricos. Estudos tem demonstrado que esta enzima desempenha um importante papel na função dos linfócitos e é essencial para o crescimento normal, a diferenciação e proliferação de linfócitos T (FRANCO et al., 1997; CODERO et al., 2001). Ela divide-se em duas isoformas ADA1 e ADA2 e ambas estão amplamente distribuídas nos animais vertebrados. Os tecidos contêm predominantemente ADA1, já a ADA2 é o principal componente do soro e é um suposto estimulador de células-T (FRANCO et al., 1997; BURNSTOCK, 2006).

A localização da ADA1 é principalmente citosólica, sendo encontrada em todo o organismo e também na superfície de macrófagos, linfócitos B e em alguns linfócitos T. Esta pode estar combinada com uma proteína combinante não específica (CD26) (TSUBOI et al., 1995). O complexo ADA-proteína combinante constitui uma ecto-ADA, a qual é responsável pelo controle dos níveis de adenosina extracelulares (SAURA et al., 1996; FRANCO et al., 1997).

A adenosina atua como um sensor para o sistema imune informando sobre alterações na sua circunvizinhança, como nos casos de danos teciduais e até mesmo no desencadeamento de processos inflamatórios agudos (KUMAR & SHARMA 2009). A redução na atividade da ADA em linfócitos levaria a interação da adenosina com receptores purinérgicos que existem em muitos tipos de células, levando a efeitos anti-inflamatórios, entre eles a inibição da resposta imune Th1.

Na infecção aguda causada por *T. cruzi*, há uma predominância de Th1 e resposta celular com produção de interferon- γ (KUMAR & TARLETON, 2001), assim como na infecção por *T. evansi* relatada recentemente (PAIM et al., 2011a). Portanto, a inibição dessa resposta pela ação da adenosina extracelular em receptores purinérgicos poderia atenuar a inflamação e os danos teciduais.

Conjuntamente com as ações da adenosina e a atividade da ADA, tem sido sugerido que a enzima NTPDase1 também desempenhe um importante papel na regulação da função de linfócitos, incluindo reconhecimento do antígeno e/ou ativação de atividades efetoras das células T-citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990).

A participação dessa enzima no curso de doenças envolvendo vários tecidos e tipos celulares tem sido amplamente discutido. (SCHETINGER et al., 2007).

A NTPDase1 é pertencente à família das NTPDases. Oito membros desta família (NTPDase1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) já foram identificados e diferem quanto a especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 2001; BIGONNESSE et al., 2004).

A família das NTPDases estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido bem caracterizadas 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).

A classificação dos antígenos ou marcadores de superfície celular, permite a identificação das células do sistema imune, seus tipos de resposta e funções efetoras. Estes antígenos recebem a designação CD (*cluster differentiation*). Estas moléculas têm funções como promover interações e adesão célula-célula e traduzir sinais que levem à ativação de linfócitos (ABBAS et al., 2002).

Entre os CDs presentes nos linfócitos podemos encontrar o CD39 (membro da família das E-NTPDases, especificamente NTPDase 1), envolvido no metabolismo de nucleotídeos extracelulares e originalmente identificado como um marcador da ativação linfoide expresso em linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, células NK e células endoteliais, tendo sido também reconhecido em plaquetas e megacariócitos (KANSAS et al., 1991; DOMBROWSKI et al., 1998; KOZIACK et al., 1999; COPPOLA et al., 2005).

Como dito anteriormente as enzimas NTPDases hidrolisam o ATP até AMP. O ATP extracelular é capaz de regular várias ações nas interações celulares, mais especificamente nos linfócitos, e muitas dessas funções biológicas têm sido demonstradas, em particular de interesse para este estudo, a regulação da inflamação. Para executar esta função, o ATP liberado interage com receptores P2X7, induzindo a liberação de citocinas. Um exemplo disto é que a estimulação do ATP de linfócitos e endotélio tem sido associada à indução de respostas em grande parte pró-inflamatórias, tais como a liberação de interleucina

(IL) -1 (ou IL-8) (IMAI et al., 2000; IA SALA et al., 2003) que pode contribuir para os efeitos da infecção por tripanossomas.

Os principais componentes da resposta imune à infecção por *T. evansi* em camundongos foram estudados por BARAL et al. (2007) e PAIM et al. (2011). Segundo os autores, citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF), que é também importante na infecção de outros tripanossomatídeos, não influencia na parasitemia ou tempo de sobrevivência dos animais. Outra citocina importante nos processos inflamatórios, o interferon-gama (IFN- γ), também não influenciou na parasitemia e no tempo de sobrevivência.

Porém, durante a infecção, os autores sugeriram que outras citocinas pró inflamatórias são ativadas, tais como a interleucina 1 e 6 as quais possuem importantes funções na regulação dos processos de replicação do parasito e nas respostas imunes em animais infectados. BARAL et al. (2007) concluíram que o óxido nítrico, produzido pelo hospedeiro mediante a ação de IFN- γ tem efeito supressivo nas células T do hospedeiro, mas esse efeito não influencia na parasitemia e tempo de sobrevivência dos camundongos.

Embora existam vários trabalhos que descrevam a tripanossomíase em eqüinos no Brasil (FRANKE et al., 1994; SILVA et al., 1995; DÁVILA et al., 1999; DÁVILA & SILVA 2000; SEIDL et al., 2001; SILVA et al. 2002), inclusive com a reprodução experimental da doença em ratos (MARQUES et al., 2000; LEMOS et al., 2003), há ainda lacunas na epidemiologia, na patogenia e no tratamento da tripanossomíase em eqüinos no país, em particular a resposta do sistema imune que foi o foco deste trabalho.

O aceturato de diminazeno é o produto mais comumente usado no controle da tripanossomíase dos animais domésticos, pois apresenta maior índice terapêutico que as outras drogas na maioria das espécies domésticas. Tem atividade contra tripanossomas que são resistentes a outros medicamentos e apresenta baixa incidência de resistência, porém possui vários efeitos colaterais, entre eles diversos graus de toxicidade nervosa, hepática e renal (PEREGRINE & MAMMAM, 1993). Outro produto de eficácia curativa para *T. evansi* é o suramin, fármaco este utilizado no humano infectado com o parasito (JOSHI et al., 2006).

No entanto, este fármaco tem uma limitação para animais devido ao elevado custo do tratamento.

Em virtude disso, tratamentos alternativos contra a tripanossomíase têm sido investigados de forma a minimizar estes efeitos indesejáveis. O estudo utilizando compostos naturais tem sido amplamente investigado em uma variedade de doenças devido as suas características benéficas como baixo custo e menos efeitos colaterais (ZHOU et al., 2004, LIAO & SHEN 2010). Dentre estes compostos destaca-se a cúrcuma que há séculos tem sido amplamente utilizado na medicina indígena e tem mostrado uma variedade de atividades fisiológicas e farmacológicas (MAHESHWARI et al., 2006; JAQUES et al., 2012)

A curcumina ou diferuloilmetano é o princípio ativo da cúrcuma (*Curcuma longa L.*), conhecida no mercado internacional por turmeric é originária do sudeste asiático, considerada uma preciosa especiaria, tem sua importância econômica devido às peculiaridades de seus rizomas. É uma espécie herbácea e perene da família botânica Zingiberaceae conhecida por diversos nomes populares, dentre eles: açafrão, gengibre amarelo, dentre outros (FILHO et al., 2000). Além de sua principal utilização como condimento, possui substâncias antioxidantes, antimicrobianas, antiparasitárias e corantes que lhe conferem possibilidade de emprego nas áreas de cosméticos, têxtil, medicinal e alimentício (FILHO et al., 2000).



Figura 5: Rizomas da *Curcuma longa L.*, e o pó amarelo extraído da planta.

Fonte: <http://www.pharmaciaessentia.com.br>

O primeiro trabalho da literatura que relaciona a atividade da curcumina contra tripanossomatídeos foi estudada em promastigotas (extracelular) e formas

amastigotas (intracelulares) de *Leishmania amazonensis*. Os autores mostraram em experiências in vitro que tanto a curcumina quanto seus derivados semi-sintéticos possuem uma excelente atividade contra formas promastigotas. Os testes foram realizados in vivo em ratos e mostraram uma atividade de 65,5% de inibição do tamanho da lesão em uma das patas traseira dos animais, quando comparado com o grupo inoculado com os parasitas sem a intervenção da curcumina (ARAÚJO et al., 1998, 1999).

Outro interessante ponto mencionado pelos autores é que eles não observaram qualquer reação inflamatória na área onde as drogas foram injetadas, de acordo com os autores, porque os curcuminóides são potentes inibidores da inflamação. RASMUSSEN et al. (2000) relataram a eficácia de um extrato etanólico de *C. longa* contra *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major*, o qual foi capaz de inibir o crescimento in vitro destes parasitas.

Segundo estudo recente (CHANGTAM et al., 2010) foi investigado a atividade antiparasitária de análogos curcuminóides contra formas de protozoários tripanosoma e espécies de leishmania, e o resultado contribuiu particularmente para mostrar uma alta atividade tripanocida contra todas as espécies de trypanosoma em relação a atividade leishmanicida. O que reforçou a ideia do nosso grupo de trabalho optar pela curcumina como fonte de terapia alternativa antiparasitária.

A curcumina e seus óleos essenciais apresentam-se em concentrações variáveis de 2,5 a 5,0% (GOVINDARAJAN et al., 1980), constituídos, segundo trabalhos relacionados por MARTINS & RUSIG (1992), de um composto principal, a turmerona (cerca de 59%), d-hidroturmerona e de um percentual menor de cetonas aromáticas: zingibereno (25%), d-a-felandrena (1%), d-sabineno (0,6%), cineol (1%) e borneol (0,5%). ZWAVING & BOS (1992) relatam a presença de outros compostos: b-cariofileno (0,2%), b-farneseno (0,2%), ar-curcumeno (1,4%), b-curcumeno (2,5%), b-sesquifelandreno (2,4%), b- bisabolol (0,3%), ar-turmerol (0,9%), curcufenol (0,6%), a-atlantona e traços (<0,5%) de a- felandrena, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, canfor, b-elemeno e germacrona.

Os mesmos autores verificaram que a curcumina está presente nos rizomas em concentração que varia de 2,8 a 8% (GOVINDARAJAN et al., 1980). Conforme GOVINDARAJAN (1980) e TAKAHASHI (1987), denomina-se curcumina ao conjunto dos três compostos apresentados na figura 6.

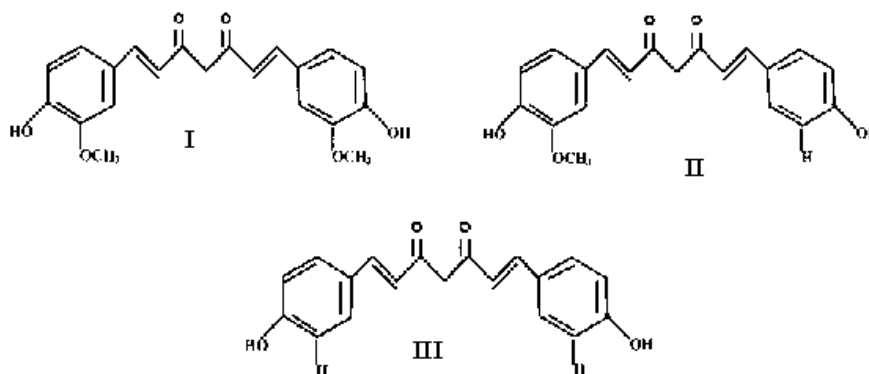


Figura 6 - Representação gráfica dos três compostos corantes da cúrcuma: I) curcumina, 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona; II) demethoxycurcumina, 1-(4-hidroxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona; III) bisdemethoxycurcumina, 1,7-bis(4-hidroxifenil) hepta-1,6-dien-3,5-diona.

Fonte: GOVINDARAJAN & WILLIAM, 1980.

Dessa maneira a curcumina tem demonstrado apresentar diversas propriedades. Sabe-se que a mesma se liga a uma variedade de proteínas e inibe a atividade de diversas quinases, modulando a ação de diversos fatores de transcrição, regulando a expressão de diversos fatores inflamatórios, citocinas e moléculas de adesão (AGGARWAL et al., 2010).

Uma das propriedades mais bem estudadas da curcumina é a sua característica anti-inflamatória, a qual tem sido descrita em uma ampla variedade de doenças como a retinopatia diabética (KOWLURU & KANWAR, 2007), obesidade induzida pela inflamação (AGGARWAL, 2010), infecção pelo *Helicobacter pylori* (KOOSIRIRAT et al., 2010), fibrose e inflamação hepática induzida por compostos químicos (WU et al., 2010), dentre outras.

WOLKMER et al., 2012 demonstraram que o pré-tratamento com curcumina é capaz de modular o sistema imunológico de animais infectados por *T. evansi*, através da quantificação da indução e liberação de citocinas pró e antiinflamatórias. Na tripanossomíase os linfócitos produzem IFN- γ em resposta aos antígenos do parasita, o IFN- γ ativa os macrófagos aumentando sua capacidade em destruir organismos fagocitados. Os macrófagos ativados induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , desempenhando assim um importante papel no processo de replicação do parasita, e na resposta imune do hospedeiro (TRUYENS et al., 1994; GAO & PEREIRA, 2002; PAIM et al., 20011). A ação anti-inflamatória da curcumina deve-

se aos grupos fenólicos presentes em sua molécula, o que resulta em inibição das prostaglandinas e leucotrienos (ARAUJO & LEON, 2001).

Algumas pesquisas têm mostrado que ratos são altamente suscetíveis à tripanosomíase, mostrando alterações bioquímicas, hematológicas e patológicas associadas a sinais clínicos como ataxia, tremores e coma terminal em animais não tratados (MENEZES et al., 2004; WOLKMER et al., 2009). Em um estudo recente, nosso grupo de pesquisa concluiu que ratos são um ótimo modelo experimental para estudar *T. evansi*, pois foi observado que os ratos infectados agudamente e cronicamente podem manifestar sinais neurológicos e problemas locomotores como paralisia de membros pélvicos com lesões histológicas semelhantes aos equinos, principais animais afetados naturalmente. A patogenia das alterações clínicas não está completamente esclarecida e como o sistema purinérgico é responsável por várias funções vitais dos mamíferos consideramos oportuno investigar esse sistema na infecção por *T. evansi* em ratos.

Neste contexto, tendo em vista os vários benefícios associados ao uso da curcumina, torna-se relevante investigar os efeitos do pré-tratamento com este composto sobre a atividade das ectoenzimas do sistema purinérgico em linfócitos, a fim de contribuir para a busca de novas terapias que possam beneficiar pacientes com esta enfermidade parasitária. Além disso, a região Sul carece de pesquisas relacionadas à tripanossomíase, e estudos através de técnicas mais sensíveis, são necessários, com a finalidade de determinar a abrangência desta doença e atenuar os prejuízos econômicos causados principalmente aos pecuaristas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade das enzimas do sistema purinérgico nos linfócitos de ratos, suplementados ou não com curcumina 30 dias antes da infecção por *Trypanosoma evansi*, e 15 dias pós-infecção, através da atividade das enzimas nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) e da adenosina desaminase.

2.2 Específicos

- Determinar a atividade da NTPDase em linfócitos de ratos, suplementados ou não com curcumina 30 dias antes da infecção por *Trypanosoma evansi*, e 15 dias pós-infecção.
- Avaliar a atividade da adenosina desaminase em linfócitos de ratos, suplementados ou não com curcumina 30 dias antes da infecção por *Trypanosoma evansi*, e 15 dias pós-infecção.

3. MANUSCRITO

Curcumin pre-treatment capacity to modulate the ectonucleotidases in rats infected with *Trypanosoma evansi*

Andreia Bugnotto Pereira^a; Patrícia Wolkmer^b; Mauren P. Emanuelli^a; Cássia B. da Silva^a; Francine C. Paim^a; Heloisa E. Palma^a; Sonia T. A. Lopes^a; Andressa Bueno^a; Silvia G. Monteiro^c Cinthia M. Andrade^{a*}

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

Adress: Faixa de Camobi – Km 9, Avenida Roraima n° 1000, Campus Universitário, Hospital Veterinário, Sala 103, 97105-900, Santa Maria- RS, Brasil.
Fax: +55 55 3220 8958.

^b Laboratory of Animal Reproduction, Universidade de Cruz Alta, Brazil.

Adress: Campus Universitário Dr. Ulysses Guimarães – Rodovia Municipal Jacob Della Méa, Km 5.6 – Parada Benito , 98.020-290, Cruz Alta – RS, Brasil. Fax: +55 55 33211500.

^c Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil. Adress: Faixa de Camobi – Km 9, Avenida Roraima n°100, Campus Universitário, Prédio 20, sala 4220, Santa Maria – RS, Brasil. Fax: +55 55 3020 8242.

* Correspondence and reprints. Address: Departamento de Pequenos Animais da UFSM. Santa Maria – RS, Brasil. Fax: +55 553220 8958.

E-mail address: cmelazzoandrade1@gmail.com, bugnottovet@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to investigate the activities of the enzymes nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) and adenosine deaminase (ADA) in lymphocytes from rats supplemented or not with curcumin 30 days prior to experimental infection with *Trypanosoma evansi*. Thirty-two adult male Wistar rats were divided into four groups. The uninfected control group (C) received saline intraperitoneally (IP), the infected control group (IC) received by the same via 0.2 ml of blood with 1×10^6 parasites and treatment with corn oil. The pre-infection group 20 (Prel20) received 20mg/kg curcumin and pre-infection group 60 (Prel60) received 60mg/kg of curcumin for 30 days before *T. evansi* inoculation with. After inoculation the groups continued treatment until euthanasia (15 days). The NTPDase activity for both hydrolysis of ATP and ADP increased significantly in the IC group compared to the C group ($P < 0.05$). The ADA activity decreased significantly in the IC group compared to the C group ($P < 0.05$). The use of curcumin at doses of 20 and 60 mg / kg for 30 days before *T. evansi* infection reduced significantly NTPDase activity and increased significantly ADA activity in the curcumin treated groups ($P < 0.05$). The results of this study support the evidence that the use of curcumin before *T. evansi* infection induced immunomodulatory effects, since they maintain the NTPDase activity reduced in lymphocytes, and maintains high ADA activity, favoring the response against the parasite. Thus, it is suggested that curcumin can be used as a food supplement for animals in areas where trypanosomiasis is endemic.

Key words: Trypanosomiasis, purinergic system, ADA, NTPDase.

1. INTRODUCTION

Trypanosoma evansi is a protozoan belonged to the Salivarian group that infects a variety of mammals causing trypanosomiasis. In horses it causes the disease secularly know as “Mal de Cadeiras” or “Surra” (POURJAFAR et al., 2012). The disease was first described in horses and camels from India, in 1881 by Griffith Evans (MAHMOUD e GRAY, 1980), and ever since has been described in tropical and subtropical regions of the world (DARGANTES et al., 2009; MEKATA et al., 2009; PERRONE et al., 2009; SILVA-ITURRIZA et al., 2013). In infected hosts *T. evansi* can be found in tissues, blood and body cavities fluid, inducing an immune response (SHARMA et al., 2000; PAIM et al., 2011).

The enzymatic (AChE, NTPDase) changes related to immune response have been investigated by others (DA SILVA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; WOLKMER et al., 2012), and it is a key point to understand the pathogenicity of the trypanosomiasis in animals. As part of these important enzymes, can indicate the adenine nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes. The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDase) dephosphorylate the nucleotide ATP via ADP to AMP, whereas adenosine deaminase (ADA) catalyzes the conversion of adenosine to inosine (YEGUTKIN, 2008).

These enzymes are extensively present in blood cells influencing several events such as platelet aggregation, inflammation and immune response (ZIMMERMANN, 2001). The lymphocytes, cells of the immune system, are responsible for recognition and destruction of invading antigens. The number of lymphocytes can be affected by antigenic stimuli, or benign and malignant cellular proliferation (DI VIRGILIO, 2000). Adenine-nucleotide and –nucleoside modulate the lymphocytes function, mainly the extracellular ATP that regulates cell-cell interaction, important in activation processes, differentiation, development, proliferation, cell death and lymphocytes function (DI VIRGILIO, 2000). The adenosine is an anti-inflammatory molecule (GESSI et al., 2007).

WOLKMER et al. (2012) showed that the pre-treatment with curcumin modulates the immune response in rats infected with *T. evansi*. They determined the levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. During the disease, lymphocytes release interferon-gamma (IFN- γ) in response to parasite antigens,

IFN- γ activates macrophages increasing their phagocytic capacity. Activated macrophages induce proinflammatory cytokines production, such as IL-1, IL-6 and TNF- α , participating in parasite replication and host immune response (PAIM et al., 2011; GAO & PEREIRA, 2002; TRUYENS et al., 1994). The anti-inflammatory property of curcumin is due to the phenols group incorporate in its molecule, which inhibit prostaglandins and leukotrienes (ARAUJO & LEON, 2001). Curcumin is a substance present in food spices such as curry and Indian saffron (GOEL et al., 2008).

Considering the immune-modulatory function of curcumin, and its role in the immune system during *T. evansi* infection, we aimed to determine, *in vivo*, the effect of pre-treatment with different doses of curcumin in NTPDase and ADA enzymatic activity in rat lymphocytes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

Adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), and Cur (curcumin > 80%; curcuminoid content > 94%) were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of highest purity.

2.2. Animals

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

2.3. Experimental design and curcumin treatment

The animals were randomly divided into four groups (8 rats in each group) that consisted of: control group (C; non-infected rats); *T. evansi* infected control group (IC) both control groups received only vehicle (corn oil); *T. evansi* pretreated and infected group with Curcumin 20 mg/kg body weight for 30 days (Prel20); *T. evansi* pretreated and infected group with Cur 60 mg/kg body weight for 30 days (Prel60). The choice of Cur dosages was made based in previous studies that described beneficial propriets (WOLKMER et al., 2012). Cur was diluted with corn oil and administered by oral gavage, daily, not exceeding 0.1 ml/kg body weight. Treatments were administrated once a day (8-9 h a.m.). The treatment of the groups continued for 15 days after inoculation.

2.4. Etiological agent and inoculation

The rats were inoculated intraperitoneally with 0.2 ml of blood containing 10^6 parasites. All rats were infected by *T. evansi* at the same day. The control rats received 0.2 ml of physiological solution by the same route. The etiological agent isolate used here is from a naturally infected dog, and maintained in liquid nitrogen.

2.5. Parasitemia estimation

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

2.6. Collection and preparation of blood samples

Fifteen days post inoculation (pi) the animals were anesthetized with isoflurane for blood collection by cardiac puncture and then euthanized. Blood samples were stored in tubes with ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA 10%). The peripheral

lymphocytes were isolated using Ficoll Hypaque density gradient as described by BÖYUM (1968). After separation, only samples with at least 95% of lymphocytes, as verified in the coulter STKS (Miami-USA) were used. Lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of cells excluding 0.1% Trypan blue and measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity STROBER et al. (2001). Enzymatic activity was measured immediately after obtaining the lymphocytes.

2.7. NTPDase determination

NTPDase activity was determined according to the method described by LEAL et al. (2005). Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg/ml and 20 µl of intact cells (2–4 µg protein) were added to a reaction medium containing 0.5/mM CaCl₂, 120/mM NaCl, 5.0/mM KCl, 60/mM glucose and 50/mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µl, and preincubated for 10 min at 37 °C. The reaction was started by adding ATP or ADP as substrate at a final concentration of 2.0mM and was stopped with 5% trichloroacetic acid (TCA). All the samples were run in triplicate, and enzymes (intact lymphocytes) were added to the control after the addition of TCA in order to correct the non-enzymatic hydrolysis of the substrate. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the method of CHAN et al. (1986) and enzymatic activity was reported as nmol of Pi released/min/mg protein.

2.8. ADA Activity in Lymphocytes

ADA activity in lymphocytes was measured in spectrophotometer by the method of GIUSTI & GALANTI (1971). The reaction was started by adding 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 solution. The reaction mixtures were immediately mixed to 125 mmol/l/11mmol/l alkalinehypochlorite (sodium hypochlorite) and vortexed. Ammonium sulfate of 75µmol/l was used as ammonium standard. The ammonia concentration is directly proportional to the absorption of indophenol at 620 nm. The specific activity is reported as U/L in lymphocytes.

2.9. Statistical analysis

Data was analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple tests. Differences were considered significant when the probability was $P < 0.05$. The values were represented as mean \pm standard error.

3. RESULTS

3.1 Parasitemia

T. evansi could be detected in the blood of all infected rats from 24 to 48h after inoculation (1-2 parasites/field at 1000x). Independent of dose used (20 or 60mg/Kg), throughout the entire experimental period, the parasites circulation levels were significantly lower in Cur pretreated groups ($P < 0.05$) compared to *T. evansi* infected control group (IC). Three animals from IC group died during the experimental period (Data not shown).

3.2 NTPDase activity

Our results showed that curcumin pretreatment could affect NTPDase activity in rats infected by *T. evansi* ($P < 0.05$). In the ATP (Fig. 1) and ADP (Fig. 2) hydrolysis, a significant increase ($P < 0.05$) was observed in rats infected by *T. evansi* compared to control group (C). Groups pretreated with Cur (20 and 60 mg/Kg) prevented the increase in ATP and ADP hydrolysis when compared to the infected control group (IC) ($P < 0.05$).

3.3 Adenosine deaminase activity

Fig.3 showed a significant decrease in ADA activity in the *T. evansi* ($P < 0.05$) in the *T. evansi* infected group (IC) when compared to the not infected control group (C). The pretreatment with Cur in the doses of 20 and 60 mg/kg was able to prevent the decrease in the ADA activity when compared to the infected control group (IC) ($P < 0.05$).

4. DISCUSSION

Studies have demonstrated changes in enzymes of the purinergic system in *T. evansi* infection (DA SILVA, 2011; OLIVEIRA et al., 2012). The changes during the host immune response to the parasite. These enzymes are part of a complex system which regulates the signaling mediated by adenine-nucleotide and –

nucleoside, controlling their degradation and formation (LEAL et al., 2005). Therefore, depending on the ATP and ADP concentration, they function as proinflammatory molecules, affecting the stimulation and proliferation of lymphocytes and cells that release cytokines (BOURS et al., 2006). The adenosine is an anti-inflammatory molecule (GESSI et al., 2007).

In Fig. 1 and 2, it is possible to observe increase NTPDase activity through degradation of ATP and ADP in *T. evansi* infection (IC group) compared to control group (C group) ($P < 0.05$). FILIPPINI et al. (1990) suggested an important role of NTPDase in controlling the lymphocytes function, including antigen recognition and/or activation of cytotoxic T-lymphocytes. The increase of ATP and ADP hydrolyzes by NTPDase can decrease the levels of these nucleotides. ATP and ADP have affinity to P2Y receptors in the surface of lymphocytes, and should stimulate the Th2 immune response, resulting in IL-4 production, activation of eosinophils and mast cells (OLIVEIRA et al., 2012; KUMAR e SHARMA, 2009). Due to these findings, there is a reduced immune response and the host is not able to control the infection causing high parasitemia levels.

As a compensatory response to the infection and inflammatory process there was a reduction in ADA activity ($P < 0.05$) in infected rats (IC group) when compared to not infected control group (C) (Fig. 3). The reduction in ADA activity suggests an increase in the extracellular adenosine levels, as previously described by SILVA et al. (2011). The adenosine reflects what occurs in the immune system during acute tissue inflammation (KUMAR & SHARMA, 2009). The reduction of ADA activity in lymphocytes increases adenosine concentration and promote interaction of this molecule with its purinergic receptor present in many cells, resulting in an anti-inflammatory response, such as inhibition of Th1 immune response (FRANCO et al., 1997; CODERO et al., 2001). Consequently, the anti-inflammatory effect mediated by adenosine can be due to its sensibilization of purine type 1 receptors (A1R and/or A2AR) inducing a compensatory effect. Since the *T. evansi* infection activates the immune system, increasing concentration of adenosine could minimize the inflammatory process.

In this study the benefits of Cur have been recently investigated, although the mechanism how it affects the purinergic system are not known (JAQUES et al., 2011). Additionally, others have demonstrated that enzymes of the purinergic

system are closely evolved in the modulation of the immune system with anti-inflammatory and proinflammatory effects (DWYER et al. 2007).

The effect of Cur in the NTPDase and ADA activity was investigated in rats infected by *T. evansi*. The results revealed an efficacy of pre-treatment with Cur with both doses (Prel20 and Prel60 groups). They received Cur in a period of 30 days prior and 15 days post infection. We observed a modulation of the immune response via purinergic system that was demonstrated through the reduction of NTPDase activity by degradation of ATP and ADP in lymphocytes of infected rats (Fig. 1 and 2). This, probably, maintains higher levels of ATP and ADP, stimulating a more efficient immune response against the parasite, since it induces activation, differentiation and secretion of important mediators in T-lymphocytes such as IL-2 (DI VIRGILIO et al., 2001a;); and cytokines that control the *T. evansi* infection (PAIM et al., 2011; WOLKMER et al., 2012).

According to WOLKMER et al. (2012), the treatment with Cur 30 days previous *T. evansi* infection modulates the proinflammatory cytokines, as well as reduces parasitemia and mortality. In agreement, our study shows that daily use of Cur, administered at doses of 20 or 60 mg/kg, as preventive treatment (30 days pre infection) was effective in decreasing parasitemia (Fig. 1). Several evidences reveal that Cur has an immune modulatory role due to its influence on cytokines, eicosanoids, protolithic enzymes and antioxidants and several molecules involved in cellular inflammation (SHEHZAD et al., 2013).

Related to ADA activity, the pretreatment with Cur maintained the enzymatic activity high in both doses ($P < 0.05$), when compared to the untreated infected group (Fig. 3). This enzyme catalyzes the desamination of adenosine in inosine, and closely regulates the extracellular concentration of this molecule (FRANCO et al., 1997). Adenosine, which is considered an anti-inflammatory molecule, inhibits lymphocyte activation and reduce cytokines secretions via A2A receptors (DOMBROWSKIET et al., 1998). Considering these activities, ADA can increase a rapid desamination from adenosine leading to lower extracellular concentrations of this nucleoside and this may affect triggering A2A and A2B receptors, and alter inflammation. For this reason, ADA activity on lymphocytes decreases concentrations of extracellular adenosine, which favors an inflammatory response that may control the parasite.

These data suggest a positive effect of Cur in controlling ADA activation and probably in reducing adenosine, showing its interaction on purinergic system. Subsequently, Cur may regulate immune response, once it prevented increase in pro inflammatory cytokines and increased anti-inflammatory cytokine, such as IL-10 (WOLKMER et al., 2012). Cur reduces and control deleterious effects caused by inflammatory response on hosts. Considering all the data from our group, we believe the increase in ADA activity on lymphocytes reduces extracellular adenosine concentrations and this may favor an inflammatory response, what may be adequate to control parasite proliferation.

5. CONCLUSION

The results of the present study highlight the immune modulatory effects of pre-treatment with Cur in *T. evansi* infection, since the NTPDase activity in lymphocytes is preserved. This mechanism can induce a more efficient inflammatory response. We also detected an increase of ADA activity, which maybe favors the immune response against the parasite. In conclusion, the Cur could be used as a food supplement for animals in endemic areas for trypanosomiasis.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Federal University of Santa Maria.

Conflict of interest

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

REFERENCES

- ARAÚJO, C., A., C.; LEON, L., L. Biological activities of Curcuma longa L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, V.96, p.723-728, 2001.
- BERGMEYER, H., U. Methods of Enzymatic Analysis, 3rd Edn. **Verlag Chemie**, Germany, 1983.
- BOURS, M., J., L; SWENNEN, E., L; DI VIRGILIO, F; CRONSTEIN, B., N; DAGNELIE, P., C. Adenosine 5'- triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.358- 404, 2006.
- BÖYUM, 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. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, vol.97, p.77–89, 1968.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248–254, 1976.
- CHAN, K.; DELFRET, D.; JUNGES, K. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v.157, p.375-380, 1986.
- CODERO, O.; SALGADO, F.; FERNÁNDEZ-ALONSO, C.; HERRERA, C.; LLUIS, C.; FRANCO, R. ; NOGUEIRA, M. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v.70, p.920–930, 2001.
- DA SILVA, A., S., MONTEIRO, S., G; GONÇALVES, J., F; SPANEVELLO, R; SCHMATZ, R; OLIVEIRA, C., B; COSTA, M., M; FRANÇA, R., T; JAQUES,

- J., A; SCHETINGER, M., R; MAZZANTI, C., M; LOPES, S., T. Trypanosoma evansi: immune response and acetylcholinesterase activity in lymphocytes from infected rats. **Experimental Parasitology**, v.127, p.475-480, 2011.
- DARGANTES, A., P; MERCADO, R., T; DOBSON, R., J; REID, S., A. Estimating the impact of Trypanosoma evansi infection (surra) on buffalo population dynamics in southern Philippines using data from cross-sectional surveys. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.1109-14, 2009.
- DI VIRGILIO, F.; BOREA, P., A.; ILLES, P. P2 meet the immune system. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol.22, p.59-63 2001.
- DOMBROWSKI, K; KE, Y; BREWER, K, A; KAPP, J, A. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. **Immunological Reviews**, v.161, p.111-118, 1998.
- DWYER, K., M. ; DEAGLIO, S; GAO, W; FRIEDMAN, D; STROM, T., B; ROBSON, S., C. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signaling Journal**, v.3, p.171-180, 2007.
- FILIPPINI, A. et al. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector junctions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Physical Sciences**, v.87, p.8267-71, 1990.
- FRANCO, R.; CASADO, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLO, J.; CANELA, E., I.; LLOUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v.52, p.283-294, 1997.
- GAO, W.; PEREIRA, M., A. Interleukin-6 is required for parasite specific for parasite response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.167-168, 2002.

GESSI, S., MERIGHI, S; VARANI, K; CATTABRIGA, E; BENINI, A; MIRANDOLA, P; LEUNG, E; MAC LENNAN, S; FEO, C; BARALDI, S; BOREA, P., A. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: Focus on the A3 adenosine subtype. **Journal of Cellular Physiology**, v.211, p.826–836, 2007.

GIUSTI, G.; GALANTIS, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. **Enzyme**, v.12, p.417-425, 1971.

GOEL, A; KUNNUMAKKARA, A., B; AGGARWAL, B., B. Curcumin as “curecumin”. From kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, v.75, p.787-809, 2008.

JAIQUES, J.,A.,D.,S.; REZER, J.,F.,P.; RUCHEL, J.,B.; BECKER, L.,V.; SAYDELLES, R., C.; SOUZA, V.,D.,C.,G.; LUZ, S.,C.,A.,D; GUTIERRES, J., M.; GONÇALVES, J.,F.; MORSCH, V.,M.; SCHETINGER, M.,R.,C., LEAL, D.,B.,R. Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin. **Biomedicine & Preventive Nutrition** v.2, p.109-115, 2011.

KUMAR, V.;SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **European Journal of Pharmacology**, v.616, p.7-15, 2009.

LEAL, D., B., R; STREHER, C., A.; NEU, T., N.; BITTENCOURT, F., P.; LEAL, C., A., M.; SILVA, J., E., P.; MORSCH, V., M.; SCHETINGER, M., R., C. 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.

- MAHMOUD, M., M.; GRAY., A., R. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. A review of recent research. **Tropical Animal Health and Production**, v.12, p.35-47,1980.
- MEKATA, H., KONNAI, S; WITOLA, W., H; INOUE, N; ONUMA, M; OHASHI, K. Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. **Infection Genetics Evolution**, v.9, p.1301-1305, 2009.
- OLIVEIRA, C., B., DA SILVA, A., S; SOUZA, V., C; COSTA, M., M; JAQUES, J., A; LEAL, D., B; LOPES, S., T; MONTEIRO, S., G. NTPDase activity in lymphocytes of rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Parasitology**,v.139, p.232-236, 2012.
- PAIM, F., C., DUARTE, M., M; COSTA, M., M; DA SILVA, A., S; WOLKMER, P; SILVA, C., B; PAIM, C., B; FRANÇA, R., T; MAZZANTI, C., M; MONTEIRO, S., G; KRAUSE, A; LOPES, S., T. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v.128, p.365-370, 2011.
- PERRONE, T., M., GONZATTI, M., I; VILLAMIZAR, G; ESCALANTE, A; ASO, P., M. Molecular profiles of Venezuelan isolates of *Trypanosoma* sp. by random amplified polymorphic DNA method. **Veterinary Parasitology**, v.161, p.194-200, 2009.
- POURJAFAR, M.; BADIEI, K.; SHARIFIYAZDI, H; CHALMEH, A; NAGHIB, M; BABAZADEH, M; MOOTABI ALAVI, A; HOSSEINI JOSHANI-ZADEH, N. Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* in Iranian dromedary camels. **Parasitology Research**, v.112, p.899-903, 2012.
- SHARMA, D., K.; CHAUHAN, P., P.; AGRAWAL, R., D. Interaction between

- Trypanosoma evansi and Haemonchus contortus infection in goats. **Veterinary Parasitology**, v.92, p.261-267, 2000.
- SHEHZAD, A.; G. REHMAN; Y. S. LEE. Curcumin in inflammatory diseases. **Biofactors**, v.39, n.1, p.69-77. 2013.
- SILVA-ITURRIZA, A., NASSAR, J., M; GARCÍA-RAWLINS, A., M; ROSALES, R; MIJARES, A. Trypanosoma evansi kDNA minicircle found in the Venezuelan nectar-feeding bat Leptonycteris curasoae (Glossophaginae), supports the hypothesis of multiple origins of that parasite in South America. **Parasitology International**, 2013.
- STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols Immunology**. May, Appendix 3: Appendix 3B, 2001.
- TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS, H.; CARLIER, Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma Cruzi*: Effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. **Infection and immunity**, vol.62, p. 692-696, 1994.
- WOLKMER, P., SILVA, C., B; PAIM, F., C; DUARTE, M., M; CASTRO, V; PALMA, H., E; FRANÇA, R., T; FELIN, D., V; SIQUEIRA, L., C; LOPES, S., T; SCHETINGER, M., R; MONTEIRO, S., G; MAZZANTI, C., M. Pre-treatment with curcumin modulates acetylcholinesterase activity and proinflammatory cytokines in rats infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitology International**, 2012.
- YEGUTKIN, G., G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1783, p.673-694, 2008.

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

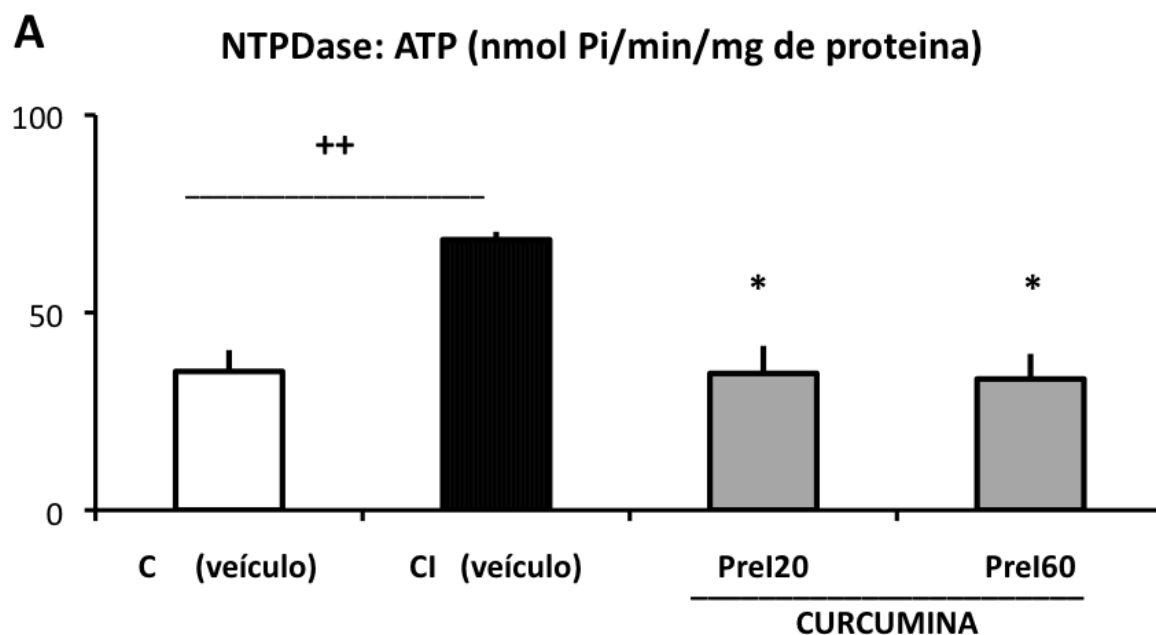


Figure 1: Effect of oral curcumin pre-treatment for 30 days in the NTPDase (ATP) activity in lymphocytes on the parasitemia of *Trypanosoma evansi* infected rats. Curcumin was administered daily by oral gavage. All rats were infected by *T. evansi* at same day. The treatment of the groups continued until the day of euthanasia (15 days after inoculation). (C) control group - non-infected; (IC) *T. evansi* infected control group; (Prel20) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 20 mg/kg body weight for 30 days; (Prel60) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 60 mg/kg body weight for 30 days; Values represent mean \pm SE, (n= 5-8 per group); at 1000x magnification.

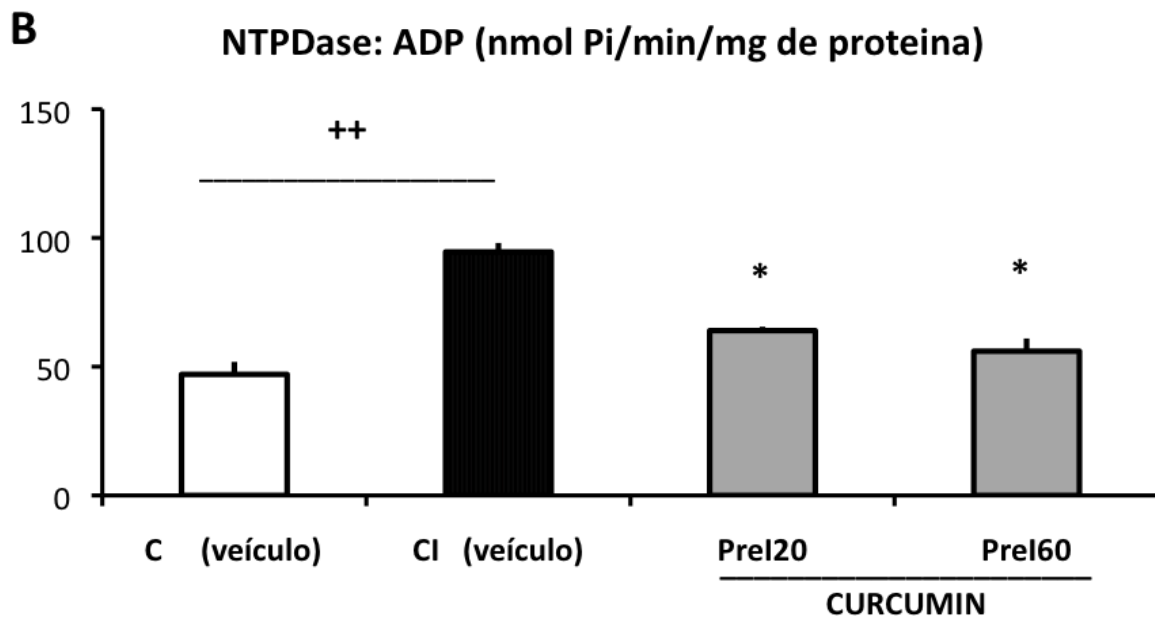


Fig. 2: Effect of pre-treatment for 30 days with curcumin in the NTPDase (ADP) activity in lymphocytes from rats infected with *Trypanosoma evansi* (C) control group - non-infected; (IC) *T. evansi* infected control group; (PreI20) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 20 mg/kg body weight for 30 days; (PreI60) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 60 mg/kg body weight for 30 days. Values represent mean \pm SEM, ++ represents statistical difference between C and IC groups ($P < 0.001$); * represents statistical difference between IC and groups that received curcumin ($P < 0.05$, $n = 5-8$ per group).

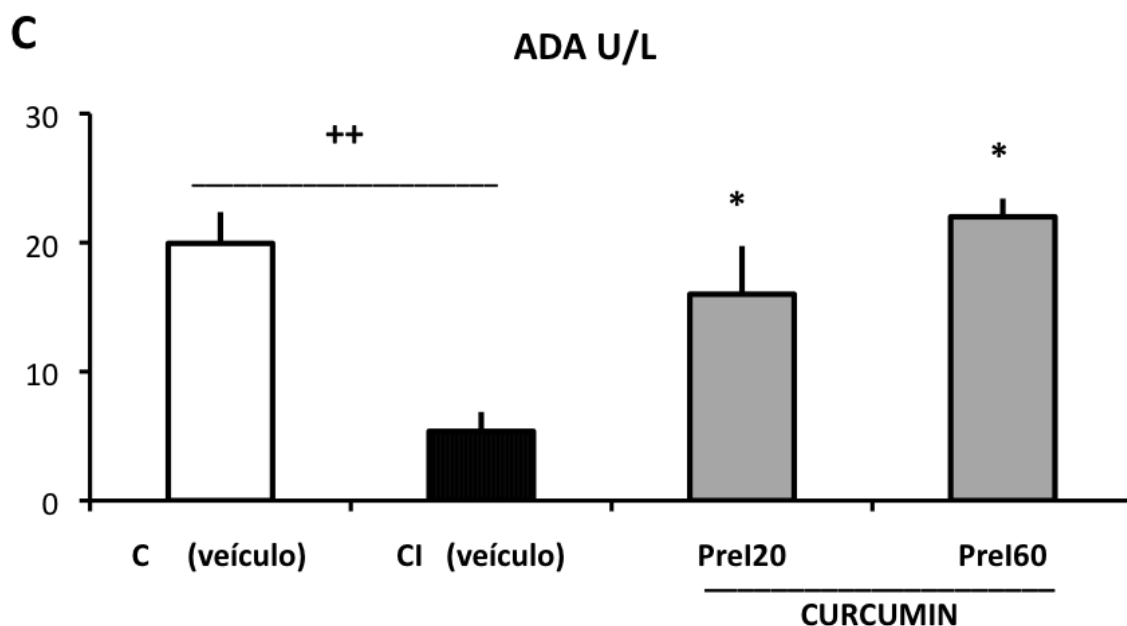


Fig. 3: Effect of pre-treatment for 30 days with curcumin in the ADA activity in lymphocytes from rats infected with *Trypanosoma evansi* (C) control group - non-infected; (IC) *T. evansi* infected control group; (Prel20) *T. evansi* infected and pretreated with curcumin 20 mg/kg body weight for 30 days; (Prel60) *T. evansi* infected and and pretreated with curcumin 60 mg/kg body weight for 30 days. Values represent mean \pm SEM, ++ represents statistical difference between C and IC groups ($P < 0.001$); * represents statistical difference between IC and groups that receive curcumin ($P < 0.05$, $n = 5-8$ per group).

5. CONCLUSÃO

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

1. A infecção experimental por *Trypanosoma evansi* aumenta a atividade da NTPDase (hidrólise de ATP e ADP) e reduz a atividade da adenosina desaminase em linfócitos de ratos, o que pode estar associado a uma resposta compensatória à infecção e ao processo inflamatório causado pelo parasita.

2. O tratamento prévio com a curcumina previne tanto o aumento na atividade da NTPDase (hidrólise de ATP e ADP), como a redução na atividade da adenosina desaminase, sugerindo que este composto exerce um efeito imunomodulador sobre as ecto-ATPases em linfócitos de ratos submetidos à infecção experimental por *Trypanosoma evansi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e Molecular**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

AGGARWALL, B., B. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. **Annual Review of Nutrition**, v.30, p.173- 199, 2010.

ARAÚJO, C., A., C; ALEGRIO L., V., CASTRO, D., LIMA, M., E., F.; LEON, L., L. 1998. *Leishmania amazonensis*: in vivo experiments with diarylheptanoids from Leguminosae and Zingiberaceae plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.93, p.306, 1998.

ARAÚJO, C., A., C; ALEGRIO L., V., CASTRO, D., LIMA, M., E., F.; GOMES, C., L.; LEON, L., L. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V.94, p.791-794, 1999.

ARAUJO, C., A., C; LEON, L., L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, p. 723-728, 2001.

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

BATTASTINI, A., M., O.; DA ROCHA, J., B.; BARCELLOS, C., K.; DIAS, R., D.; SARKIS, J., J. 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.

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

BRANDÃO, J., P. Natural infection by *Trypanosoma evansi* em dog – Case report. **Clínica Veterinária**, v.36, p.23-26, 2002.

BRUN, R. *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 – an overview. **Novartis Foundation Symposium**, v.276, p.26–48, 2006.

CAMARGO, R., E.; UZCANGA, G., L.; BUBIS, J. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its crossreactivity with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.67-81, 2004.

CHAN, J., K., C.; Ng, C., S.; HUI, P., K. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. **Histopathology**, v12, p.461-480, 1988.

CHANGTAM, C.; DE KONING, H., P.; IBRAHIM, H.; SAJID, M., S.; GOULD, M., K.; SUKSAMRARN, A. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. **European Journal of Medicinal Chemistry** v.45, p.941–56, 2010.

CHARLES, J; TRAVERS, P; WALPORT, M; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**, 5° Ed. New York and London: Garland Science, 2001.

CODERO, O.; SALGADO, F.; FERNÁNDEZ-ALONSO, C.; HERRERA, C.; LLUIS, C.; FRANCO, R.; NOGUEIRA, M. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology** v.70, p.920–930, 2001.

COLPO, C., B.; BRACCINI C., C.; MONTEIRO, S.; ROULIM, S., D.; BRACCINI, C., E., T.; BRACCINI, H., G. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**, v.35, p.717-719, 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, v.1, p.251-296, 2004.

CONRADO, A., C; LOPES S., T., A.; DE OLIVEIRA, L., S., S; MONTEIRO, S., G; VARGAS, D., L., B; BUENO, A. 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.

COPPOLA, A; COPPOLA L; DALLA MORA, L; LIMONGELLI, F., M; GRASSIA, A; MASTROLORENZO, L; GOMBOS, G; LUCIVERO, G. Vigorous exercise acutely changes platelets and B-lymphocyte CD39 expression. **Journal of Applied Physiology**, v.98, p.1414-1419, 2005.

CRISTALLI, G., E; COSTANZI, S; LAMBERTUCCI, C; LUPIDI, G; VITTORI, S; VOLPINI, R; CAMAIONI, E. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v.21, p.105–128, 2001.

DA SILVA, A., S.; BELLÉ, L.; BITENCOURT, P.,E.,R.; COSTA, M.,M.; OLIVEIRA, C.,B.; SOUZA, V.; LEAL, D.,B.; MAZZANTI, C.,M., LOPES, S.,T.,A.; MONTEIRO, S.,G. Activity of the enzyme adenosine deaminase in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitology** v.138, p.201-208, 2011.

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

DÁVILA, A., M., R.; SILVA, R., A., M., S. Animal trypanosomiasis in South America. Status, partnership, and information technology. **Annals of the New York Academy of Sciences** v.916, p.199-212, 2000.

DESROSIERS, M., D; CEMBROLA, K., M; FAKIR, M., J; STEPHENS, L., A; JAMA, F., M; SHAMELI, A., MEHAL, W., Z; SANTAMARIA, P; SHI, Y. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. **Journal of Immunology**, v.179, p.1884–1892, 2007.

DI VIRGILIO, F. The dual role of extracelular ATP. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v.81, p.59–63, 2000.

DOMBROWSKI, K; KE, Y; BREWER, K, A; KAPP, J, A. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. **Immunological Reviews**, v.161, p.111-118, 1998.

FIGUEIREDO, L., T., M; BADRA, S., J; PEREIRA, L., E; SZABÓ, M., P., J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.613-619, 1999.

FILHO, A., B., C; SOUZA, R., J; BRAZ, L., T; TAVARES, M. Cúrcuma: planta medicinal condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, p.171-175, 2000.

FILIPPINI, A; TAFFS; SITKOVSKY. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: Possible role in effector junctions. **Proceedings of The National Academy of Sciences USA**, v.87, p.8267-71, 1990.

FRANCISCATO, C; LOPES, S., T., A; TEIXEIRA, M., M., G; MONTEIRO, S., G; WOLKMER, P; GARMATZ, B., C; PAIM, C., B. Dog naturally infected by *Trypanosoma evansi* in Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, p.288-291, 2007.

FRANCO, R; CASADÓ, V; CIRUELA, F; SAURA, C; MALLOL, J; CANELA, EI; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v.52, p.283-294, 1997.

FRANKE, C., R; GREINER, M; MEHLITZ, D. Investigation on naturally occurring *T. evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, v.58, p.159-69, 1994.

GAO, W; PEREIRA, M., A. Interleukin-6 is required for parasite specific for parasite response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.167-170, 2002.

GESSI, S; MERIGHI, S; VARANI, K; CATTABRIGA, E; BENINI, A; MIRANDOLA, P; LEUNG, E; MAC LENNAN, S; FEO, C; BARALDI, S; BOREA, P., A. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: Focus on the A3 adenosine subtype. **Journal of Cellular Physiology**, v.211, p.826–836, 2007.

GOVINDARAJAN V., S; WILLIAM, H., S. 1980. Turmeric-chemistry, technology and quality. **CRC Critical Reviews In Food Science and Nutrition**, v.12, p.199-301, 1980.

HASKO, G.; CRONSTEIN, B., N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunology**, v.25, p.33-39, 2004.

HERRERA, H., M. et al. 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, 749p., 1972.

IA 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**, v.73, p.339-343, 2003.

IMAI, M; GOEPFERT, C; KACZMAREK, E; ROBSON, SC. CD 39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.270, p.272-278, 2000.

JANEWAY, C., A; TRAVERS, P; WALPORT, M; SHLOMCHIK, M., J. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease 5th ed. (NCBI Bookshelf)**, 2001.

JAQUES, J., A; REZER, J., F; CARVALHO, F., B; DA ROSA, M., M; GUTIERRES, J., M; GONCALVES, J., F; SCHMATZ., R; DE BAIROS, A., V; MAZZANTI, C., M; RUBIN, M., A; SCHETINGER, M., R; LEAL, D., B. Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. **Physiology and Behavior**, v.106, p.664–669, 2012.

JOSHI, P., P.; CHAUDHARI A.; SHEGOKAR V., R.; POWAR R., M.; DANI, V., S.; SOMALWAR A., M.; JANNIN, J.; TRUC, P. Treatment and follow-up of the first case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, p.989-991, 2006.

KANSAS, G., S.; WOOD, G., S.; TEDDER, T., F. Expression, distribution and biochemistry of human CD30: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.16, p.2235- 2244, 1991.

KOOSIRIRAT, C.; LIMPISARN, S.; CHANGSOM, D.; CHAWANSUNTATI, K.; WIPASA, J. Investigation of the anti-inflammatory effect of Curcuma longa in Helicobacter pylori infected patients. **International Immunopharmacology** v.10, p. 815- 818, 2010.

KOWLURU, R., A.; KANWAR, M. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. **Nutrition e Metabolism**, v.4, p1-8, 2007.

KOZIAK, K; SÉVIGNY, J; ROBSON, S., C; SIEGEL, J., B; KACZMAREK, E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPase) expression in endothelial

cells, platelets and leukocytes. **Thrombosis and Haemostasis**, v.82, p.1538-1544, 1999.

KUMAR, S.; TARLETON, R., L. Antigen-Specific Th1 But Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. **Journal of Immunology**, v.166, p.4596-4603, 2001.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **European Journal Pharmacology**, v.616, p.7–15, jan. 2009.

LEAL, D., B., R.; STREHER, C., A.; NEU, T., N.; BITTENCOURT, F., P.; LEAL, C., A., M.; SILVA, J., E., P.; MORSCH, V., M.; SCHETINGER, M., R., C. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ectodiphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1721, p.9–11, 2005.

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

LIAO, D; SHEN, J. Studies of quinapyramine-resistance of *Trypanosoma brucei evansi* in China. **Acta Tropica**, v.116, p.173–7, 2010.

MAHESHWARI, R., K; SINGH, A., K; GADDIPATI, J; SRIMAL, R., C. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life Sciences**, v.78, p.2081–7, 2006.

MALISZEWSKI, C., R; DELESPESE, G., J; SCHOENBORN, M., A; ARMITAGE, R., J; FANSLOW, W., C; NAKAJIMA, T; BAKER, E; SUTHERLAND, G., R; POINDEXTER, K; BIRKS, C. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. **The Journal of Immunology**, v.153, p.3574-3583, 1994.

MARTINS, M., C.; RUSIG, O. Cúrcuma — um corante natural. **Boletim SBCTA**, v. 26, p.53–65, 1992.

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; HOLMES, P., H; MILES, M., A. **The Trypanosomiases**. Wallingford: CABI Publishing. 640p. 2004.

MENEZES, V.,T; QUEIROZ, A., O; GOMES, M., A; MARQUES, M., A; JANSEN, A., M. *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss–Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. **Parasitology Research**, v.94, p.193–200, 2004.

PAIM, F., C; DUARTE, M., M; COSTA, M., M; DA SILVA, A., S; WOLKMER, P; SILVA, C., B; PAIM, C., B; FRANÇA, R., T; MAZZANTI, C., M; MONTEIRO, S., G; KRAUSE, A; LOPES, S., T. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v.128, p.365-370, 2011.

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

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

RASMUSSEN, H., B; CHRISTENSEN, S., B; KVIST, L., P; KARAZMI, A. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. **Planta Medica**, v.66, p.396-398, 2000.

RATHBONE, M., P; MIDDLEMISS, P., J; GYSBERS, J., W; ANDREW, C; HERMAN, M., A; REED, J., K; 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; MILANO, J; 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, p. 239-249, 2005.

SABOURY, A., A; DIVSALAR, A; ATAIE, G; AMANLOU, M; MOOSAVI-MOVAHEDI, A., A; HAKIMELAHI, G., H. Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration calorimetry. **Acta Biochimica Polonica**, v.50, p.849–855, 2003.

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

Sasson, S; Silva, C., J. **Biologia – volume 1 - Citologia Histologia - 5ª Edição - Atual Editora**, São Paulo, 1989.

SAURA, C; CIRUELA, F; CASADÓ, V; CANELA, EI; MALLOL, J; LLUIS, C; FRANCO, R. Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig braicortical membranes. **Journal of Neurochemistry**, v.66, p.1675-1682, 1996.

SCHETINGER, M., R., C; MORSCH, V., M; BONAN, C., D; WYSE, A., T. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **BioFactors (Oxford)**, v.31, p.77-98, 2007.

SEBASTIÃO, T., J; EDISON, R., L; FAUSTO, E., L., P; EDMUNDO, C. miocardite chagásica crônica humana: estudo quantitativo dos linfócitos cd4+ e dos cd8+ no exsudato inflamatório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, p.127-134, 1994.

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

SHI, J; KUKAR, T; WANG, C., Y; LI, Q., Z; CRUZ, P., E; DAVOODI-SEMIROMI, A; YANG, P; GU, Y; LIAN, W; WU, D., H; SHE, J., X. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.17471-78, 2001.

SILVA, R., A., M., S; HERRERA, H., M; DOMINGOS, L., B., S; XIMENES, F., A; DÁVILA, A., M., R. Trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil: a preliminary approach on risk factors. **Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.4, p.315-319, 1995.

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

SITKOVSKY, M., V.; OHTA, A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? **Trends Immunology**, v.26, p.299–304, 2005.

TAKAHASHI, M.Y. **Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade**. 2. ed. São Paulo: M.Y. Takahashi, 17 p, 1987.

TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS, H.; CARLIER, Y. Interleukin-6 (IL-6) Production in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*: Effect of Its Paradoxical Increase by Anti-IL-6 Monoclonal Antibody Treatment on Infection and Acute-Phase and Humoral Immune Responses. **Infection and Immunity**, v.2, p.692-696, 1994.

TSUBOI, I; SAGAWA, K; SHICHIJO, S; YOKOYAMA, M., M; OU, D., W; WIEDERHOLD, M., D. 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.

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

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

TUNTASUVAN, D; MIMAPAN, S; SARATAPHAN, N; TRONGWONGSA, L; INTRARAKSA, R; LUCKINS, A., G. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by immunohistochemistry. **Veterinary Parasitology**, v.87, p.223-230, 2003.

VENTURA, R., M; TAKATA, C., S; SILVA, R., A; NUNES, V., L; TAKEDA, G., F; TEIXEIRA, M., M. Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. **Journal of Parasitology**, v.86, p.1289-98, 2000.

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

WOLKMER, P; DA SILVA, A., S; TRAESEL, C., K; PAIM, F., C; CARGNELUTTI, J., F; PAGNONCELLI, M; PICADA, M., E; MONTEIRO, S., G; LOPES, S., T. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.41-46, 2009.

WOLKMER, P; SILVA, C., B; PAIM, F., C; DUARTE, M., M; CASTRO, V; PALMA, H., E; FRANÇA, R., T; FELIN, D., V; SIQUEIRA, L., C; LOPES, S., T; SCHETINGER, M., R; MONTEIRO, S., G; MAZZANTI, C., M. Pre-treatment with curcumin modulates acetylcholinesterase activity and proinflammatory cytokines in rats infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitology International**, v.62, p.144-149, 2012.

WU, S., J; TAM, K., W; TSAI, Y., H; CHANG, C., C; CHAO, J., C. Curcumin and saikosaponin a inhibit chemical-induced liver inflammation and fibrosis in rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 38, p.99-111, 2010.

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

ZANETTE, R., A; Zanette, R., A; da Silva, A., S; da Costa, M., M; Monteiro, S., G; Santurio, J., M; Lopes, S., T., A. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em equinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, p.1468-1471, 2008.

ZHOU, J; SHEN, J; LIAO, D; ZHOU, Y; LIN, J. Resistance to drug by different isolates *Trypanosoma evansi* in China. **Acta Tropica**, v.90, p.271–5, 2004.

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

ZWAVING, J., H., BOS, R. Analysis of the essential oils of five *Curcuma* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v.7, p.19-22, 1992.

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