



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

**INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DO ATP
EXTRACELULAR NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA
EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE PACIENTES
COM A FORMA INDETERMINADA DA
DOENÇA DE CHAGAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Viviane do Carmo Gonçalves Souza

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DO ATP EXTRACELULAR NA
SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE
PACIENTES COM A FORMA INDETERMINADA DA DOENÇA DE
CHAGAS**

por

Viviane do Carmo Gonçalves Souza

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof. (Dra) Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

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

**INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DO ATP EXTRACELULAR NA
SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE
PACIENTES COM A FORMA INDETERMINADA DA DOENÇA DE
CHAGAS**

elaborada por
Viviane do Carmo Gonçalves Souza

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
(Presidente/Orientador)**

Cleci Menezes Moreira, Dr^a. (UNIPAMPA)

Silvia Gonzalez Monteiro, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 15 de julho de 2011.

*"Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isso não tem importância. O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado."
(William Shakespeare)*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

... aos meus pais, Vanderlei e Vera, simplesmente pela vida e amor.

... ao meu esposo, Luiz Felipe, pelo companheirismo e apoio.

*“Deus nos faz perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança.”
(Albert Einstein)*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me guiar, iluminar e proteger durante todos os dias desta caminhada.

Aos meus queridos pais Vanderlei e Vera, pela educação, apoio, amor e compreensão, enfim por sempre me concederem segurança e base em minhas escolhas e conquistas.

Ao meu esposo Luiz Felipe, que abdicou do nosso convívio e tanto me apoiou, compreendeu e principalmente incentivou e deu força para que este sonho fosse realizado. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos meus sogros Felipe e Suzana, por me acolherem com tanto carinho e amizade, proporcionando-me conforto e liberdade, fazendo da casa deles a minha.

Ao meu irmão Vinícius, cunhada e sobrinhos por sempre torcerem por mim.

Aos meus filhotes Guinho e Duby por muitas vezes tornarem meus dias mais alegres, com o carinho e lealdade de vocês.

À minha orientadora Daniela Bitencourt Rosa Leal pela oportunidade, compreensão, amizade e por todo aprendizado nestes anos de caminhada.

O meu agradecimento especial às colegas Lara e Cíntia, por me receberam e me acolherem com tanto carinho e por não medirem esforços ao compartilhar conhecimentos.

Aos meus colegas e amigos do laboratório 4229: Karine, João, Jeandre, Jader, Josiane, Carine, Kelly, Maria Luiza, Lívia, Cristiano, Tatiana, Bruna, Francine e Pedro pela colaboração para a realização do trabalho e pela amizade durante o período de convívio. Pela alegria de todos, tornando os longos dias de experimentos menos cansativos. Obrigada!

O meu reconhecimento ao colega e amigo Jeandre, pelo companheirismo, dedicação, aprendizado e apoio principalmente nos últimos meses.

Aos colegas do laboratório 2208, em especial à Margarete, Cláudio e Victor, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Parasitologia, Camila e Aleks, pela amizade e companheirismo.

Aos farmacêuticos do HUSM, Juliana e Marcelo, pela disponibilidade e colaboração.

Às minhas amigas Edileusa e Vanessa pela constante preocupação e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM pelo auxílio e apoio prestados. Em especial minha gratidão ao professor Sydney pela atenção e por ter me guiado até a professora Daniela, no momento em que me deparei com vários obstáculos no início desta trajetória.

A minha sincera gratidão aos pacientes por participaram deste estudo e por compartilharem suas histórias de vida.

Enfim, a todos que colaboraram, seja de forma profissional como pessoal, o meu muito obrigada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DO ATP EXTRACELULAR NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE PACIENTES COM A FORMA INDETERMINADA DA DOENÇA DE CHAGAS

Autora: VIVIANE DO CARMO GONÇALVES SOUZA
Orientadora: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL
Data e local de Defesa: Santa Maria, 15 de Julho de 2011.

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* causa a doença de Chagas (DC), uma doença inflamatória crônica. A maioria dos indivíduos infectados não apresenta morbidade aparente, compatível com a forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC). Embora fatores relacionados ao parasito possam influenciar a evolução clínica da doença, fatores como resposta imune e inflamatória do hospedeiro têm fundamental participação na dinâmica da patologia. A resposta imune celular está intimamente associada à presença de um infiltrado inflamatório tecidual, composto por células mononucleares que proliferam e produzem citocinas pró e anti-inflamatórias. A reação inflamatória desencadeada pela infecção pelo *T. cruzi* é mantida pela persistência do parasito no hospedeiro, e produz alterações sistêmicas, incluindo alterações microvasculares. O sistema de sinalização purinérgica desempenha um importante papel na modulação da resposta imune e inflamatória, assim como da trombose vascular, através dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídeo adenosina. Estas moléculas sinalizadoras são liberadas de células como linfócitos e plaquetas em resposta ao dano ou ao estímulo celular por ação de patógenos. Os efeitos dos nucleotídeos de adenina e da adenosina são promovidos através da ativação de receptores purinérgicos específicos e controlados por um complexo enzimático localizado na superfície das células. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da sinalização purinérgica na regulação das disfunções microvasculares desencadeadas pela infecção, bem como da resposta imune adaptativa induzida pelo hospedeiro, através da determinação da atividade de ectoenzimas envolvidas no metabolismo do ATP em linfócitos e plaquetas de pacientes FIDC. Foi observada uma diminuição nas atividades da E-NTPDase e da E-ADA, representando uma consequência adaptativa do hospedeiro frente a uma baixa estimulação antigênica durante o período de latência da doença. Logo, baixas concentrações de ATP extracelular liberadas, levariam à indução de uma resposta Th2 que protegeria o hospedeiro de uma intensa resposta Th1, enquanto, elevadas concentrações de adenosina extracelular seriam responsáveis por efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Não foi observada alteração na expressão da E-NTPDase em relação ao grupo controle, demonstrando que a diminuição da sua atividade enzimática pode ser resultado de alguma modificação na conformação tridimensional da própria enzima. Em plaquetas de pacientes FIDC, foi observado um aumento nas atividades da E-NPP e E-5'-NT e uma diminuição na atividade da E-ADA, o que poderia estar relacionado a um efeito tromborregulatório, com a formação e preservação dos níveis extracelulares de adenosina, tendo em vista seu papel vasodilatador e cardioprotetor. A agregação plaquetária diminuída observada nos pacientes FIDC, provavelmente ocorreu devido à ação anti-agregante da adenosina circulante. Dessa forma, sugere-se que as ectoenzimas do sistema purinérgico, responsáveis pelo metabolismo do ATP contribuem na tromborregulação e na modulação das respostas imunes do hospedeiro durante a forma indeterminada da doença.

Palavras-chave: ATP; doença de Chagas; sistema purinérgico.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduating Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

INFLUENCE OF EXTRACELLULAR ATP METABOLISM IN THE PURINERGIC SIGNALING IN LYMPHOCYTES AND PLATELETS OF PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS' DISEASE

Author: Viviane do Carmo Gonçalves Souza
Advisor: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Place and Date: Santa Maria, July 15th, 2011.

Trypanosoma cruzi infection causes Chagas' disease (CD), a chronic inflammatory disease. The most infected individuals present no apparent morbidity, consistent with the indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Although parasite-related factors may influence the clinical progress of disease, factors such as immune and inflammatory responses of host have a fundamental participation in the dynamic of pathology. The cellular immune response is closely associated with the presence of a tissue inflammatory infiltrate, which is composed by mononuclear cells that proliferate and produce pro- and anti-inflammatory cytokines. The inflammatory reaction triggered by *T. cruzi* infection is maintained by persistence of parasite in the host, and produces systemic effects, including microvascular changes. The purinergic signaling system plays an important role in the modulation of immune and inflammatory responses as well as vascular thrombosis by adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their derivative nucleoside adenosine. These signaling molecules are released from cells such as lymphocytes and platelets in response to damage or cell stimulation by the action of pathogens. The effects of adenine nucleotides and adenosine are promoted through the agonism of specific purinergic receptors and controlled by an enzymatic complex located on the cell surface. The aim of this study was to evaluate the influence of purinergic signaling in the regulation of microvascular dysfunction triggered by infection and in the adaptive immune response induced by the host through ectoenzymes activities involved in the metabolism of ATP in lymphocytes and platelets of patients IFCD. It was observed a decrease in both E-NTPDase and E-ADA activities, representing an adaptive consequence of host to a low antigenic stimulation during the latent phase of disease. Therefore, low concentrations of extracellular ATP would lead the induction of a Th2 response that would protect the host from an intense Th1 response, while high concentrations of extracellular adenosine would be responsible for anti-inflammatory and immunosuppressive effects. It was not observed any change in E-NTPDase expression when compared with the control group, demonstrating that its decreased activity may be a result of some tridimensional alteration of the enzyme itself. In platelets of IFCD patients, there was an increase in E-NPP and E-5'-NT activities and a decrease in E-ADA activity, which could be related to trombo-regulatory effects by nucleotides degradation as well as formation and preservation of extracellular adenosine levels, in view of its vasodilator and cardioprotective roles. The decreased platelet aggregation observed in IFCD patients probably occurred due to anti-aggregating action of adenosine. In conclusion, the purinergic system ectoenzymes, which are responsible for ATP metabolism, contribute in trombo-regulation and modulation of host immune responses during the indeterminate form of the disease.

Keywords: ATP; Chagas' disease; purinergic system.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Resposta Th1 e Th2 nas infecções intracelulares.....	25
Figura 2- Resposta imune nas formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas.....	26
Figura 3- Representação de uma plaqueta	28
Figura 4- Funções plaquetárias	30
Figura 5- Miocárdio de modelo experimental infectado com <i>T. cruzi</i>	32
Figura 6- Representação dos componentes do sistema purinérgico	35
Figura 7- Estrutura de nucleotídeo e nucleosídeo	35
Figura 8- Liberação de ATP no meio pericelular	38
Figura 9- Topografia das ecto-nucleotidasas	39
Figura 10- Representação da ação das ectoenzimas no metabolismo dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e nucleosídeo adenosina	40
Figura 11- Membros da família das NTPDases.....	42
Figura 12- Estrutura da 5'-nucleotidase ancorada à membrana	44
Figura 13- Representação da Ecto-5'-nucleotidase	45
Figura 14- Representação estrutural da família E-NPP.....	46
Figura 15- Representação de substratos específicos das E-NPPs.....	46
Figura 16- As principais vias envolvidas no metabolismo da adenosina.	48

MANUSCRITO I

Figure 1- ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means±SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P<0.05$, $n=25$)	69
--	----

Figure 2- E-ADA activity in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means \pm SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P < 0.05$, $n = 20$) 70

Figure 3- Expression of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPDase 1) in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. Densitometric analysis (arbitrary units, A.U.) of the protein NTPDase1. Data are represented as the mean \pm SEM. (Student's T test, $P < 0.05$, $n = 4$) 71

MANUSCRITO II

Figure 1- ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in platelets of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means \pm SEM. The symbol ** represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P < 0.01$, $n = 30$) 92

Figure 2- E-NPP activity in platelets of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means \pm SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P < 0.05$, $n = 20$) 93

Figure 3- E-ADA activity in platelets of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means \pm SEM. The symbol *** represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P < 0.001$, $n = 30$) 94

Figure 4- Platelet aggregation profile in patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD) and healthy subjects (control). Platelet aggregation was evaluated by using ADP as agonist at concentrations of 5 and 10 μ M. The results are expressed as percentage of aggregation ($n = 15$) 95

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I I

Table 1-	Hematological determination in patients with indeterminate form of Chagas' disease	72
Table 2-	Adenine nucleotides and adenosine levels measurement in patients with indeterminate form of Chagas' disease ...	73

LISTA DE ABREVIATURAS

DC: doença de Chagas

FIDC: forma indeterminada da doença de Chagas

ADP: adenosina difosfato

AMP: adenosina monofosfato

ATP: adenosina trifosfato

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ADA: adenosina deaminase

E-NTPDase: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

E-NPP: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-5-NT: ecto-5'-nucleotidase

E-ADA: ecto-adenosina desaminase

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IL-1 β : Interleucina-1-beta

IL-6: Interleucina-6

IL-12: Interleucina-12

INF- γ : Interferon-gamma

p-Nph-5'-TMP: p-nitrofenil timidina monofosfato

TNF- α : fator de necrose tumoral-alpha

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	123
Anexo B	Coleta de dados	125
Anexo C	Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética	126
Anexo D	Carta de Submissão Manuscrito I	127
Anexo E	Carta de Submissão Manuscrito II	128

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Doença de Chagas	20
3.1.1	Visao geral	20
3.1.2	Doença de Chagas e sistema imune	23
3.1.3	Doença de Chagas e microcirculação	27
3.2	Sistema de sinalização purinérgica	34
3.2.1	Nucleosídeos e nucleotídeos	35
3.2.2	Receptores purinérgicos	37
3.2.3	Ectoenzimas	39
3.2.3.1	NTPDase	40
3.2.3.2	5'-nucleotidase	43
3.2.3.3	NPP	45
3.2.3.4	ADA	47
4	MANUSCRITOS	50
5	DISCUSSÃO	96
6	CONCLUSÕES	102
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
8	ANEXOS	123

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, os objetivos e a revisão bibliográfica.

A seguir, os resultados estão apresentados na forma de manuscritos, os quais se encontram na seção Manuscritos.

Os itens discussão e conclusão, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes aos manuscritos.

As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão Bibliográfica, Discussão e Conclusão.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma doença infecciosa endêmica, presente em vários países da América e classificada como uma doença negligenciada. A descoberta desta patologia pelo médico e pesquisador brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro de Chagas representou um marco na história da medicina tropical. Mesmo cerca de cem anos após sua descoberta, constitui ainda um grande problema de saúde pública.

É também denominada tripanossomíase americana ou esquizotripanose, sendo causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, cuja principal via de transmissão é a vetorial, seguida das vias sanguínea (transfusão), vertical (placentária), oral e acidental. Manifesta-se sob a forma aguda, indeterminada ou crônica. Cerca de 60% dos indivíduos infectados não apresenta morbidade aparente, compatível com a forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC) (DIAS, 1989). Porém, esta pode evoluir para forma cardíaca, digestiva ou mista (cardíaca e digestiva). Em razão das campanhas de saúde pública para erradicação do vetor e do melhor controle de qualidade das transfusões de sangue e derivados, a incidência diminuiu consideravelmente e, hoje, a principal questão está voltada para o contingente de pessoas infectadas. Só no Brasil, existem cerca de dois milhões de pacientes chagásicos na fase crônica (MEDEI et al., 2008).

A evolução clínica da doença pode ser influenciada tanto por fatores relacionados ao parasito, como tropismo tecidual específico e virulência; quanto ao hospedeiro, em especial à resposta imune, à resposta inflamatória e a distúrbios microvasculares. Os estudos imunológicos focalizam-se na resposta celular, devido ao fato de que a destruição tecidual observada nos pacientes chagásicos crônicos esteja intimamente associada à presença de um infiltrado inflamatório. Este por sua vez, é composto principalmente por células mononucleares que proliferam e produzem uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, quando expostas *in vitro* a antígenos do parasito ou componentes do hospedeiro. Logo, acredita-se que essas células sejam fundamentais em orquestrar a resposta imune nos pacientes chagásicos, influenciando a evolução clínica da doença (SOUZA et al., 2007).

A reação inflamatória desencadeada pela infecção pelo *T. cruzi*, é mantida pela presença persistente do parasito no hospedeiro, e leva à destruição de células, músculos e neurônios, com alterações na microcirculação e conseqüentemente fibrogênese. A disfunção endotelial tem sido relatada em diversos estudos com a doença de Chagas, estando relacionada à progressão para a forma cardíaca, a principal forma clínica da fase crônica (ROSSI et al., 1984; ROSSI et al., 1985; TANOWITZ et al., 1990; MARIN-NETO et al., 1992).

Após a infecção em humanos por agentes patogênicos, respostas imunes são montadas para controlar os agentes da infecção. O sistema de sinalização purinérgica desempenha um importante papel na modulação da resposta imune e inflamatória através de biomoléculas extracelulares, como os nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídeo adenosina (ZIMMERMANN, 2000; RALEVIC & BURNSTOCK, 2003).

Elevadas concentrações de nucleotídeos da adenina são encontradas no meio extracelular representando dano ou estímulo de células por ação de patógenos. Diversos estudos mostram que os nucleotídeos, ATP e ADP, secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas, servem como mediadores capazes de modular o processo de inflamação e trombose vascular (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). A adenosina, que é um metabólito da degradação de nucleotídeos da adenina, desempenha funções importantes como efeitos neuromodulatórios, regulação de processos inflamatórios, inibição da agregação plaquetária e vasodilatação, sendo considerada um agente cardioprotetor (ELLY & BERNE, 1992; SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997; BOROWIEC et al., 2006).

As moléculas de ATP, ADP, AMP e adenosina após desempenharem suas funções orgânicas através da ativação de receptores específicos purinérgicos da membrana celular, devem ser metabolizadas a fim de manter seus níveis extracelulares em concentrações fisiológicas. Para isto, existe um sistema constituído por enzimas ancoradas à membrana plasmática das células, como plaquetas, linfócitos e células endoteliais, denominadas ectoenzimas, ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel.

Além de possuírem importante atividade na regulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina, as ectoenzimas modulam funções no sistema imunológico e vascular tais como controle dos linfócitos, incluindo o reconhecimento do antígeno e ativação de funções efetoras das células T citotóxicas

(FILIPPINI et al., 1990), capacidade de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (MALISZEWSKI et al., 1994; KACSMAREK et al., 1996), controle da distribuição de fluxo sanguíneo e de fornecimento de oxigênio (GONZALEZ-ALONSO et al., 2002; SPRAGUE et al., 2007), além da manutenção da ativação e agregação plaquetária.

Algumas destas ectoenzimas já foram caracterizadas em protozoários, como *Trypanosoma cruzi*, sendo sugeridas como alvos potenciais para estudos racionais de desenvolvimento de novas drogas e de imunógenos para diagnósticos alternativos e imunização. Porém, ainda não há estudos demonstrando o status do sistema purinérgico em pacientes chagásicos.

Considerando que as respostas imune, inflamatória e vascular desencadeadas pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, são moduladas por moléculas sinalizadoras do sistema purinérgico, é de grande relevância a avaliação da atividade de enzimas, presentes na membrana de linfócitos e plaquetas. Estas enzimas medeiam muitos aspectos da função celular, desde o controle dos eventos pró-inflamatórios até processos pró-agregatórios em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, uma vez que estes se encontram em estado de equilíbrio entre hospedeiro e parasito.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do metabolismo do ATP na sinalização purinérgica em linfócitos e plaquetas de pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade das ectoenzimas NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC);
2. Avaliar a expressão de CD39 (NTPDase-1) em linfócitos de pacientes com FIDC;
2. Avaliar a atividade das ectoenzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, NPP e ADA em plaquetas de pacientes com forma FIDC;
3. Verificar o perfil de agregação plaquetária induzida pelo ADP em pacientes com FIDC;
4. Determinar as concentrações séricas de ATP, ADP, AMP e adenosina em pacientes com FIDC.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doença de Chagas

3.1.1 Visão geral

Descoberta em 1909, a doença de Chagas é assim denominada em homenagem ao seu descobridor, o médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas. A “tripla descoberta” de Carlos Chagas, considerada única na história da medicina, constitui um marco na história da ciência e da saúde brasileiras, onde um só cientista descobriu o vetor, o agente etiológico e ainda descreveu a sua patologia. Mesmo há mais de 100 anos de sua descoberta, ela constitui ainda um dos mais importantes problemas de saúde pública em muitos países das Américas. A doença de Chagas continua a ser a principal causadora de mortes por parasitas nas Américas, matando cerca de 20.000 pessoas a cada ano em áreas endêmicas. Estima-se que 100 milhões de pessoas estão em risco, enquanto 8 a 10 milhões já estão infectadas (CDC, 2007; MUÑOZ et al., 2009).

É considerada uma doença tropical negligenciada, com deficiências no tratamento, ausência de vacinas apropriadas, e em plena expansão mundial (HORTEZ et al., 2006; SAVINO et al., 2007). Tem por agente etiológico, o protozoário flagelado e digenético, *Trypanosoma cruzi*. Os tripanossomas primitivos eram parasitas monogenéticos de insetos não-hematófagos. Quando os insetos adquiriram o hábito de hematofagia, os tripanossomas foram submetidos a mudanças morfológicas e funcionais, desenvolvendo um flagelo e uma membrana ondulante para a sua movimentação no sangue dos vertebrados (HOARE, 1972). O protozoário vivia restrito à situação silvestre, circulando entre mamíferos do ambiente natural, através do inseto vetor ou, também, muito comumente, por via oral (ingestão de vetores e mamíferos infectados). Foi o homem quem invadiu esses ecótopos e se fez incluir no ciclo epidemiológico da doença, iniciando a endêmica doença de Chagas humana (DIAS & BORGES DIAS, 1979, VINHAES & DIAS,

2000). A infecção humana foi inicialmente rural na América Latina, porém, atualmente, estende-se do sul dos Estados Unidos até a Argentina e é encontrada também em zona urbana em desenvolvimento. A principal via de transmissão é a vetorial, por insetos hematófagos da família Reduviidae e subfamília Triatominae, vulgarmente conhecidos por “barbeiro”, “chupão” ou “fincão”. Os insetos tornam-se vetores após picarem hospedeiros infectados com *T. cruzi* (animais ou humanos). Há mais de cem espécies de triatomíneos reconhecidos, porém somente cerca de 10 são amplamente colonizadores de habitações humanas e altamente antropofílicos. O parasita também pode ser transmitido por via placentária, oral, acidentes em laboratórios, transfusão sanguínea e transplante de órgãos. Por esta razão, a doença de Chagas está emergindo em países não-endêmicos como Japão, Canadá, Alemanha, Romênia, Espanha e Estados Unidos (DORN et al., 2007; TARLETON et al., 2007).

A doença de Chagas é uma infecção de evolução crônica. As manifestações anatomoclínicas da doença resultam de múltiplos fatores e mecanismos que se associam no decorrer da infecção, onde se distinguem as fases aguda e crônica (LOPES & CHAPADEIRO, 1995).

Considerado um “assassino silencioso”, a infecção pelo *T. cruzi* leva à uma fase aguda, assintomática ou oligossintomática. A fase aguda é de curta duração (2-4 meses) e é caracterizada por febre, mal-estar, dor muscular, inchaço dos nódulos linfáticos, hepatoesplenomegalia, efusão pericárdica, e reação inflamatória no local da picada do vetor (conhecido como “chagoma de inoculação”). Na conjuntiva, pode resultar edema periorbital unilateral e inchaço de pálpebra (conhecido como “sinal de Romana”). Durante a fase aguda, os parasitos circulantes são numerosos e capazes de infectar vários tecidos no hospedeiro, incluindo músculo esquelético, tecidos linfóides, tecidos nervosos, e glândulas (DEVERA et al., 2003; SAVINO et al., 2007). Em humanos, a mortalidade ocorre em 5 a 10% dos casos não submetidos a tratamento específico e pode levar a complicações como miocardites ou meningoencefalites (PRATA, 2001). O diagnóstico é estabelecido em menos de 10% dos casos, possivelmente devido ao desenvolvimento de sintomas leves que desaparecem espontaneamente em mais de 95% dos pacientes (PUNUKOLLU et al., 2007). A fase aguda está nitidamente relacionada com a parasitemia e a evolução deve, muito provavelmente, estar relacionada à virulência da cepa e à

efetividade protetora do sistema imunológico do indivíduo infectado (HIGUSCHI, 1995).

A fase crônica é caracterizada por escassez de parasitos no sangue periférico e nos tecidos e pela presença de uma resposta imune *anti-T. cruzi* (PRATA, 1999). Durante esta fase, cinco formas anatomoclínicas podem ser distinguidas: indeterminada, cardíaca, digestiva, mista (cardíaca e digestiva) e nervosa (ANDRADE, 1958). A maioria sobrevive à fase aguda da infecção e permanece na chamada forma indeterminada da doença, a qual se caracteriza por um longo período de latência clínica, permanecendo por 10-30 anos ou por toda a vida (PRATA, 2001). Os pacientes com a forma indeterminada além de sorologia positiva e ausência de sintomas clínicos, não apresentam uma redução na resposta imune celular, possuindo também exames como eletrocardiograma e radiológicos do coração, esôfago e cólon normais. Uma pequena população destes pacientes apresenta anormalidades em algum teste cardíaco ou gastrointestinal, sendo estas frequentemente de baixa intensidade, as quais podem ocorrer ocasionalmente também em indivíduos saudáveis (PRATA, 2001). Admite-se que cerca de 60% dos infectados das áreas endêmicas da doença de Chagas pertencem à forma indeterminada (DIAS, 1989). Os pacientes durante este período apresentam baixa morbidade, sendo capazes de realizar qualquer tipo de atividade, e um excelente prognóstico, pelo menos a médio-prazo (5-10 anos). Em estudos de sobrevivência, indivíduos com a forma indeterminada apresentaram uma sobrevivência similar a de uma população saudável (MAGUIRE, et al., 1987; IANNI et al., 2001).

Após o período de latência, cerca de um terço dos pacientes apresentam manifestações relacionadas ao envolvimento de certos órgãos tais como coração, esôfago, cólon e sistema nervoso, caracterizando as formas clínicas da doença. Cerca de 20-30% da população total chagásica em áreas endêmicas evolui para uma grave descompensação cardíaca, caracterizada por arritmias, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) ou morte súbita. Em torno de 15 a 20% dos pacientes chagásicos desenvolvem alterações de motilidade, secreção e absorção no trato digestivo, especialmente esôfago e cólon, desenvolvendo as síndromes dos megas gastrointestinais (PRATA, 2001).

Entre as formas clínicas, a mais freqüente e importante, pela sua alta morbidade e mortalidade, é a cardíaca, a qual pode ser assintomática ou sintomática, onde uma cardiomiopatia crônica e inflamatória pode levar à ICC

(RIZZO et al., 1989). Carlos Chagas (1916) e Vianna (1911) desde início do século já referiam que o parasito, apesar de dificilmente identificado nos cortes histológicos, seria o responsável pela manutenção do processo inflamatório crônico cardíaco. A presença do parasito, proliferando no miocárdio, ocorreria em episódios, muito provavelmente quando houvesse uma queda na vigilância imunológica (HIGUSCHI, 1995). A expectativa média de vida diminui cerca de 9 anos nestas formas clínicas dos pacientes chagásicos crônicos (PUNUKOLLU et al., 2007).

3.1.2 Doença de Chagas e sistema imune

Após infecção por patógenos em humanos, uma resposta imunológica inata e adquirida é montada para controlar o agente da infecção. A imunidade inata é responsável pela proteção inicial contra as infecções, enquanto a imunidade adquirida se desenvolve mais lentamente e é responsável pela defesa mais tardia e mais eficaz contra as infecções. Entretanto, o controle muitas vezes não é eficiente suficientemente para eliminar o patógeno, mas limita de forma efetiva a sua replicação *in vivo*. A regulação da resposta imune adquirida é essencial não somente para controlar a replicação do parasito, mas também para minimizar a patologia mediada pela imunidade (ANTONELLI et al., 2005; SOUZA et al., 2007). No entanto, a grande maioria das infecções que envolvem a participação de agentes infecciosos parasitários, virais ou bacterianos, causa no hospedeiro um estado de estresse, levando à imunossupressão, que na realidade nada mais é que uma forma do agente etiológico evadir-se da resposta imune e estabelecer-se nesse novo ambiente, com condições necessárias para a sua perpetuação (SOUZA et al., 2007).

Os componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas, macrófagos e células natural killer (NK) parecem ter papel crucial na imunidade anti-*T. cruzi*, sendo induzida por diferentes moléculas de superfície do parasito. Através da imunidade inata há indução de genes de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12), que controlam a replicação do parasito e de componentes microbicidas como óxido nítrico (NO). Destaca-se a participação da atividade de macrófagos na resposta à infecção, visto que esta é uma das principais células-alvo do parasito e que também

exerce atividades de resistência à infecção, principalmente relacionadas à produção de TNF- α e NO (ALBERTI et al., 1996). As células NK também possuem um papel fundamental no controle da infecção por serem fonte primária inicial de IFN- γ na fase aguda. O IFN- γ produzido aumenta a síntese de IL-12 por macrófagos, promovendo a ativação de células NK e a diferenciação de células T, do tipo Th1, específicas para o parasito (resposta pró-inflamatória), além da inibição da expansão e da síntese de citocinas por linfócitos Th2 (resposta anti-inflamatória) (REED, 1995; ALBERTI, 1996).

A ação da resposta imunológica adquirida, através de linfócitos T CD4+ e T CD8+ assim como linfócitos B, contribuem à resistência contra o parasito através da secreção de citocinas de citotoxicidade celular ou de produção de anticorpos específicos. As células T desempenham importante papel na dinâmica da doença de Chagas, exibindo funções imunorregulatórias e efetoras (SOUZA et al., 2007).

A principal função dos linfócitos T na imunidade adquirida é combater as infecções causadas por microorganismos intracelulares. Os linfócitos T CD4+ podem se diferenciar em subgrupos de células efetoras que produzem grupos de citocinas, expressam moléculas de adesão e receptores de citocinas distintos, e conseqüentemente funções diferentes. Entre os subgrupos destacam-se as células T auxiliares do tipo 1 (Th1) e as células T auxiliares do tipo 2 (Th2). A eficácia das respostas imunes mediadas por células contra um microorganismo é determinada pelo equilíbrio entre a ativação das células Th1 e Th2 (ABBAS & LICHTMAN, 2009).

As células Th1 estimulam a atividade microbicida dos fagócitos e a morte dos microorganismos ingeridos e induzem a inflamação. A citocina mais importante produzida pelas células Th1 é o IFN- γ , que é um potente ativador de macrófagos, além de estimular a produção de anticorpos que promovem fagocitose de microorganismos, amplificando as respostas das células T. Os macrófagos ativados amplificam as respostas mediadas pelas células T através da produção de IL-12, além de secretar citocinas que induzem a inflamação como o fator de necrose tumoral (TNF), a IL-1 e as quimiocinas. No entanto, as células Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 que inibem a ativação de macrófagos e suprimem a imunidade mediada pelas células Th1 (Figura 1) (ABBAS & LICHTMAN, 2009).

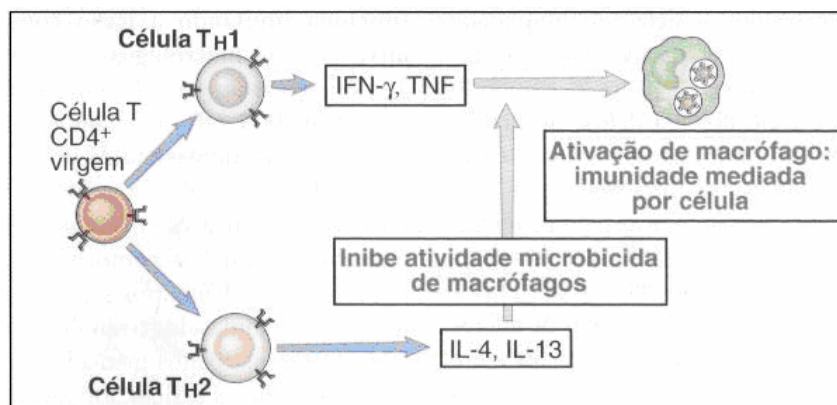


Figura 1 - Resposta Th1 e Th2 nas infecções intracelulares.
(ABBAS & LICHTMAN, 2009)

Os estudos pioneiros sobre imunidade celular de pacientes chagásicos mostraram que células mononucleares do sangue periférico, especialmente células T CD4+ e monócitos, de paciente das formas indeterminada ou cardíaca, são capazes de proliferar quando expostas *in vitro* a antígenos do parasito e a componentes do hospedeiro (DUTRA et al., 2000; SOUZA et al., 2004). Também podem produzir uma grande quantidade de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que orquestrarão respostas imunes relacionadas ao controle da diferenciação celular, da adesão e da expressão de moléculas co-estimulatórias, além de migração e recrutamento, influenciando na evolução clínica da doença (SILVA et al., 1998; SOUZA et al., 2007).

Cardillo e colaboradores (2007), por sua vez, discutiram uma nova contribuição dos linfócitos B na imunidade contra o *T. cruzi*. Ao infectarem animais geneticamente deficientes de células B, observaram diminuição na frequência de linfócitos T CD8+ no baço e no infiltrado inflamatório de tecido muscular esquelético desses animais. Além disso, estes animais apresentaram uma diminuição do infiltrado inflamatório e um aumento do número e tamanho dos ninhos de parasitos, sugerindo que, na ausência dos linfócitos B, existiria uma pobre ativação dos linfócitos T CD8+ infiltrantes e, conseqüentemente, uma menor resistência à infecção.

Os linfócitos T CD4+ e T CD8+ são as principais células envolvidas na imunidade adquirida humana contra o *T. cruzi*. Os linfócitos T CD4+ são necessários para a produção de anticorpos líticos e de citocinas que auxiliam na destruição de

formas intracelulares do parasito (TARLETON, 1996). No entanto, Cuña & Cuña (1995) sugeriram a participação dos linfócitos T CD8+ nos mecanismos imunopatológicos, a partir da observação do predomínio destas células no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas com sintomas cardíacos ou gastrintestinais, diferentemente de indivíduos assintomáticos, nos quais os linfócitos T CD4+ são predominantes. A figura 2 demonstra a participação da resposta imunológica celular em pacientes chagásicos com a forma indeterminada e cardíaca.

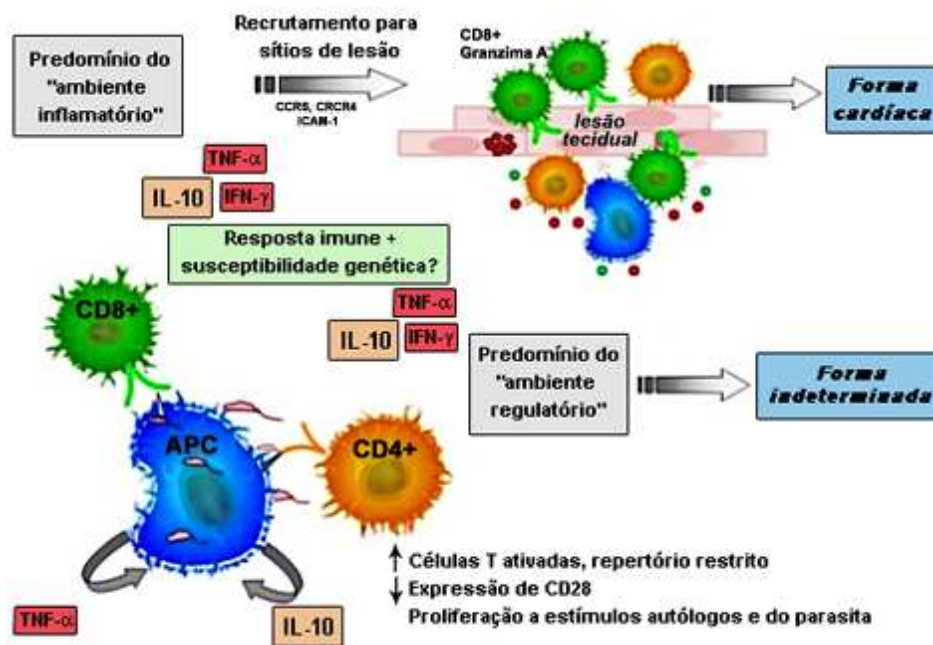


Figura 2- Resposta imune nas formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas.

(Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=163>)

Gomes e colaboradores (2003) sugeriram associação entre a produção de IFN-γ por linfócitos T e morbidade da doença de Chagas, enquanto a produção de interleucina 10 (IL-10) por macrófagos/monócitos leva à regulação da resposta imune em pacientes com a forma indeterminada. Os autores hipotetizaram que uma produção exagerada de IFN-γ contra antígenos do *T. cruzi* favorece o desenvolvimento de uma resposta tipo Th1, o que leva à progressão da doença cardíaca.

Fuenmayor e colaboradores (2005) analisaram biópsias endomiocárdicas de pacientes na fase aguda da doença de Chagas com o objetivo de avaliar a frequência e a intensidade de antígenos do *T. cruzi*, e as células T CD4+ e CD8+. Todos os pacientes com doença de Chagas mostraram algum grau de miocardite que parece estar relacionada com a presença de antígenos do parasito sendo que, tanto células T CD4+ quanto T CD8+ participaram desse processo. No entanto, a avaliação de biópsias endomiocárdicas de pacientes com miocardite chagásica crônica, demonstrou que as células T ativadas formam 95% do infiltrado inflamatório cardíaco (REIS et al., 1993; HIGUCHI, 1995) e que as células T CD4+ estão em menor proporção do que as células T CD8+. Isto representaria uma resposta imune específica à persistência de parasitos no tecido cardíaco, resultando em processo inflamatório exacerbado com conseqüentes efeitos deletérios (HIGUCHI et al., 1993; HIGUCHI, 1995).

3.1.3 Doença de Chagas e microcirculação

O processo hemostático consiste de mecanismos hemodinâmicos e bioquímicos que asseguram a obstrução de uma parede vascular traumatizada e o impedimento do sangramento dos vasos sanguíneos, evitando que ocorra um fluxo sanguíneo insuficiente para manter as funções teciduais normais (BAPTISTA-SILVA, 2004).

Sempre que um vaso ou tecido é lesionado química ou fisicamente, a hemostasia é acionada através da vasoconstrição, da formação do tampão plaquetário, da formação do coágulo sanguíneo, e da sua posterior dissolução. Nestas etapas, ocorrem interações entre os componentes teciduais, as proteínas plasmáticas, os receptores celulares, permitindo a formação rápida e eficiente de coágulos sólidos para bloquear pontos de ruptura ou lesão vascular e fazendo com que o sangue permaneça líquido e sem coágulos dentro do sistema vascular (REVEL & DOGHMI, 2004).

As plaquetas desempenham um papel fundamental na hemostasia, intervindo rapidamente na presença de lesões endoteliais. Possuem aproximadamente 3 µm de diâmetro, sem núcleo, com forma e tamanho variável (FROJMOVIC &

PANJWANI, 1976), resultando da fragmentação dos megacariócitos na medula óssea (CASTRO et al., 2006). A contagem normal em adultos é de $150-450 \times 10^9/L$, onde 70% estão presentes na circulação e 30% no baço. A produção plaquetária leva aproximadamente 4 dias e possui uma vida média de 9 dias em um ser humano normal (HARKER & FINCH, 1969). Vários hormônios e citocinas interferem no desenvolvimento dos megacariócitos, como eritropoetina e interleucinas 3 (IL-3), 6 (IL-6) e 11 (IL-11) (KAUSHANSKY, 1995).

Os componentes estruturais das plaquetas consistem, essencialmente, em membrana citoplasmática, citoesqueleto, sistema tubular denso, sistema canalicular aberto e múltiplos grânulos de secreção como representado na figura 3 (LORENZI et al., 2003).

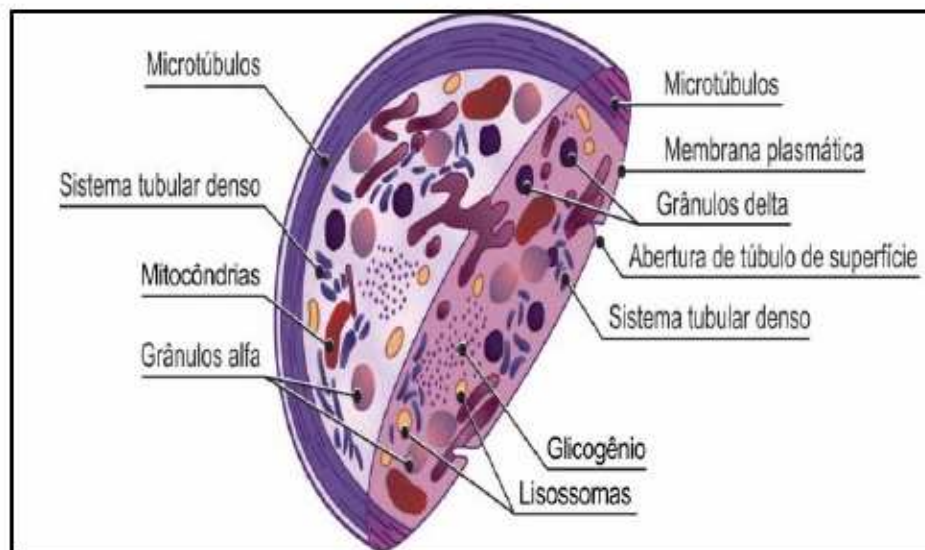


Figura 3 – Representação de uma plaqueta (LORENZI et al., 2003).

A membrana celular é constituída por uma camada bifosfolípídica, contendo muitos receptores responsáveis pelo desencadeamento da ativação plaquetária e de reações de adesão-agregação (ZAGO et al., 2004). Estes receptores são ativados por diferentes agonistas como o colágeno, fator de von Willebrand (FvW), ADP, ATP, epinefrina e a trombina. Os receptores plasmáticos são glicoproteínas (GPs) com estruturas distintas como, por exemplo, o receptor GPIb-IX-V, que é um complexo de proteínas da família das moléculas ricas em leucinas; o receptor GPVI da super-

família das imunoglobulinas; ou ainda os receptores de ADP/ATP ou de trombina, que são receptores purinérgicos e integrinas (HARTWIG, 2002).

O citoesqueleto é composto por uma rede de estruturas filamentosas que fornece a sustentação para a forma discóide da plaqueta, e por um sistema contrátil que permite a mudança da forma discóide para a forma dendrítica, perante seu estado de ativação (LORENZI et al., 2003). Esta mudança permite o prolongamento de pseudópodos, a contração interna e a liberação dos constituintes granulares.

O sistema tubular denso é um conjunto de túbulos no citoplasma, que constitui o principal local de armazenamento do cálcio intraplaquetário (LORENZI et al., 2003).

O sistema canalicular aberto consiste numa rede membranosa intracitoplasmática que permite a troca de moléculas com o meio externo, por onde ocorre a liberação dos grânulos de secreção quando a plaqueta está ativada (CASTRO et al., 2006).

Os grânulos de secreção, contendo entre 30% e 50% de proteína total da plaqueta, dividem-se em dois grupos: grânulos- α e corpúsculos densos ou grânulos- δ . Há cerca de 80 grânulos- α /plaqueta (SIXMA et al., 1989) e durante ativação plaquetária, eles fundem-se com o sistema canalicular aberto e com a superfície da membrana, secretando proteínas adesivas, como o fibrinogênio, FvW, fibronectina, vitronectina e trombospondina, que estão em alta concentração no local de lesão vascular, favorecendo a formação do trombo plaquetário (ZAGO et al., 2004). Já os grânulos densos são raros, estimando-se que haja cerca de 5 /plaqueta (SIXMA et al., 1989), contendo nucleotídeos, como ADP e ATP, serotonina e o Ca^{2+} , substâncias que promovem a ativação plaquetária (ZAGO et al., 2004).

As plaquetas circulam normalmente no sangue como entidades isoladas que não interagem umas com as outras ou com outros tipos celulares. Entretanto, sob um trauma vascular ou tecidual, com exposição do subendotélio e do colágeno subjacente, as plaquetas rapidamente aderem ao local lesado, formando um tampão hemostático primário e iniciando uma série de fenômenos que tem por finalidade evitar a hemorragia (Figura 4) (SCHAFER, 1996; LORENZI et al., 2003).



Figura 4 – Funções plaquetárias (Adaptado de SCHAFER, 1996).

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. As plaquetas passam de forma discóide à irregular devido à emissão de pseudópodos, aumentando assim a área de contato com o endotélio, tornando-se mais firmemente ancoradas (VORCHHEIMER & BECKER, 2006). As plaquetas ativadas podem se acumular na parede dos vasos das artérias, recrutar plaquetas adicionais e expandir o trombo. Através da ligação das plaquetas aos receptores das glicoproteínas e da ativação das moléculas de integrinas plaquetárias, ocorre o desenvolvimento do processo de agregação plaquetária (LEE et al., 1998; LORENZI et al., 2003). Algumas evidências sugerem a participação das plaquetas na resposta inflamatória, uma vez que, há ativação de plaquetas circulantes em doenças com componente inflamatório agindo na vasculatura (MASSBERG et al., 2002).

A agregação plaquetária é a propriedade que as plaquetas possuem de se unirem entre si quando em estado ativado, formando trombo vascular. Uma vez ativada, a plaqueta sofre ação de agonistas que se ligam a receptores de membrana da plaqueta e ativam cascatas bioquímicas (RUSSELL, 1999).

Há três vias principais de agregação plaquetária, que se inter-relacionam em várias etapas do processo. A primeira via de agregação se manifesta pela ação da fosfolipase C, que atua catalisando a formação de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ se liga aos receptores no sistema tubular denso, elevando a concentração citoplasmática de cálcio. O aumento dos níveis intracelulares de cálcio promove a contração da plaqueta, a secreção de ADP e a síntese de tromboxano A₂ (SOBOL & WATALA, 2000). A segunda via de agregação

plaquetária é mediada pelo ADP, o qual promove o recrutamento de outras plaquetas para o tampão plaquetário. A ligação do ADP ao receptor purinérgico de plaquetas leva à ativação da cascata da proteinoquinase de ativação mitogênica. Esta proteína induz a liberação de cálcio do sistema tubular denso para o citosol. O ADP caracteriza-se por ser um agente indutor da agregação plaquetária em presença de cálcio e fibrinogênio (VANNI et al., 2007). E na terceira via está envolvido o ácido araquidônico, que é liberado da membrana plaquetária por ação da fosfolipase A2 e da fosfolipase C. O ácido araquidônico é rapidamente metabolizado pelas enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase, formando as prostaglandinas G2 e H2. Esses intermediários são convertidos, pela tromboxano sintetase, em tromboxano A2, que é um potente agente agregante plaquetário (WAKEFIELD et al., 2008).

O organismo permanece equilibrado devido à hemostasia, porém, ela precisa ser controlada por mecanismos inibidores, evitando crescimento do trombo plaquetário que ocasiona oclusão vascular e que, conseqüentemente, compromete a irrigação sanguínea de diversos órgãos (DAHLBÄCK, 2005), além de desencadear a resposta inflamatória (STRUKOVA, 2001).

Alterações patológicas são encontradas na microvasculatura dos pacientes com doença de Chagas crônica, onde fenômenos trombóticos estão intimamente ligados a mecanismos fisiopatológicos primários que levam à cardiomiopatia (MARIN-NETO et al., 2009).

Desde a década de 80, o envolvimento de fenômenos microvasculares na patogênese da doença crônica tem sido bem documentado, onde diversas alterações dinâmicas nos vasos coronarianos, como vasodilatação, formação de aneurismas e microespaços foram descritos na infecção aguda pelo *T. cruzi* em camundongos, de modo semelhante ao observado em outras cardiomiopatias congestivas e relacionadas à microcirculação (FACTOR et al., 1985; ROSSI et al., 1984).

Estudos prévios realizados em modelos animais evidenciaram que agregados plaquetários induzidos por ADP na microcirculação cardíaca estariam associados com lesões isquêmicas do miocárdio, arritmia cardíaca e morte súbita (JORGENSEN et al., 1967; JORGENSEN et al., 1970).

Em um modelo experimental de miocardite chagásica crônica em camundongos, foi observado macroscopicamente cardiomegalia com hipertrofia e

dilatação de câmaras ventriculares associadas com aneurisma apical. Neste mesmo estudo, os resultados microscópicos apresentaram lesões focais de necrose miocitolítica e degeneração miocárdica associada com um predominante exudato inflamatório mononuclear acompanhado por fibrose intersticial e pseudocistos como demonstrado na figura 5 (ROSSI et al., 1984). A evidência de doença microcirculatória na cardiomiopatia crônica experimental foi obtida através da detecção de agregados plaquetários e trombose oclusiva em pequenos vasos coronarianos epi e intramiocárdicos, caracterizando microangiopatia. Estas alterações são importantes na patogênese de degeneração focal para o desenvolvimento da cardiomiopatia (ROSSI et al., 1984).

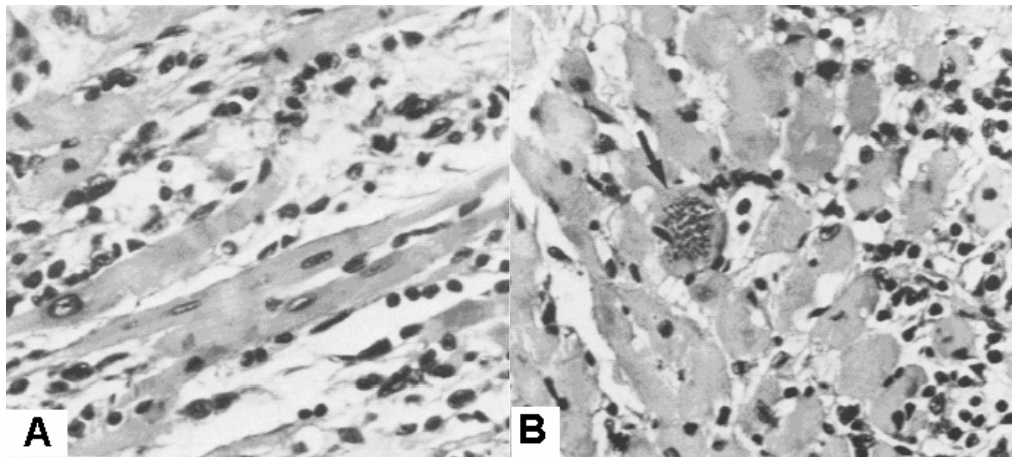


Figura 5 – Miocárdio de modelo experimental infectado com *T. cruzi* (cortes histológicos). A) Necrose miocitolítica. Infiltrado inflamatório denso. Hialinização de miofibras. Edema intersticial; B) Miofibras contendo pseudocisto. Mudanças degenerativas das células do miocárdio. Infiltrado inflamatório mononuclear. Edema intersticial e fibrose. (ROSSI et al., 1984).

A disfunção das células endoteliais relacionada à infecção pelo *T. cruzi* com conseqüente aumento da reatividade plaquetária foi demonstrada em estudos *in vitro* (TANOWITZ et al., 1990). A interação entre as plaquetas e o endotélio lesado ou a superfície subendotelial poderia estimular a ativação de plaquetas, com subseqüente produção de substâncias vasoativas, como tromboxano A2 e fator de crescimento derivado das plaquetas, a partir de células do infiltrado inflamatório, contribuindo para hipoperfusão microvascular (TANOWITZ et al., 1990, ROSSI, 1992; RAMOS & ROSSI, 1999) e conseqüente hipóxia miocárdica. Além disto,

infecções *in vitro* pelo *T. cruzi*, demonstraram que as alterações no endotélio com conseqüente exposição do colágeno poderiam favorecer a agregação plaquetária (ROSSI, 1997) e que o aumento na produção de endotelina, a qual medeia espasmo arterial e inibe o mensageiro AMPc, estimularia a adesão plaquetária à parede vascular (MORRIS et al., 1992; MARIN-NETO et al., 2009).

Estudos posteriores realizados por Herrera e colaboradores (2003) observaram em pacientes chagásicos crônicos uma maior atividade plasmática de antitrombomodulina, sugerindo uma intensa formação de fibrina intravascular bem como um dano endotelial, além de altos níveis de produto de degradação de fibrina (PDF) e D-dímeros que refletem a presença de fibrina já formada.

Uma direta participação da infecção do *T. cruzi* que causa dano nas células endoteliais (ROSSI, 1997) e dano no endotélio por células efectoras do sistema imune foram relatados (ANDRADE et al., 1994), a fim de elucidar os mecanismos responsáveis pela trombose plaquetária oclusiva e pelo espasmo na microcirculação.

Através de técnicas modernas, tem sido observada uma parasitemia em grande quantidade de indivíduos durante a fase crônica da doença (BRITTO, et al., 1995) sendo que a presença do *T. cruzi* estaria associada com o aparecimento de lesões cardíacas (TARLETON, 2001). No entanto, foi evidenciado que formas tripomastigotas (infectantes) do *T. cruzi* produzem a enzima neuraminidase, que remove o ácido siálico da superfície de células endoteliais e do miocárdio dos mamíferos (LIBBY et al., 1986; MARIN-NETO et al., 2009). A perda deste componente protetor da superfície endotelial pode causar a agregação plaquetária e a trombose microvascular. Ferreira e colaboradores (2005) apresentaram que calreticulina, uma proteína ligadora de cálcio presente no *T. cruzi* que é similar à humana, pode modular o sistema complemento e inibir a angiogênese. Isto poderia constituir um mecanismo molecular potencial que provocaria dano e disfunção microvascular.

No entanto, as células inflamatórias também podem contribuir à hipoperfusão microvascular e ao dano miocárdico, através da secreção de citocinas (WEINSTEIN & FENOGLIO, 1987). As células endoteliais e os monócitos de sangue periférico de humanos infectados com *T. cruzi* têm apresentado um aumento na síntese de interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL6) (VAN VOORHIS, et al., 1992), que levam a alterações na função endotelial, tais como o recrutamento de leucócitos, a

coagulação (GIMBRONE, 1984) e a proliferação de músculo liso (LIBBY et al., 1988).

Episódios de tromboembolismo são frequentemente vistos tanto na fase aguda quanto crônica da doença de Chagas. A prevalência de trombo intracardíaco tem sido estimado em 15-70% nos pacientes chagásicos, enquanto periféricos estão presentes em 60% dos pacientes, e geralmente envolve tromboembolismo pulmonar, trombose em artérias renal e esplênica ou acidente vascular cerebral (AVC). Estes episódios estão relacionados principalmente com alterações no fluxo sanguíneo vistos na cardiomiopatia chagásica que causam arritmias, dilatação ventricular e aneurismas. Portanto, fenômenos inflamatórios e de hipercoagulabilidade contribuiriam para o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica (REVERTER, 2006).

3.2 Sistema de sinalização purinérgica

O sistema purinérgico é caracterizado por ser uma via de sinalização importante em diversos tecidos, desencadeando múltiplos efeitos celulares, incluindo resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004).

A sinalização purinérgica envolve três principais componentes (ATKINSON et al., 2006):

- 1) nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, que são as moléculas mediadoras da sinalização;
- 2) receptores purinérgicos específicos (P2X, P2Y e P1), através dos quais os nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos;
- 3) as ecto-enzimas, proteínas responsáveis pelo controle dos níveis dos mediadores no meio extracelular.

Diferentes tipos celulares, como plaquetas, linfócitos, células endoteliais entre outros, expressam distintos conjuntos de componentes de sinalização purinérgica descritos acima, permitindo a formação de complexos personalizados de sinalização purinérgica (figura 6) (JUNGER, 2011).

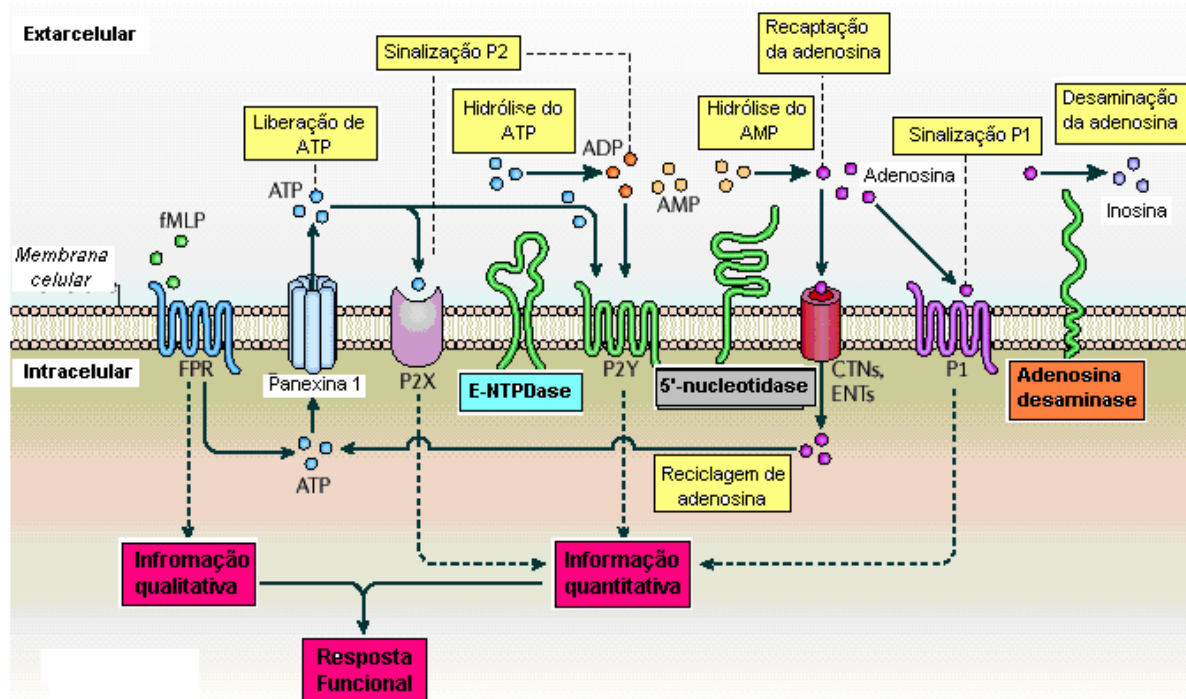


Figura 6 – Representação dos componentes do sistema purinérgico (Adaptado de JUNGER, 2011).

3.2.1 Nucleotídeos e nucleosídeos

Os nucleosídeos são moléculas resultantes da união de uma base nitrogenada (púrica ou pirimídica) a uma pentose. Uma vez que os nucleosídeos são fosforilados por quinases específicas ocorre a formação de um nucleotídeo (figura 7). Os principais nucleotídeos que exercem funções biológicas são: o ATP, o ADP e o AMP (ATKINSON et al., 2006).

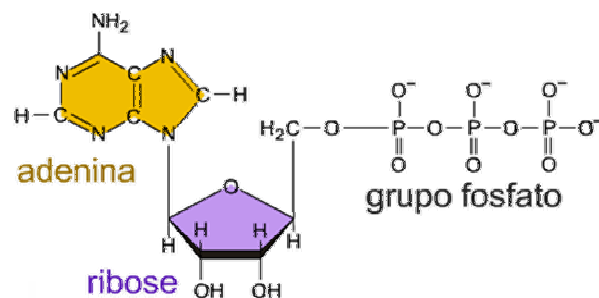


Figura 7- Estrutura de um nucleotídeo de adenina (ATP).

Há significativo aumento na concentração de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares liberados das células em sítios inflamatórios e de estresse vascular mecânico ou oxidativo. Os ectonucleotídeos e seus metabólitos exercem seus efeitos através de receptores específicos na membrana plasmática, além de servirem como substratos para ectoproteínas quinases (ATKINSON et al., 2006).

No entanto, os nucleotídeos extracelulares podem estar relacionados com o desenvolvimento de várias patologias incluindo desordens do sistema imune e doenças neurodegenerativas e vasculares (BOURS et al., 2006; ROBSON et al., 2006).

Extracelularmente, o ATP participa de uma série de processos biológicos como: neurotransmissão, contração muscular, função cardíaca, agregação plaquetária, metabolismo do glicogênio hepático e processos inflamatórios (TORRES et al., 2002).

O ATP, liberado no meio extracelular por dano ou estímulo celular por ação de patógenos, é interpretado pelo sistema imune como um “sinal de perigo” e participa em vários aspectos do estabelecimento de uma resposta inflamatória. Está envolvido no desenvolvimento da inflamação, por uma combinação de ações, entre elas a secreção de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , IL-12 e TNF- α) e a liberação de histaminas por mastócitos, provocando a produção de prostaglandinas (DI VIRGILIO 1998, LANGSTON et al., 2003). O ATP também exerce efeitos na trombo-regulação, pois é liberado dos grânulos plaquetários, juntamente com o ADP, no momento que ocorre ativação das plaquetas. O ATP tem um duplo efeito sobre a agregação das plaquetas, ou seja, em baixas concentrações ele induz a agregação plaquetária, enquanto que em altas concentrações ele provoca a inibição deste fenômeno (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997).

O ADP é o primeiro produto gerado na hidrólise do ATP, sendo conhecido por induzir a agregação plaquetária, alterar a forma das plaquetas, aumentar o cálcio citosólico e inibir a adenilato ciclase ativada (PARK & HOURANI, 1999). Em situações de disfunção ou dano vascular, o ADP é liberado do interior de grânulos existentes nas plaquetas, sendo então considerado o agonista mais importante do recrutamento plaquetário e o indutor da formação de trombos no interior de vasos (MARCUS et al., 2003).

O AMP é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP (BARSOTTI & IPATA, 2004) que exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio no

metabolismo, servindo também como substrato para a formação da adenosina (CUNHA, 2001; LATINI & PEDATA, 2001).

Formada a partir do precursor ATP nos espaços intra e extracelulares, a adenosina (BARSOTTI & IPATA, 2004) desempenha um papel importante como agente anti-inflamatório endógeno (CRONSTEIN, 1994) e imunossupressor, através da inibição da liberação de citocinas, da adesão de células imune e do funcionamento de linfócitos citotóxicos (CRONSTEIN et al., 1983).

A adenosina inibe a agregação plaquetária induzida pelo ADP, tornando-se um agente protetor dos vasos e artérias, protegendo os mesmos da instalação da placa arterosclerótica (SPRONK et al., 2004; DUARTE et al., 2007). Também apresenta uma ação cardioprotetora em episódios de isquemia ou hipóxia (MINAMINO et al., 1996, HASKO & CRONSTEIN, 2004) e insuficiência cardíaca, atenuando a liberação de catecolaminas, aumentando o fluxo sanguíneo coronário e inibindo a ativação de plaquetas e leucócitos. A função protetora da adenosina se manifesta pela vasodilatação coronariana e de vasos colaterais, aumentando o suprimento de oxigênio para os tecidos (HASKO & CRONSTEIN, 2004; KINUGAWA et al., 2006).

3.2.2 Receptores purinérgicos

Uma vez liberados no espaço extracelular, os nucleotídeos da adenina e a adenosina, desempenham suas funções biológicas através da ligação a receptores purinérgicos específicos presentes na membrana celular (DI VIRGILIO et al., 2001).

Os receptores purinérgicos são divididos baseado em suas propriedades farmacológicas e estruturais em três principais famílias (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998): receptores P2X, receptores P2Y e receptores P1.

Ao longo das últimas duas décadas, um total de 19 subtipos diferentes de receptores purinérgicos que reconhecem o ATP extracelular, a adenosina e nucleotídeos relacionados foram clonados e caracterizados, incluindo oito subtipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14), sete subtipos de receptores P2X (P2X1-7) e quatro subtipos de receptores P1 (A1, A2a, A2b e A3) (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

Os receptores P2X estão ligados a canais iônicos, sendo denominados de ionotrópicos. Estes respondem somente ao ATP, facilitando o influxo de cátions extracelulares, como o íon cálcio. Os receptores P2Y estão acoplados a diferentes proteínas G, sendo denominados de metabotrópicos. Eles respondem ao ATP e a outros nucleotídeos, incluindo o ADP, o UTP e o UDP, mas não ao AMP (DI VIRGILIO et al., 2001).

Os receptores P1 reconhecem a adenosina e também são metabotrópicos (BURNSTOCK, 2007). Os receptores subtipos A2a e A2b estão acoplados à proteínas estimulatórias G (G_s) e tipicamente suprimem as respostas celulares por aumentar os níveis de AMPc intracelulares. Enquanto, os receptores subtipos A1 e A3 estão acoplados a proteínas $G_{i/o}$ ou $G_{q/11}$ e promovem a ativação celular (JUNGER, 2011).

O ATP liberado no meio extracelular exerce seus efeitos ao se ligar a receptores P2X ou a P2Y (figura 8), e conseqüentemente é metabolizado à adenosina por ectoenzimas localizadas na superfície da membrana celular, que controlam seus níveis extracelulares. A adenosina formada, por sua vez, exercerá seus efeitos biológicos através da ativação de receptores P1 (DI VIRGILIO et al., 2001).

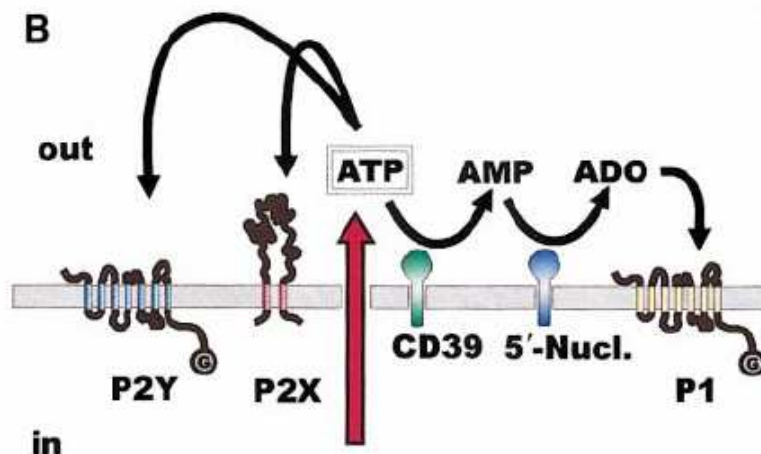


Figura 8 - Liberação de ATP no meio pericelular (DI VIRGILIO et al., 2001).

3.2.3 Ectoenzimas

O controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos de adenina e adenosina, assim como da ativação dos receptores purinérgicos é fundamental na manutenção dos processos fisiológicos de sinalização purinérgica incluindo desenvolvimento, fluxo sanguíneo, secreção, inflamação e trombo-regulação (ROBSON et al., 2006). Esse controle é realizado por uma cascata de enzimas localizadas na superfície celular que sequencialmente degradam nucleotídeos e nucleosídeos, gerando seus respectivos metabólitos (BOROWIEC et al., 2006), finalizando a ativação dos receptores purinérgicos e evitando a dessensibilização desses receptores (JUNGER, 2011). As ectoenzimas também podem ser encontradas na forma solúvel no meio intersticial ou em fluídos corporais (BOURS et al., 2006).

As ectonucleotidasas são ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e incluem diversos membros das seguintes famílias: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDases), Ecto-Nucleotídeo pirofosfatases/ fosfodiesterases (E-NPPs), Fosfatase Alcalina e Ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT). Elas revelam não somente uma sobreposição de distribuição tecidual (figura 9), mas também uma sobreposição de substratos específicos. Outra ectoenzima importante no metabolismo purinérgico é a adenosina deaminase (ADA), responsável pela degradação do nucleosídeo adenosina (ZIMMERMANN, 2001).

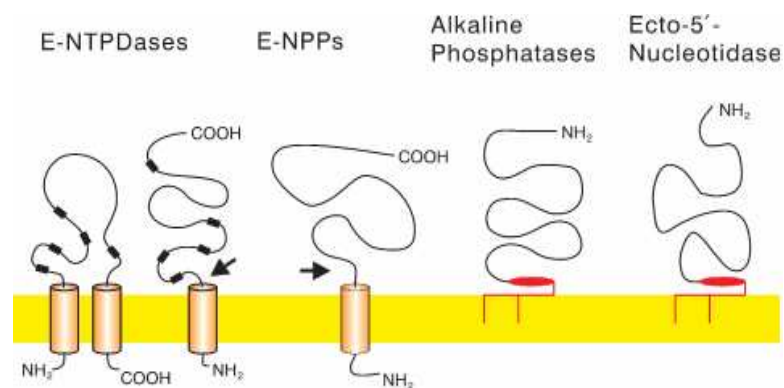


Figura 9 - Topografia das ectonucleotidasas (Adaptado de ZIMMERMANN, 2001).

Estas enzimas atuam em conjunto, formando um complexo multienzimático (figura 10) que tem início com a ação da NTPDase e da NPP, as quais catalisam a

hidrólise do ATP e do ADP formando AMP. Em seguida, a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina, que por fim é degradada pela ADA gerando inosina (BOURS et al., 2006). A fosfatase alcalina além de hidrolisar nucleotídeos di, tri e monofosfatados também é responsável pela liberação de fosfato inorgânico de uma variedade de compostos orgânicos, incluindo proteínas, além de hidrolisar PPi (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001; YEGUTKIN, 2008).

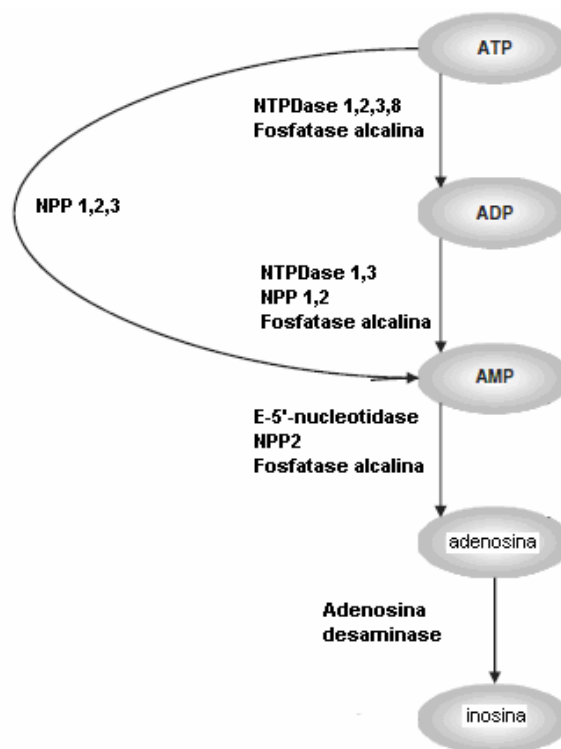


Figura 10 – Representação da ação das ectoenzimas no metabolismo dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e nucleosídeo adenosina (Adaptado de BOURS et al., 2006).

3.2.3.1 NTPDase

A família ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase; EC 3.6.1.5) representa uma classe de enzimas que se caracteriza pela capacidade de hidrolisar uma variedade de nucleosídeos 5'-trifosfato e nucleosídeos 5'-difosfato (como ATP e ADP, respectivamente) produzindo monofosfonucleotídeos correspondentes (como AMP) e fosfato inorgânico (Pi).

Estruturalmente, os membros desta família possuem 5 regiões denominadas regiões conservadas da apirase (ACRs), que apresentam grande similaridade na sequência de aminoácidos e estão envolvidas no reconhecimento do substrato, ligação e hidrólise (ZIMMERMANN, 2001).

Estas ectoenzimas estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos e patológicos em diversos tecidos. Muitas das suas ações biológicas representam conseqüências da atividade fosfohidrolítica dos nucleotídeos extracelulares que limita os efeitos mediados pela ativação dos receptores P2, além do envolvimento na produção de adenosina, que por sua vez exercerá seus efeitos através da ativação de receptores P1 ou participará da via de recuperação de nucleotídeos (BURNS, 1990).

Oito diferentes genes *E-NTPD* codificam os membros da família E-NTPDase (Figura 11). De acordo com a nomenclatura atual, todos os membros desta família são chamados de NTPDase e classificados na ordem de descoberta e caracterização (ROBSON et al., 2006), os quais são diferenciáveis através da preferência por um ou outro substrato, pela presença de cátions divalentes, localização celular e também pelo tipo de produto formado (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006).

Os genes da NTPDase são expressos não somente em vertebrados, mas também em invertebrados, plantas, fungos e importantes patógenos humanos, como *Herpetomonas muscarum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis*, *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*, agindo como facilitadores da infecção, estando possivelmente envolvidos com a captação de purinas, capacidade infectiva e modulação da resposta imune do hospedeiro (ALVES-FERREIRA et al., 2003; BERMUDEZ et al., 1994; BERREDO-PINHO et al., 2001; DE JESUS et al., 2002; PENIDO et al., 2007; FIETTO et al., 2004).

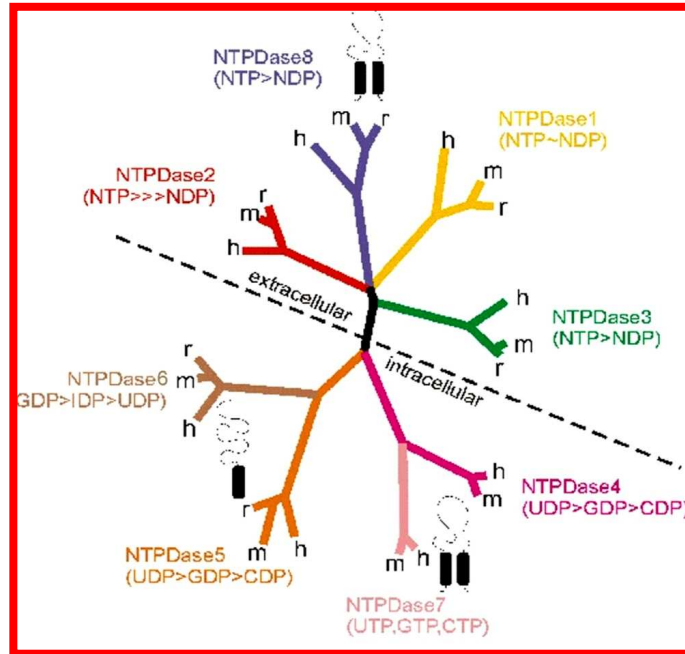


Figura 11 - Membros da família das NTPDases (Adaptado de ROBSON et al., 2006).

As NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão localizadas na membrana celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular e requerem Ca^{2+} ou Mg^{2+} para sua máxima atividade, sendo inativas na ausência desses cátions (ZIMMERMANN, 2001; KUKULSKI et al., 2005; ROBSON et al., 2006). Todas as NTPDases localizadas na superfície celular consistem de um domínio amino-terminal citoplasmático, um domínio transmembrana, um domínio catalítico glicosilado extracelular, um segundo domínio transmembrana e um domínio carboxi-terminal citoplasmático. Estas NTPDases estão frequentemente associadas com resposta a dano tissular, e o aumento de sua expressão leva ao aumento das atividades ATPase e ADPase nas células (WANG et al., 1997).

A primeira a ser identificada e descrita foi a NTPDase-1, como proteína CD39 em células linfóides, representando um marcador de ativação de linfócitos B (MALISZEWSKI et al., 1994). Subsequentemente, também foi identificada em linfócitos NK, linfócitos T ativados, monócitos, assim como em células dendríticas e plaquetas (KANSAS et al., 1991; FAVALORO, 1993; GODING, 2000; ROBSON et al., 2006; ATKINSON et al., 2006).

A NTPDase-1 foi caracterizada em linfócitos de sangue periférico humanos por Leal e colaboradores (2005), e foi demonstrado que sua atividade em células B é maior do que em células T (PLESNER, 1995). Dentre as principais funções

imunoreguladoras mediadas pela atividade da NTPDase-1 estão a expressão de citocinas, a adesão célula-célula, a proliferação celular, a apoptose via modulação dos níveis de ATP, e a produção de adenosina, que possui efeitos imunossupressores (MIZUMOTO et al., 2002; ROBSON et al., 2006).

No sistema vascular, a NTPDase-1 desempenha um papel importante no sistema hemostático, uma vez que ela controla os efeitos pró-trombóticos e pró-inflamatórios de nucleotídeos como o ATP e o ADP, prevenindo assim a formação de coágulos e vaso-occlusão (YEGUTKIN, 2008).

A NTPDase-1 hidrolisa nucleosídeos di e trifosfatados em proporções semelhantes, portanto, hidrolisa ATP quase que diretamente a AMP com uma produção transitória de pequenas quantidades de ADP. É considerada a ecto-nucleotidase dominante na vasculatura (ENJYOJI et al., 1999; ROBSON et al., 2006) e a sua ação fosfohidrolítica limita a ativação e a agregação plaquetária induzida pelo ADP.

A NTPDase-2, é particularmente associada com as superfícies adventícias dos vasos (ROBSON et al., 2005) e células do sistema nervoso central e periférico (ROBSON et al., 2006). A enzima presente no sistema vascular pode regular ou inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP ou ATP (YEGUTKIN, 2008). Destaca-se por uma atividade hidrolítica preferencialmente à nucleosídeos trifosfatados, podendo induzir conseqüentemente ativação plaquetária por hidrolisar o ATP a ADP, e desfosforilar o ADP a AMP muito lentamente (ZIMMERMANN, 2001; KUKULSKI et al., 2005).

Embora a maioria das NTPDases esteja presente na superfície celular, há quatro membros localizados no meio intracelular entre eles estão NTPDases 4,5,6 e 7 (ZIMMERMANN, 2001).

3.2.3.2 5'-nucleotidase

A enzima 5'-nucleotidase (5'-NT; EC 3.1.3.5) pertence a uma superfamília de dinuclear metalofosfoesterases, a qual hidrolisa diferentes substratos, incluindo fosfoproteínas, nucleotídeos e ácidos nucléicos (HUNSUCKER et al., 2005; STRATER, 2006). Amplamente distribuída em bactérias, plantas e animais, a enzima

catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster de vários nucleosídeos 5'-monofosfatados (ex.: AMP) a seus respectivos nucleosídeos (ex.: adenosina) (ZIMMERMANN, 1996). Até o momento, sete membros da enzima 5'-NT foram isolados e caracterizados em humanos, diferindo entre si através das suas propriedades moleculares e cinéticas, bem como de sua especificidade pelo substrato e localização celular (BOROWIEC et al., 2006). Cinco membros estão localizados no citoplasma, um na matriz mitocondrial e um ancorado à membrana plasmática externa, sendo este uma ecto-5'-NT (E-5'-NT) (HUNSUCKER et al., 2005). Embora hidrolise uma variedade de nucleosídeos 5'-monofosfatados, foi demonstrado que a 5'-NT tem maior afinidade por AMP, com valores de K_m na faixa de micromolaridade, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN, 2001).

A E-5'-NT ativa é um dímero composto de subunidades de 71kDa ancorado à membrana plasmática por uma glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sitio catalítico voltado para o meio extracelular (figura 12) (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER et al., 2005).

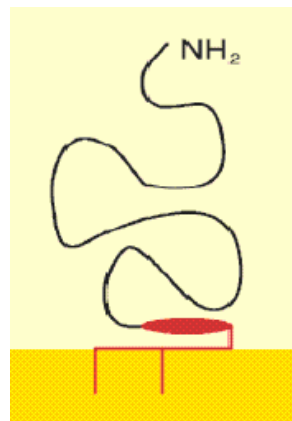


Figura 12 - Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana (Adaptado de ZIMMERMANN, 2001).

A enzima, além de participar da finalização das ações de nucleotídeos como ATP e ADP, é importante para reciclagem de nucleotídeos extracelulares, os quais são convertidos pela E-5'-NT e internalizados através de transportadores de nucleosídeos específicos (figura 13). Como outras enzimas localizadas na superfície celular, a E-5'-NT, também conhecida como CD73, tem sido implicada em funções

não-enzimáticas como ativação de células T, adesão célula-célula (RESTA et al., 1998; ZIMMERMANN, 2001; STRATER, 2006) e sinalizações transmembranas (KAWASHIMA et al., 2000).

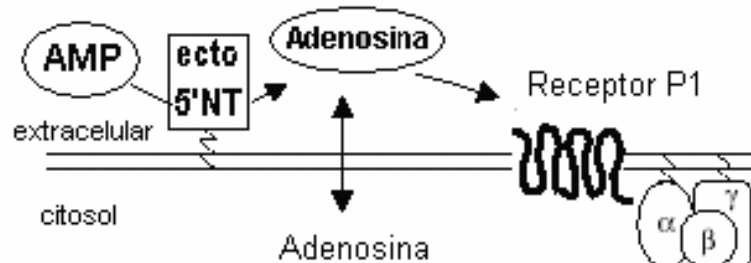


Figura 13 – Participação da ecto-5'-nucleotidase no metabolismo de nucleotídeos de adenina e produção de adenosina (Adaptado de HUNSUCKER et al., 2005).

3.2.3.3 NPP

A família ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP; EC 3.1.4.1) consiste de sete enzimas (NPP1-7) relacionadas estruturalmente, localizadas na superfície celular, expressas como ectoenzimas transmembranas ou como enzimas secretadas (figura 14) (STEFAN et al., 2005; RUCKER et al., 2007). Formas solúveis de NPP1, NPP3, NPP6 e NPP7 têm sido identificadas (BELLI et al., 1993; YEGUTKIN et al., 2003; SAKAGAMI et al., 2005), no entanto, NPP2 é sintetizada como uma pré-pró-enzima e somente existe como uma proteína secretada (JANSEN et al., 2005).

E-NPPs hidrolisam ligações pirofosfato ou fosfodiéster em uma ampla variedade de substratos, como nucleotídeos, ácidos nucléicos, fosfoésteres de colina e fosfolípídeos, resultando na liberação de 5'-monofosfatos (BOLLEN et al., 2000; GODING et al., 2003; STEFAN et al., 2005), porém as diferentes isoformas apresentam especificidade por determinados substratos (figura 15) (STEFAN et al., 2006).

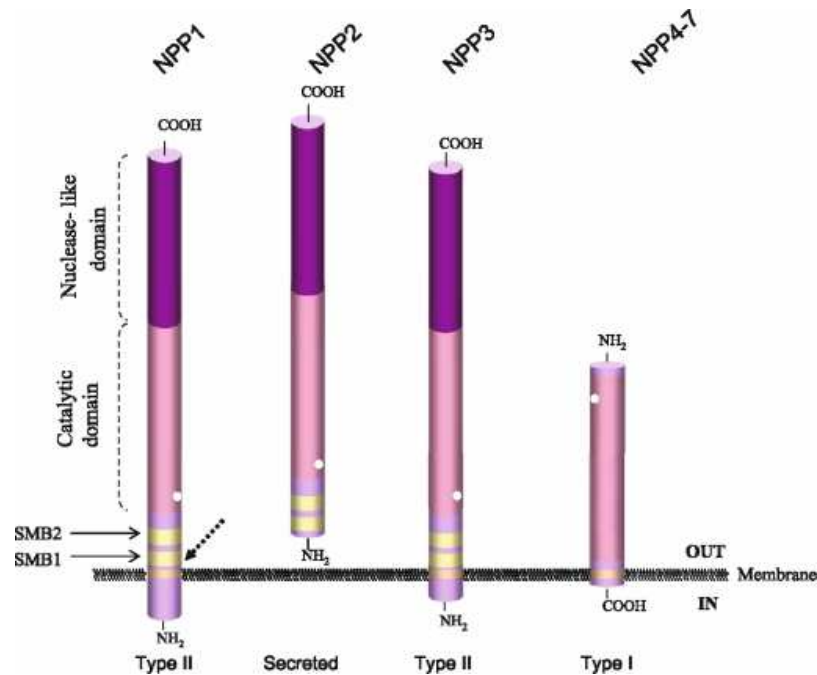


Figura 14 – Representação estrutural da família E-NPP (STEFAN et al., 2006).

Somente os três primeiros membros desta família (NPP 1, 2 e 3) são relevantes no contexto da cascata de sinalização purinérgica, por serem capazes de hidrolisar uma variedade de nucleotídeos. Os membros NPP1-3 são classificados como glicoproteínas transmembranas tipo II, com um curto domínio amino terminal intracelular, um domínio transmembrana simples, e um grande domínio voltado para espaço extracelular (CIMPEAN et al., 2004). NPP1-3 têm sido detectadas em quase todos tecidos (BOLLEN et al., 2000), embora isoformas individuais sejam geralmente confinadas a subestruturas específicas e/ou tipos celulares (STEFAN et al., 2006; RUCKER et al., 2007).

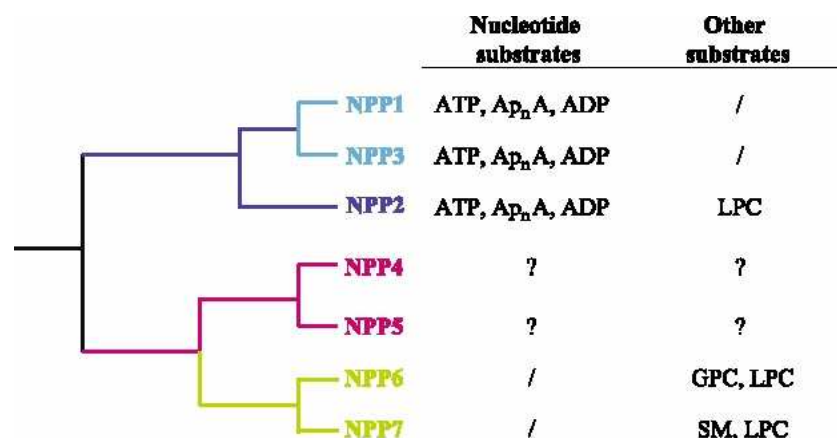


Figura 15 – Representação de alguns substratos específicos das E-NPPs (STEFAN et al., 2006).

As E-NPPs possuem múltiplos e relacionados papéis fisiológicos, regulando processos intra e extracelulares, incluindo reciclagem de nucleotídeos, modulação da sinalização dos receptores purinérgicos, regulação dos níveis de pirofosfato extracelular, diferenciação celular, estimulação da motilidade celular, atividade das ecto-quinases e provavelmente, regulação do receptor de insulina (BOLLEN et al., 2000).

3.2.3.4 Adenosina desaminase

A enzima adenosina desaminase (ADA; CD26; E.C. 3.5.4.4) faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação seqüencial dos nucleotídeos e nucleosídeos da adenina (YEGUTKIN, 2008). É responsável por catalisar a desaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxinosina, respectivamente (RESTA et al., 1998; ROBSON et al., 2006).

Esta enzima é encontrada em praticamente todos os vertebrados. Em humanos existe na forma de duas isoenzimas classificadas como: ADA1 e ADA2, cada uma com suas particulares propriedades bioquímicas (SHAROYAN et al., 2006).

A ADA1 é um monômero com massa molecular de aproximadamente 40 kDa, cuja localização é principalmente citosólica. Esta isoenzima é encontrada em todas as células e tecidos humanos, apresentando alta atividade em linfócitos e monócitos. Tem sido demonstrado que quase toda atividade da ADA humana é atribuída a esta isoenzima (ZAVIALOV & ENGSTROM, 2005).

Apesar de sua localização intracelular, ADA1 pode estar combinada com uma glicoproteína dimérica não específica de aproximadamente 200kDa, designada como proteína combinante (CP), formando o complexo ADA-CP que constitui uma ecto-ADA, localizada na superfície celular (TSUBOI et al., 1995).

Diferentemente da ADA1, a ADA2 apresenta diferenças tanto estruturais quanto cinéticas e é encontrada predominantemente no soro de indivíduos normais (UNGERER et al., 1992). Sua massa molecular é de aproximadamente 100 kDa e representa a menor parte da atividade da ADA total em tecidos. A maioria das células humanas contém pequena quantidade de ADA2 e provavelmente sua maior

fonte seja o sistema monócito-macrófago (GAKIS, 1996). Dados recentes têm sugerido que ADA2 no plasma humano pode ser secretada por monócitos ativados em processos inflamatórios, tendo a habilidade de regular a proliferação celular (IWAKI-EGAWA et al., 2006).

A regulação da concentração da adenosina extracelular, foi uma das primeiras funções fisiológicas atribuídas à ecto-ADA, logo após sua descoberta na membrana celular (FRANCO et al., 1997). A adenosina é liberada de células, dependendo da sua concentração intracelular ou ser proveniente da degradação do ATP extracelular devido à ação de ecto-nucleotidases. O controle da sinalização adenosinérgica também pode ser exercido através da via de recuperação da adenosina através de transportadores de nucleosídeos, seguida por fosforilação à AMP pela adenosina quinase ou desaminação à inosina pela ADA citosólica (figura 16) (HASKÓ & CRONSTEIN, 2004).

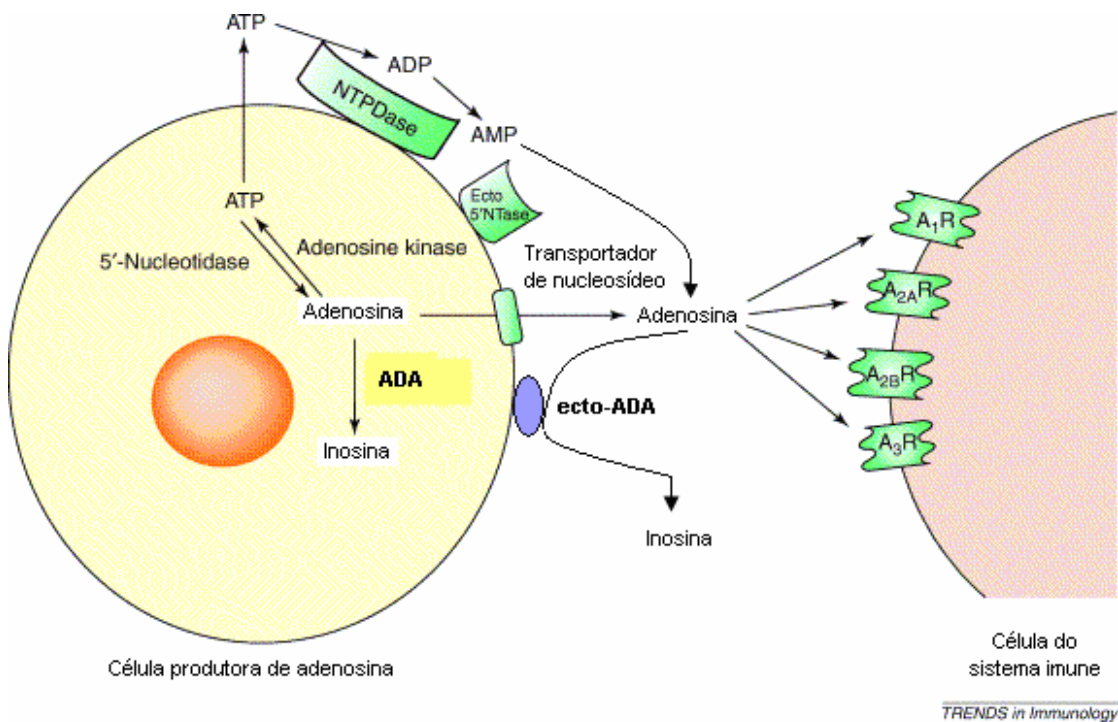


Figura 16 – Principais vias envolvidas no metabolismo da adenosina (Adaptado de HASKÓ & CRONSTEIN, 2004).

Além do importante papel na regulação dos níveis extracelulares de adenosina, a ecto-ADA desempenha funções independentes de sua atividade

enzimática (FRANCO et al., 1998). Estas funções extra-enzimáticas estão associadas à ligação da ecto-ADA a três diferentes moléculas da superfície celular incluindo a CD26 e receptores de adenosina A1 e A2b. Desta forma, foi proposto que a ecto-ADA atue como uma molécula co-estimulatória de receptores de adenosina e/ou CD26 (MARTIN et al., 1995; CIRUELA et al., 1996; HERRERA et al., 2001).

A primeira proteína de superfície celular capaz de ancorar a ecto-ADA à membrana plasmática foi identificada como CD26 por Kameoka e colaboradores (1993). A proteína CD26, por sua vez, tornou-se conhecida como um marcador molecular de ativação de células T (FOX et al., 1984; FRANCO et al., 1997), pois quando estas células estão ativadas, o nível de expressão da CD26 aumenta consideravelmente. Martin e colaboradores (1995) demonstraram que a ecto-ADA poderia atuar como uma molécula co-estimulatória, uma vez que, a proliferação celular é acelerada quando células T periféricas são ativadas na presença da ecto-ADA.

Os receptores de adenosina A1 e A2b também são proteínas responsáveis pelo ancoramento da ecto-ADA à membrana (SAURA et al., 1996; HERRERA et al., 2001). Sugere-se que esta interação aumenta a afinidade da adenosina ao seu receptor específico, e conseqüentemente permite eficiência nos seus processos de sinalização (FRANCO et al., 1997; ROMANOWSKA et al., 2007).

No sangue periférico, a ecto-ADA é encontrada na maioria dos monócitos e células B, assim como em 10-20% de células T (ARAN et al., 1991; FRANCO et al., 1997). Além de maior porcentagem de células B expressarem ADA na sua superfície, o número de moléculas de ADA na membrana plasmática das células B é muito maior do que das células T, entretanto, a atividade enzimática da ecto-ADA é muito maior em células T do que em células B. Portanto, alterações na atividade da ecto-ADA podem ocorrer como conseqüência da variação em sua expressão em tecidos e células (ARAN et al., 1991; FRANCO et al., 1997).

A ecto-ADA por ser principalmente encontrada em linfócitos de sangue periférico de humanos, desempenha um papel chave no sistema imune, uma vez que está diretamente relacionada com a proliferação, a maturação e a função destas células (GORELL et al., 2001).

4 MANUSCRITOS

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

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos: *Clinical Biochemistry* (Manuscrito I) e *Thrombosis Research* (Manuscrito II).

Manuscrito I: NTPDase and ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease.

Manuscrito II: Purinergic system ectoenzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas' disease.

Type of paper: Clinical investigation, full paper

NTPDASE AND ADA ACTIVITIES ARE ALTERED IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS' DISEASE

Viviane C. G. Souza^a, Karine B. Schlemmer^a, Cristiano B. Noal^a, Jeandre A. Jaques^{a,b}, Carine Zimmermann^a, Cláudio A. M. Leal^b, Juliana Fleck^c, Emerson A. Casali^d, Vera M. Morsch^b, Maria R. C. Schetinger^b, Daniela Bitencourt Rosa Leal^{a,b*}.

^a *Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

^b *Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

^c *Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

^d *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Sarmiento Leite, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil -*

* Corresponding author:

Daniela Bitencourt Rosa Leal

Fax: + 55-55322-08242

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 20, 97105-900.

Santa Maria, RS, Brazil

e-mail: danibr1@smail.ufsm.br

Abstract

Objectives: to investigate the E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD).

Design and Methods: Twenty-five IFCD patients and twenty-five healthy subjects (control group) were selected. The peripheral lymphocytes were isolated and then E-NTPDase and E-ADA activities were determined. In addition, the adenine nucleotides and adenosine levels were determined in serum by HPLC and the E-NTPDase 1 expression in lymphocytes by Western blot analysis.

Results: E-NTPDase and E-ADA activities were decreased in lymphocytes of IFCD patients ($p < 0.05$), while the E-NTPDase1 expression presents no changes in these patients. Serum ATP levels showed to be decreased ($p < 0.05$) and both AMP ($p < 0.01$) and adenosine ($p < 0.001$) levels were increased in the IFCD group.

Conclusions: The enzymatic alterations observed are in agreement with the immune response against *T. cruzi* infection in IFCD patients, since the decreased extracellular ATP and the increased adenosine levels triggers a Th2 anti-inflammatory response, which can be found in this phase of disease.

Key words: lymphocytes, E-NTPDase, E-ADA, Chagas' disease, nucleotides.

Introduction

Chagas' disease is a neglected illness caused by the obligatory intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*, which determines a systemic infection that is controlled, but not completely eliminated by host immune responses. Control of parasite load and host survival depend on effective T cell-mediated immunity via Th cell-dependent protective responses, macrophage activation for intracellular killing of the protozoan, and class I-dependent effector mechanism [1,2].

A wide clinical spectrum is observed in the chronic phase of Chagas' disease. Sixty percent of affected individuals have the indeterminate form of Chagas' disease (IFCD) with morbidity apparently absent, 30% show heart involvement, leading to heart failure and less than 10% of the infected patients display the gastrointestinal form of the disease [3]. The development of the indeterminate form results from a blend of Th1 and Th2 responses soon after infection. Therefore, a fine balance of pro- and anti-inflammatory cytokines could be the major key in controlling morbidity during chronic disease [4-6].

The purinergic signaling system plays an important role in modulating the inflammatory and immune responses by extracellular biomolecules such as adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their derived nucleoside adenosine [7]. Evidence indicates that extracellular ATP acts through specific cell surface receptors as a pro-inflammatory agent that potentiates the release of pro-inflammatory cytokines [8] from activated lymphocytes [9]. However, extracellular ATP also plays an additional role as a negative modulator of immunity [10-12]. Its breakdown product, adenosine, exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive action by inhibiting proliferation of T cells and secretion of cytokines [13,14].

Extracellular ATP and adenosine are controlled by ectoenzymes such as ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase; CD39; EC 3.6.1.5) and ectoadenosine deaminase (E-ADA; CD26; EC 3.5.4.4), which are anchored in the cellular surface with their active site facing the extracellular environment [15].

E- NTPDase activity was characterized by Leal et al. [16] in human peripheral lymphocytes and it starts the sequential cascade of hydrolysis of extracellular adenine nucleotides producing adenosine monophosphate (AMP), which is converted to adenosine by the catalytic action of ecto-5'-nucleotidase enzyme (E-5'-

NT; EC 3.1.3.5). Adenosine, in turn, is irreversibly deaminated into inosine by E-ADA [17].

E-NTPDase was identified as a lymphoid cell antigen (CD39) [18] and described as a B lymphocyte activation marker. Its expression was also described on the surface of natural killer cells, monocytes and cytotoxic T lymphocytes [19,20]. The fact that CD39 is expressed only on subsets of activated T lymphocytes suggests that CD39 plays important functions in the immune system including cytokine expression, cell-cell adhesion and cell proliferation and apoptosis via modulation of ATP levels [21].

E-ADA is present in all cell types and an increased activity is observed in thymus, lymphoid tissues and peripheral lymphocytes. It has fundamental biological role in proliferation and differentiation of lymphoid cells, particularly T lymphocytes, and maturation of monocytes [22], performing an important function in the immune system and inflammatory processes [23].

Taking into account that the purinergic system enzymes are closely involved in the modulation of immune system, participating in the regulation of pro- and anti-inflammatory events, this study aimed to investigate the E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease.

Patients and Methods

Chemicals

The substrates adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), adenosine, bovine serum albumin, Trizma base and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). K_2HPO_4 was purchased from Reagen and Tetrabutylammonium chloride from Merck (Darmstadt, Germany). ENTPD1 mouse monoclonal antibody was obtained from eBioscience (Anti-Human CD 39 APC). Laemmli sample buffer and polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane were obtained from Bio-Rad Laboratories. All the other chemicals used in this experiment were of analytical grade and of the highest purity.

Patients

The samples constituted of twenty-five healthy subjects (47 ± 1.43 years old) as control group and twenty-five IFCD patients (54 ± 1.61 years old) diagnosed by two positive serologic reactions for Chagas' disease. The IFCD group were carefully selected from the Federal University of Santa Maria Hospital and showed normal conventional electrocardiogram and chest X-ray. From each subject it was collected about ten milliliters of peripheral blood with and without anticoagulant. All participants selected had not been submitted to any pharmacological treatment during the last 30 days and subjects with any autoimmune disease or immunodeficiency were excluded from this study. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The Human Ethics Committee of the Health Science Center, from Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 23081.008343/2009-10, Brazil.

Hematological determination

It was performed the completed hemogram in the blood samples collected in tubes containing 7.2 mg dipotassium EDTA anticoagulant (SYSMEX XT-1800i, Roche Diagnostic, USA).

Separation of blood serum

The blood samples were collected in tubes without anticoagulant and after the clot formation were centrifuged at 1400 g for 15 min at room temperature. The resultant serum samples were aliquotted in microtubes and kept on ice until the C-reactive protein measurement and purines quantification.

C-reactive protein measurement

The serum levels of C-reactive protein were determined by agglutination latex kit (MBiolog Diagnosticos, Brazil) in order to exclude acute infection.

Isolation of lymphocytes from human blood

Lymphocytes were isolated from peripheral human blood collected with 7.2 mg dipotassium EDTA as anticoagulant and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [24].

Right after lymphocytes separation the cell viability was determined by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH) present in the sample, using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer). The procedure was repeated before and after the incubation period and samples with more than 10% of disrupted cells were excluded.

Protein determination

Protein was measured by the Comassie Blue method according to Bradford [25] using serum albumin as standard.

NTPDase enzyme assays

After lymphocytes isolation, NTPDase activity was determined as described by Leal et al [16]. This method is based on the measurement of inorganic phosphate (Pi) released by colorimetric assay. The reaction medium contained 0.5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 in final volume of 200 µL. Twenty microliters of intact lymphocytes suspended in saline solution was added to the reaction medium (2-4 µg protein) and pre-incubated for 10 min at 37°C. The reaction was started by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2 mM and stopped with 200 µL 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The incubation proceeded for 70 min and the released inorganic phosphate was assayed by the method of Chan et al [26] using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Adenosine deaminase activity assay (ADA)

ADA activity were measured spectrophotometrically in lymphocytes by the method of Giusti and Galanti [27], which is based on the direct measurement of the formation of ammonia produced, when ADA acts in excess of adenosine. Briefly, 25 μ L of lymphocytes reacted with 21 mM of the substrate (adenosine), pH 6.5, and incubation was carried out for 1 h at 37°C. The reaction was stopped by adding 106 nM and 167.8 mM sodium nitroprussiate and hypochlorite solution. Ammonium sulfate of 75 μ M was used as ammonium standard. All the experiments were performed in triplicate and the values were expressed in U/l for ADA activity.

Quantitative determination of ATP, ADP, AMP and adenosine by high pressure liquid chromatography (HPLC)

The quantitative determination of adenine nucleotides and adenosine levels were performed in serum blood by HPLC. At first, the proteins were denaturated by the addition of 0.6 mol/L of perchloric acid. Then, all samples were centrifuged (14000 g for 10 minutes) and the obtained supernatants were neutralized with 4 N KOH and were clarified with a second centrifugation (14000 g for 15 minutes). Aliquots of 40 μ L were applied to a reversed-phase HPLC system using a 25 cm C18 Shimadzu column (Shimadzu, Japan) at 260 nm with a mobile phase containing 60 mM KH_2PO_4 , 5 mM tetrabutylammonium chloride, pH 6, in 30% methanol according to a method previously described by [28]. The peaks of purines (ATP, ADP, AMP and adenosine) were identified by their retention times and quantified by comparison with standards. The results are expressed as nmoles of the different compounds per mL of serum.

Western blot of protein ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (ENTPD1)

Electrophoresis was performed using 12% polyacrylamide in a Bio-Rad Mini-Protean III apparatus. For Western blotting assays, peripheral blood lymphocytes were lysated inside microtubes containing an extraction buffer (50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,5) in the presence of Triton® X-100 (0.5%, v/v), glass pearls and vortexed for a minute, twice, on ice. Samples were centrifuged at

10,000 g for 20 min at 4°C. The protein present in the supernatant, determined by colorimetric assay [23], was diluted (1:1, v:v) in the Bio-Rad Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris HCl, pH 6,8; 25% glycerol, 2% SDS, 0,01% Bromophenol Blue) added 5% of mercaptoethanol and then loaded (10 ug) and size-separated in 12% sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 100V). The running buffer used contained 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 0,5% SDS. The proteins were blotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for 1h (Bio-Rad) in blotting buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol. Subsequently, the membrane was incubated with anti-human ENTPD1 polyclonal antibody (primary antibody used at a dilution of 1:2000; eBiosciences) at room temperature for 1 h. The sensitivity and specificity of this antibody for rat antigen has been previously validated. The amount of protein was corrected in order to load a fixed concentration of protein (25 ug) in 12% SDS-PAGE, and it was determined based on preliminary experiments by using different concentrations of proteins. To ensure equal protein loading, we used the Ponceau method to Western blot [29]. Membranes were developed using the substrate of alkaline phosphatase, nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and analyzed statistically by the Student's t test, except in Western blot in which the statistical analysis of protein intensities was carried out by the t test with Welch's correction. A $p < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all analyses used.

Results

Hematological determination

Table 1 shows the hematological parameters of the IFCD group. The patients showed a hemogram compatible with their age and sex in according with reference values [30].

C-reactive protein measurement

The patients with indeterminate form of Chagas' disease and the healthy subjects had serum levels lower than 6 mg/L of C-reactive protein by latex agglutination.

ATP and ADP hydrolysis

The ATP and ADP hydrolysis by E-NTPDase in peripheral blood lymphocytes are showed in Fig.1. The results obtained in the present study demonstrated a decrease in both ATP (Fig. 1A) and ADP (Fig. 1B) hydrolysis in lymphocytes of IFCD group ($p < 0.05$, $n = 25$).

ADA activity

Fig. 2 shows the E-ADA activity in peripheral blood lymphocytes. It was observed a significant decreased in E-ADA activity in lymphocytes of IFCD group ($p < 0.05$, $n = 20$).

Quantitative determination of ATP, ADP, AMP and adenosine by HPLC

Table 2 shows the adenine nucleotides and adenosine levels in the serum of control and IFCD group quantified by HPLC. The concentration of ATP was significantly decreased ($p < 0.05$) in the IFCD group. However, the concentration of AMP ($p < 0.01$) and adenosine ($p < 0.001$) were significantly increased in the same group.

Western blot of protein ENTPD1

The Western blot quantification of NTPDase1 protein content did not show any difference between the groups ($p > 0.05$) as demonstrated in figure 3.

Discussion

Upon *T. cruzi* infection, both the innate and adaptive immune responses lead to the control of parasite levels in the acute phase of infection, but are insufficient for complete clearance of the *T. cruzi*, developing a chronic inflammatory process in human host. The factors that determine the distinct clinical outcomes, leading to a mild or severe form, are not completely understood. However, it is clear that chagasic pathology is associated with the host immune response [31]. T cells play an important role in the establishment and development of human Chagas' disease, exhibiting both immunoregulatory and effector functions [32].

The role of extracellular ATP in immunity is closely related to one of its breakdown products, the nucleoside adenosine (Ado). The extracellular concentration of ATP and Ado are dynamically controlled by ectoenzymes such as E-NTPDase and E-ADA [8]. Several studies have demonstrated that these ectoenzymes have significant roles in coordinated regulation of immune responses and alterations in their activities have been observed in many diseases in which immunity is altered [33-35].

The results of this study demonstrated that during the indeterminate form of Chagas' disease, there is a decrease in the activity of E-NTPDase (ATP and ADP as substrates) in lymphocytes of patients with IFCD. It is believed that this decreased activity is related to the enzymatic modulation, since low concentration of ATP is generated chronically in response to low grade stimulation by pathogens [12], leading to a regulation of immune and inflammatory response in these individuals

It seems that low-level purinergic signaling induced by nucleotides at decreased concentrations, modulates ongoing inflammatory and immune responses by P2 receptors [36]. At low concentration extracellular ATP possess affinity for P2Y receptors subtype on the surfaces of lymphocytes. These purinergic receptors when stimulated, develops a down-modulation of pro-inflammatory cytokines and stimulates the Th2 immune response, leading to the production of anti-inflammatory cytokines, protection from oxidative damage and down-production of oxygen radicals in whole blood [8]. P2Y receptor signaling might, therefore, be an important stop signal to prevent excessive stimulation of inflammation and avoid conditions that might favour autoimmunity [12].

It is established that the increase in expression of E-NTPDase leads to an enhancement of ATPase and ADPase activities [37]. Further, it demonstrates a state of cellular activation in lymphocytes [19]. However, the Western Blot analysis showed that E-NTPDase expression was not altered in lymphocytes of IFCD patients, which suggests that the enzymatic alterations observed may be a consequence of some tridimensional alteration in the enzyme itself and not from changes in its expression.

In addition, a decrease in E-ADA activity was observed in lymphocytes of patients with IFCD, representing an important mechanism to preserve adenosine levels in the circulation. Adenosine stimulates A₂ receptors couple to stimulatory G proteins (G_s) which typically suppress cell responses upregulating intracellular cyclic AMP levels. Therefore, Ado-mediated A₂ receptor signaling may down-regulates neutrophil effector functions, stimulates the Th2 cell-stimulatory capacity of dendritic cells and inhibits lymphocytes effector functions, maintaining the chronic infection by parasites [8].

It is speculated that increased levels of extracellular adenosine in IFCD patients observed by HPLC, may be related with an increase in 5'-NT activity in lymphocytes of these patients. And the increased levels of extracellular AMP, possibly can be attributed to the action of adenylate kinase on surface of lymphocytes in response to low levels of ATP and high levels of extracellular adenosine, in which the increased activity leads to the recovery of adenine nucleotides such as ATP and regulation of adenosine-induced immunosuppression.

Many studies have demonstrated that immunoregulatory mechanisms are important for the control of infection, possibly affecting disease morbidity in chronic clinical forms [38,39]. A balance between Th1 and Th2 responses modulates the resistance against the parasite and the development of chronic Chagas' disease. A downregulation of Th1 cytokine production accompanied by induction of a nonprotective Th2-type response may be an important immunological consequence of infection related to host adaptation.

In the same line of reasoning, Araujo et al. [38] observed that patients IFCD have higher percentages of CD4+CD25^{high} T cell population secreting IL-10. These data suggest that an increase in the IL-10 released by regulatory T cells during the chronic phase of disease may be associated with protection of the host against the severe tissue damage induced by Th1 immune response. In agreement, Souza et al. [40] observed that patients with IFCD display a lower ability to stimulate CD4+ T cells

representing an important mechanism of controlling inflammatory reaction and consequently less tissue damage in these patients. Moreover, it was observed a slightly lower proliferative response of CD4+ T cells from patients with IFCD, compared to cardiac-disease patients, on stimulation with parasite antigens.

The biochemical data observed by purinergic system ectoenzymes activities corroborate with several studies about cell-mediated immunity in Chagas' disease, since an induction in Th2 response during the chronic phase may be associated with protection from the host against excessive pathology induced by Th1 responses

Although enzymatic alterations were showed in lymphocytes of IFCD group, no change was observed in leukocytes and lymphocytes peripheral count, as well as in the serum C-reactive protein measurement, indicating that these patients present no immune response deficiency and acute *T. cruzi* infection or other ethiology. The present results corroborate with the finding from Ribeiro et al. [41] that demonstrated the absence of immunosuppression in the IFCD by analysis of the lymphocyte proliferative response after stimulation with *T.cruzi* antigens.

E-NTPDase and E-ADA are essential to the regulation of purinergic signaling mediated by extracellular ATP and Ado. The changes in their activities in lymphocytes from patients IFCD are consistent with the establishment of a modulatory response, since the regulation of the adaptive immune response is important not only for controlling parasite replication but also for minimizing immune-mediated pathology, leading the host to adaptive response.

In conclusion, the decreased E-NTPDase and E-ADA activities observed in lymphocytes, suggest to be involved in maintain of balance between parasitism and tissue integrity in patients IFCD. The purinergic signaling plays an important role in dynamic of Chagas' disease in response to chronic ATP concentrations and the activation of suppressive A2 and P2Y receptors are additional mechanisms that may affect the type immune responses in these patients, controlling pro and anti-inflammatory events.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE/UFSM), Brazil.

References

- [1] Rottenberg ME, Riarte A, Sporrang L, Altcheh J, Petray P, Ruiz AM, Wigzell H, Orn A. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett* 1995; 45:53-60.
- [2] Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol* 1996; 84:231-44.
- [3] Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989; 22:147-56.
- [4] Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, Carvalho-Parra JF. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scand J Immunol* 1997;45:74-80.
- [5] Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, Borges JD, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol* 2006; 64:554-63.
- [6] Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, de Lana M, Pinto Dias JC, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes Infect* 2008;10:103-13.
- [7] Ralevic V, Burnstock G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect* 2003;16:133-40.
- [8] Bours M, Swennen E, Di Virgilio F, Cronstein B, Dagnelie P. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 112:358–404.
- [9] Langston H, Ke Y, Gewirtz A, Dombrowski K, Kapp J. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 2003;170:2962–70.
- [10] Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:507-13.
- [11] Boeynaems JM, Communi D. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. *J Invest Dermatol* 2006;126:943-944.
- [12] Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:507-513.

- [13] Gessi S, Varani K, Merighi S, Fogli E, Sacchetto V, Benini A, Leung E, MacLennan S, Borea PA. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal*. 2007;3:109-16.
- [14] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enyoloji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257-65.
- [15] Zimmermann, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001; 52:44-56.
- [16] Leal DB, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CA, da Silva JE, Morsch VM, Schetinger MR. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1721:9-15.
- [17] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:673-94.
- [18] Wang TF, Guidotti G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. *J Biol Chem* 1996;271:9898-901.
- [19] Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol* 1991;146:2235-44.
- [20] Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, Drosopoulos JH, Kizer JR, Islam N, Marcus AJ. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb Res* 2007;121:309-17.
- [21] Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 2007;3:171-80.
- [22] Bota A, Gella FJ, Profilis C, Féraud G, Hadjivassiliou AG, Hørder M, Schiele F, Segura R, Canalias F. Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BCR 647). *Clin Chim Acta* 2001;306:79-89.
- [23] Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Tuccori M, Del Tacca M, Blandizzi C. Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:566-74.
- [24] Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:77-89.

- [25] Bradford MM A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [26] Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375-80.
- [27] Giusti G, Galanti B. Colorimetric Method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim 1984; 315-323.
- [28] Voelter W, Zech K, Arnold P, Ludwig G. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reverse-phase ion-pair chromatography. *J Chromatogr* 1980;199:345–54.
- [29] Abercrombie ED, Keefe KA, Difriscia DS, Zigmond MJ. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus acumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem* 1989; 52:1655-1658.
- [30] Failace R. *Hemograma: Manual de Interpretação*. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- [31] Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:103-110.
- [32] Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, Carvalho-Parra JF. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scand J Immunol* 1997;45:74-80.
- [33] Hitoglu S, Hatzistilianou M, Gougoustamou D, Athanassiadou F, Kotsis A, Catriu D. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythemathosus. *Clin Rheumatol* 2001;20:411–6.
- [34] Leal D, Streher C, Bertoncheli C, et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity correlates with CD39-positive lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746:129–34.
- [35] Pourshari. P, Saghiri R, Ebrahimi-Rad M, et al. Adenosina deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: The analysis of serum ADA1 and ADA2 activities. *Clin Biochem* 2009;42:1438–43.
- [36] Di Virgilio F, Ferrari D, Idzko M, Panther E, Norgauer J, La Sala A, Girolomoni G. Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation. *Drug Develop Res* 2003; 59:171-174.
- [37] Wang TF, Rosenberg PA, Guidotti G Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;47:295-302.

- [38] Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci* 2007;12:2797-806.
- [39] Fiuza JA, Fujiwara RT, Gomes JA, Rocha MO, Chaves AT, de Araújo FF, Fares RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Cançado GG, Correa-Oliveira R. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e512.
- [40] Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 2004; 72:5283-91.
- [41] Ribeiro BM, Crema E, Rodrigues V Jr. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Hum Immunol* 2008;69:484-9.

Figure Legends

Figure 1. ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means \pm SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P<0.05$, $n=25$).

Figure 2. E-ADA activity in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means \pm SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P<0.05$, $n=20$).

Figure 3. Expression of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPDase 1) in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. Densitometric analysis (arbitrary units, A.U.) of the protein NTPDase1. Data are represented as the mean \pm SEM. (Student's T test, $P<0.05$, $n=4$).

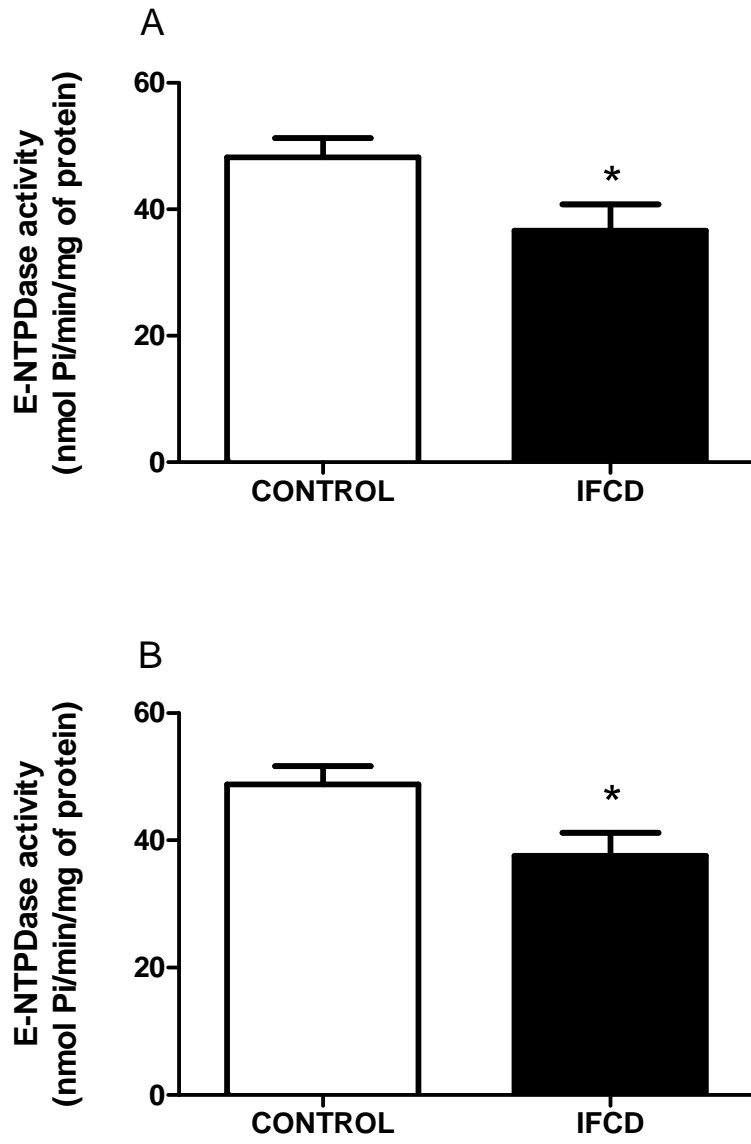


Figure 1

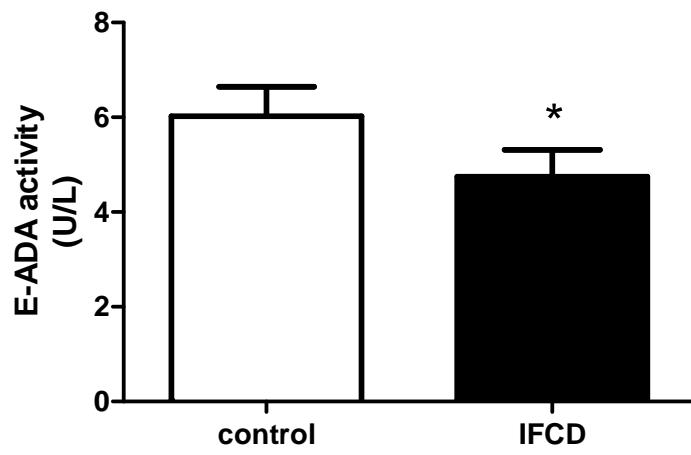


Figure 2

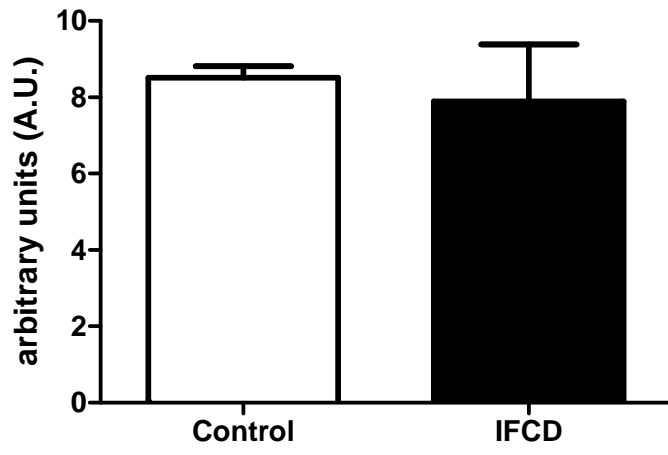


Figure 3

Table 1 Hematological determination in patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD)^a.

Item ^b	Patients IFCD (men n=14)	Patients IFCD (women n=11)	Reference range ^c (men)	Reference range ^c (women)
RBC (x10 ⁶ /μl)	4.81 ± 0.10	4.59 ± 0.08	5.30 ± 0.80	4.70 ± 0.70
Hemoglobin (g/dL)	14.94 ± 0.37	13.84 ± 0.28	15.3 ± 2.5	13.60 ± 2.00
HCT (%)	44.90 ± 1.05	42.32 ± 0.85	46.7 ± 7.00	42.00 ± 6.00
MCV (pg)	93.23 ± 1.01	92.09 ± 1.13	89.00 ± 9.00	89.00 ± 9.00
MCHC (g/dL)	33.08 ± 0.31	32.51 ± 0.26	31-36	31-36
WBC (x10 ³ /μL)	5.65 ± 0.19	6.84 ± 0.48	3.60 - 11.00	3.60 - 11.00
Lymphocytes (x 10 ³ /μL)	2.01 ± 0.12	2.30 ± 0.23	1.00 - 4.50	1.00 - 4.50
Neutrophils (x10 ³ /μL)	3.05 ± 0.15	3.88 ± 0.35	1.50 - 7.00	1.50 - 7.00
Monocytes (x 10 ³ /μL)	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.05	0.10 - 1.00	0.10 -1.00
Eosinophils (x 10 ³ /μL)	0.18 ± 0.04	0.25 ± 0.09	0 - 0.50	0 - 0.50
Basophils (x 10 ³ /μL)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0 - 0.20	0 - 0.20
Platelets (x10 ³ /μL)	206.6 ± 12.55	254.2 ± 15.41	140 - 360	140 - 360

^a Results are presents as means ± SEM (n=25 for IFCD group).

^b RBC, red blood cells; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; CHCM, mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC, white blood cells.

^c Take from Failace (2003) to according with age and sex.

Table 2 Adenine nucleotides and adenosine levels measurement in patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD).

	Control group (nmol/mL; n=10)	IFCD group (nmol/mL; n=21)
ATP	19.05 ± 1.86	14.31 ± 1.29*
ADP	9.02 ± 0.44	8.94 ± 0.68
AMP	5.49 ± 1.20	9.17 ± 0.67**
Adenosine	4.76 ± 0.68	9.39 ± 0.71***

The measurement of purine levels from serum of control and IFCD group was addressed using HPLC methodology. Results are presented as means ± SEM. The comparison among groups was made by Student's t test. Statistically significant differences are represented by * (p<0.05); ** (p<0.01) and *** (p<0.001).

Regular Article

**PURINERGIC SYSTEM ECTOENZYMES PARTICIPATE IN THE
THROMBOREGULATION OF PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF
CHAGAS' DISEASE**

Viviane do C. G. Souza^a, Karine B. Schlemmer^a, Cristiano B. Noal^a, Jeandre A. Jaques^{ac}, Margarete D. Bagatini^c, Victor C. Pimentel^c, Cláudio A. M. Leal^c, Juliana Fleck^d, Maria B. Moretto^b, Maria R.C.Shetinger^c, Daniela B. R. Leal^{ac}

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

^b Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^c Departamento de Química, Laboratório de Enzimologia Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^d Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

Corresponding author:

Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal (dbitencourtrosaleal@gmail.com)

Departamento de Microbiologia e Parasitologia/CCS/UFSM - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prédio 20 – Sala 4102

Phone: + 55 55 3220 9581

PURINERGIC SYSTEM ECTOENZYMES PARTICIPATE IN THE THROMBOREGULATION OF PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS' DISEASE

Abstract

Introduction: Chagas' disease (CD) is a chronic and endemic illness caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*. Microvascular disturbances play an important role in the progress of the disease. The purinergic signaling system participates in regulatory functions, such as immunomodulation, neuroprotection and thromboregulation.

Objective: This study aimed to investigate the activities of purinergic system ectoenzymes present on the platelet surface from patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD).

Materials and methods: Thirty patients diagnosed with IFCD and thirty healthy subjects were selected. E-NTPDase, E-NPP, E-5'-NT and E-ADA activities were measured in platelets isolated from these individuals as well as the platelet aggregation.

Results: Results demonstrated an increase of 21% in the E-NPP activity and 30% in the E-5'-NT activity in IFCD group ($p < 0.05$), however, a decrease of 34% in the E-ADA activity was determined in the same group ($p < 0.001$). A significant decrease of 12.7% and 12.8% in the platelet aggregation of IFCD group in two different concentrations of agonist 5 μM and 10 μM of ADP was observed, respectively.

Conclusion: Increased E-NPP and E-5-NT activities as well as decreased E-ADA activity in platelets of patients with IFCD resulted in a decrease of platelet aggregation, suggesting that the purinergic system is involved in the thromboregulation process in these patients, since adenosine (the final product of ATP hydrolysis) has cardioprotective and vasodilator effects that prevent the progress of the disease.

Key words: adenosine triphosphate, Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, platelet aggregation, adenosine.

Abbreviations

CD: Chagas' disease

IFCD: indeterminate form of Chagas' disease

ADP: adenosine diphosphate

ATP: adenosine triphosphate

AMP: adenosine monophosphate

NTPDase: Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase

NPP: Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase

5'-NT: 5'-nucleotidase

ADA: Adenosine deaminase

p-Nph-5'-TMP: thymidine 5'-monophosphate p-nitrophenyl ester sodium salt

PRP: platelets-rich plasma

PPP: platelets-poor plasma

LDH: lactate dehydrogenase

TCA: trichloroacetic acid

Pi: inorganic phosphate

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

PKA: protein kinase A

IP3: inositol triphosphate

Introduction

Chagas' disease (CD) or American trypanosomiasis, caused by hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a parasitic illness that infects the blood and several tissues of the host. It is a chronic and endemic disease widespread in Central and South America.

The infection is presented under two distinct clinical phases. An initial acute phase, short-term, which can be fatal from 3% to 5% of the cases and that progresses to a lifelong chronic phase characterized by distinct clinical forms known as indeterminate, cardiac and digestive [1]. The most infected individuals show the indeterminate form of the disease, which is characterized by long-term (10-30 years), in which the patients have no symptoms of the disease and present clinical, radiological (heart, esophagus and colon) and normal conventional electrocardiogram. About 25% to 30% of the infected subjects develop severe cardiac and/or digestive lesions in the chronic phase of the infection [2], such as cardiac arrhythmias, congestive heart failure, thromboembolic events, megaesophagus and megacolon [3,4]. Microvasculature disorders play an important role in the pathogenesis of chronic cardiomyopathy disease [1,5]. It has been described that the cardiac involvement constitutes the main cause of death [4,6,7], since heart is the most often and seriously involved organ in the chronic CD.

The protozoan invades and reproduces in a variety of host cells, such as striated muscle and endothelial cells. Endothelium dysfunction can occur during the *T. cruzi* infection and promote thromboembolic disturbances. Thromboregulation is a process in which circulating blood cells and the endothelium regulate thrombus formation [8]. Platelets are important mediators in the maintenance of endothelial integrity and hemostasis [9] as well as in inflammation, which emphasize their importance in the development and treatment of vascular diseases.

The purinergic signaling system plays an important regulatory role in inflammation, cellular activation, blood flow and vascular thrombosis by extracellular biomolecules, such as adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their derivative nucleoside adenosine [10]. Some authors have described that as a consequence of pathogen infection, high concentration of adenine nucleotides secreted by erythrocytes, leukocytes, platelets and endothelial cells [11] are found in the extracellular medium representing damage or stimulation of cells.

After exerting their functions, the nucleotides are hydrolysed by a multienzymatic system in order to maintain the extracellular levels at the physiological concentration and to avoid purinergic receptors desensitization. These enzymes are found on the surfaces of virtually all mammalian cell types and include ectonucleotidases from distinct families such as the E-NTPDase (EC 3.6.1.5, CD39), E-NPP (EC 3.1.4.1), and E-5'-NT (EC 3.1.3.5, CD73). These ectoenzymes are responsible for the hydrolysis of ATP, ADP and AMP until the formation of adenosine, which in turn, is converted into inosine by ADA ectoenzyme (EC 3.5.4.4, CD26) [12]. Of particular interest for this study, ADP plays a key role in the platelet activation and recruitment, while adenosine and high concentration of ATP inhibit ADP-induced platelet aggregation.

Lesions developed by the parasite infection in the acute phase lead to pathological changes such as immunosuppression, increased fibrogenesis, microthrombi, microspasm and microinfarctions, which influence the progress of the disease into chronic phase.

Taking into account that the ectoenzymes activities are important in the maintenance of hemostasis, this study aimed to investigate the participation of purinergic system in thromboregulation of patients with IFCD, since alterations in the activity of these enzymes have been observed in many pathophysiological conditions such as diabetes mellitus, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, uterine cervix neoplasia, ischemic heart disease and pregnancy [13,14-18].

Material and Methods

Chemicals

The substrates adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), 5'-monophosphate sodium salt (AMP), thymidine 5'-monophosphate p-nitrophenyl ester sodium salt (p-Nph-5'-TMP), adenosine, as well as bovine serum albumin, Trizma base, HEPES and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). K_2HPO_4 was purchased from Reagen and Tetrabutylammonium chloride from Merck (Darmstadt, Germany). All the

other chemicals used in this experiment were of analytical grade and of the highest purity.

Patients and samples

Thirty patients with a diagnosis of CD from the Federal University of Santa Maria Hospital were included in the study. The group of patients showed an average age of 55 ± 1.57 years old, and two confirmed positive serologic reactions for CD and normal conventional electrocardiogram and chest X-ray classified as presenting the IFCD group. The control group was constituted by thirty healthy subjects with an average age of 45 ± 2.35 years old and negative serology for CD. All participants were without any treatment therapy and subjects with autoimmune disease or immunodeficiency were excluded from the study. Fifteen milliliters of peripheral blood was obtained from each patient and used for platelet-rich plasma (PRP) preparation and other determinations. The same procedure was carried out for the control group. The protocol was approved by the Human Ethics Committee from Federal University of Santa Maria, protocol number 23081.008343/2009-10, Brazil. All subjects gave written informed consent to participate in the study.

Platelet preparation

PRP was prepared by the method of Pilla et al. [19] modified by Lunkes et al. [13]. Briefly, peripheral blood was collected in 0.129 M sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 160 g for 15 min. Afterwards, the PRP was centrifuged at 1,400 g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer.

Cellular integrity

The integrity of the platelet preparation was confirmed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity in intact and disrupted platelets using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer). The procedure was repeated before and after the incubation period.

Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard [20].

Quantitative determination of platelets

Total blood was collected in tubes containing 7.2 mg dipotassium EDTA as an anticoagulant and the quantitative determination of platelets was performed by automated haematology analyzer (SYSMEX XT-1800i, Roche Diagnostic, USA).

E-NTPDase and E-5'-NT activity determination

The E-NTPDase enzymatic assay in platelets was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μL as described by Lunkes et al. [13]. For AMP hydrolysis, the E-5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, except that the 5 mM CaCl_2 was replaced by 10 mM MgCl_2 . Twenty microliters of the isolated platelets (8-12 μg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was started by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1 mM, and AMP at a final concentration of 2 mM, and the time of incubation was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 μL of 10% TCA to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. The Pi released was measured by method of Chan et al. [21] using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after 10% TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

E-NPP activity determination

The E-NPP activity, from platelets, was assessed using p-Nph-5'-TMP as substrate as described by Fürstenau et al. [22]. The reaction medium containing 50

mM Tris–HCl buffer, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose, 5 mM CaCl₂, pH 8.9 was preincubated with approximately 20 µg per tube of platelet protein for 10 min at 37°C in a final volume of 200 µL. The enzyme reaction was started by the addition of p-Nph-5'-TMP to a final concentration of 0.5 mM. After 80 min of incubation, 200 µL NaOH 0.2 N was added to the medium to stop the reaction. The amount of p-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of $18.8 \times 10^{-3} \text{ M/cm}$. Controls to correct nonenzymatic substrate hydrolysis were performed by adding platelet preparations after the reaction had been stopped. All samples were performed in triplicates. Enzyme activities were expressed as nanomol of p-nitrophenol released per minute per milligram of protein (nmol p-nitrophenol released/min/mg protein).

E-ADA activity determination

E-ADA activity from platelets was determined according to Giusti and Galanti [23] based on the direct measurement of the formation of ammonia produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Briefly, 50 µL of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37 °C for 60 min. Afterwards, the reaction was stopped by adding a solution of 106.2 nM phenol and 167.8 nM sodium nitroprussiate and a hypochlorite solution. The amount of ammonia produced was measured at 620 nm and the results were expressed in units per milligrams of proteins (U/mg of protein).

Platelet aggregation

Platelet aggregation was measured by the method of Born and Cross [24] by turbidimetric measurement with a Chrono-log optical aggregometer (AGGRO/LINK® Model 810-CA software for Windows version 5.1). The PRP was obtained by centrifugation of peripheral blood for 15 min at 160 g and the preparation of platelets-poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation of the sample by 1,400 g for 30 min. After the calibration of the aggregometer, the data concerning the assays and reagents were entered on a computer coupled to the equipment, and the test of patient 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 5 μ M and 10 μ M, with PPP as a reference. Results were expressed as percentage of aggregation.

Statistical analysis

Variables were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The data obtained for the enzymatic activities in platelets from patients were analyzed statistically by the Student's t test for independent samples. Differences were considered significant when the probability was $p < 0.05$.

Results

LDH measurement

Almost 4% of the platelets were disrupted indicating that the preparation was predominantly intact as observed by LDH determination (data not shown).

Quantitative determination of platelets

Patients with indeterminate form of CD showed an average of 235,000 platelets per microliter of blood (platelets/mL of blood) (data not shown). These data are within physiological values for humans, since adult normal values are between 140,000 and 360,000 platelets/mL of blood.

E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities

Figure 1 shows the results obtained for E-NTDase activity by ATP and ADP hydrolysis and E-5'-NT activity by AMP hydrolysis. As can be seen neither ATP hydrolysis (Fig. 1A) nor ADP hydrolysis (Fig. 1B) was altered in the IFCD group ($p > 0.05$, $n = 30$). However, AMP hydrolysis (Fig. 1C) was 30% increased in the same group ($p < 0.01$, $n = 30$).

E-NPP activity

Results obtained for the E-NPP activity are shown in Fig. 2. Statistical analysis showed an increase of 21% in the E-NPP activity in the IFCD group when compared with the control group ($p < 0.05$, $n = 20$).

E-ADA activity

E-ADA activity in the platelets is shown in Fig. 3. Results demonstrated a decrease of 34% in the E-ADA activity in the IFCD group when compared to the control group ($p < 0.001$, $n = 30$).

Platelet aggregation

Fig. 4 presents the results obtained for platelet aggregation using ADP as an agonist. As can be observed there was a decrease of 12.7% and 12.8% in the platelet aggregation of IFCD group in 5 μM and 10 μM concentrations of ADP, respectively ($p < 0.05$, $n = 15$).

Discussion

Chagas' disease is a chronic inflammatory illness, in which the most infected individuals are diagnosed during the latent phase, showing absence of symptoms for many years or even for the entire life. However, many studies in both animal models of chagasic myocarditis and humans presented a persistence of parasite in tissue inflammatory foci by immunohistochemistry, polymerase chain reaction (PCR) and *in situ* hybridization methods [25]. The presence of the parasite in tissues suggests the possibility of disease progress to a symptomatic clinical form, since the chagasic cardiomyopathy represents the major cause of morbidity and mortality of this infection and can lead to chronic congestive failure.

As shown in experimental models, Chagas cardiomyopathy is more evident in the acute phase and clinically silent but incessant in patients with the indeterminate form of disease [26]. Myocarditis may result from alterations in the microvasculature

that leads to changes in vascular perfusion and development of microspasm and aneurysm formation, characterizing the chronic Chagas heart disease [27]. A possible explanation for this is the interaction between platelets and damaged endothelium, which stimulates the platelet activation. Activated platelets play a pivotal role in the release of additional agonists such as collagen, adenosine diphosphate (ADP), adenosine triphosphate (ATP), serotonin, epinephrine and thromboxane A₂, which cause further platelet recruitment to the injured site, favoring platelet aggregation and later thrombus formation.

Experimental and *in vitro* studies have shown that endothelium dysfunction related to *T. cruzi* infection leads to increased platelet reactivity. This contributes to intravascular platelet aggregation, which can lead to areas of myocardial ischemic injury, cardiac arrhythmias and even sudden death in both acute and chronic cardiac phases [28,29]. Although an excessive platelet aggregation can occur in damaged vasculature as consequence of inflammation, the platelet aggregation in this study showed to be decreased in IFCD group. However, no change in platelet count in this same group was observed, which is a phenomenon commonly seen in acute phase of the disease.

Adenine nucleotides (ATP and ADP) and nucleosideo adenosine are released of cells such as platelets into extracellular medium during infection and inflammatory process and act modulating vascular response, as agonist and antagonist in the platelet aggregation, respectively. Their effects are mediated by cell surface purinergic receptors and their extracellular concentrations are regulated by ectoenzymes of purinergic system including E-NTPDase, E-NPP, E-5'-NT and E-ADA.

Some studies have reported that vascular functions of E-NTPDase activity (thromboregulation and vascular permeability) probably correlate with high hydrolytic activity on the endothelial and vascular smooth muscle cells [30,31] in the vasomotor responses. In contrast, in this study no alteration was observed in the E-NTPDase activity in platelets of IFCD group. It is well established that cells and tissues can co-express two or more ectoenzymes for nucleotide hydrolysis. This indicates they may present different catalytic properties and may perform distinct physiological functions, however, they may also share common characteristics [22,32]. Thus, the investigation showed that E-NPP activity was increased in platelets of IFCD group, probably leading to a decrease in extracellular ATP levels and consequently

increased AMP levels in the blood circulation confirmed by the quantification of purines by high pressure liquid chromatography (HPLC) (data not shown). While high concentrations of extracellular ATP inhibit ADP-induced platelet aggregation by both competitive and noncompetitive mechanisms, low concentrations induce platelet aggregation [15-17,33,34].

ATP released into the extracellular space is rapidly hydrolysed in a stepwise manner to ADP and AMP by NTPDase or directly to AMP by NPP enzymes. This nucleotide sequential degradation mechanism is followed by the activity of 5'-NT which not only terminates ATP signaling but also generates the intermediate adenosine. Thus, high AMP levels serve as substrate for the production of adenosine by catalytic activity of 5'-NT. As observed in this study, the 5'-NT activity was increased in the IFCD group, resulting in the formation of high extracellular adenosine concentration which presents anti-inflammatory properties as well as neuromodulatory and thromboregulatory effects [33,35], besides participating as a salvage product of cellular purine metabolism.

In addition to the enhancement of NPP and 5'-NT activities, a decrease in ADA activity was observed in the platelets of IFCD group. The reduced activity of ADA in platelets of this group could represent important mechanism to preserve high extracellular adenosine levels as confirmed by the quantification of purines by HPLC (data not shown), preventing platelet aggregation and inducing vasodilation.

It is known that CD vascular disorders can be caused by inflammatory process. This process may generate vascular occlusion by platelet thrombi leading to congestive heart failure. However, the organism can prevent the thrombotic process increasing the hydrolysis of ATP, ADP, and AMP. As a consequence, the production of adenosine increased, inducing a state of equilibrium between host and parasite by limiting the formation of thrombus and the disease progress.

As previously mentioned, adenosine is an important signaling molecule in vasculature that has the potential to influence vasomotor responses, cardiac function, inflammatory responses, and platelet aggregation. Its anti-aggregant effects are mediated via G-protein coupled adenosine receptors, specifically the A_{2A} and A_{2B} adenosine receptor subtypes [36,37]. The agonism of these receptors upregulates the production of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP), an inhibitor of platelet activation by activation of adenylyl cyclase [38,39]. cAMP, in turn, inhibits platelet activation through the activation of protein kinase A (PKA), which

phosphorylates several substrates such as the IP3 receptor, reducing the release of intracellular calcium stores [40]. Moreover, PKA inhibits signaling to the cytoskeleton and may stabilize the resting cytoskeleton by phosphorylation of cytoskeletal proteins, such as actin-binding protein and caldesmon [36]. Thus, PKA activity induced by the generation of cAMP leads to the inhibition of the reorganization of the cytoskeleton, activation of integrin, and secretion of granules [38,40]. Intracellular signaling complexes and metabolites present prior to the binding of platelet receptors determine the rate at which platelets accumulate and participate in thrombus formation at the site of vascular injury [36,40].

Therefore, the decrease in the platelet aggregation and enzymatic changes observed in the IFCD group allows to suggest that the purinergic signaling system is involved in the thromboregulation, possibly due to the production of large amounts of adenosine, a molecule with anti-aggregant properties and cardioprotective effects.

In this context, the findings in this study corroborate with the evidence that ectoenzymes contribute to a number of process involved in normal cardiovascular function and that disorders in purinergic signaling are involved in some cardiovascular diseases.

Conclusion

Altogether, the results suggest that the regulation of extracellular nucleotides levels through the modulation of the E-NPP, E-5'-NT and E-ADA activities in the platelets of chagasic patients represents an important control of purine-mediated thrombogenic function in the cardiovascular system during the indeterminate form of CD. Thus, the organism could exert a cardioprotective action and avoid coagulation process by increasing adenosine, a vasodilatator and anti-thrombotic molecule which would prevent the progress of CD.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE/UFSM), Brazil.

Disclosure of Conflicts of Interests

Author declares there are no actual or potential conflicts of interest.

References

- [1] Rossi MA, Bestetti RB. Hipótese unificada sobre a patogênese da cardiopatia chagásica crônica. Implicações terapêuticas. *Arq Bras Cardiol* 1995a; 64: 255-60.
- [2] Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. *Lancet Infect Dis* 2001; 1:92-100.
- [3] Prata A. Prognóstico e complicações da doença de Chagas. *Rev Goiana Méd* 1959; 5:87-96.
- [4] Gonçalves JG, Dias Silva VJ, Calzada Borges MC, Prata A, Correia D. Mortality indicators among chronic Chagas patients living in an endemic area. *Int J Cardiol* 2010; 143:235-42.
- [5] Rossi MA. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. *Am Heart J* 1990; 120: 233-6.
- [6] Prata A. Chagas' disease. *Infect Dis Clin North Am* 1994; 8:61-76.
- [7] Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, Hasslocher-Moreno A, Sousa AS, Scanavacca MI. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med* 2006; 355:799-808.
- [8] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Pinsky DJ, Islam N, Maliszewsk CR. Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD39/ecto-ADPase: significance for occlusive vascular disease. *Ital Heart J* 2001; 2:824-30.
- [9] Birk AV, Broekman MJ, Gladek EM, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, Szeto HH. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J Lab Clin Med* 2002; 140:166-75.
- [10] Ralevic V, Burnstock G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect* 2003; 16: 133-40.
- [11] Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K, Robson SC. Ecto-nucleotidases of the cd-39/ntpdase family modulated platelet activation on thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36:217-22.
- [12] Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedeberg Arch of Pharmacol* 2000; 362:299-309.
- [13] Lunkes IG, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch MV, Mazzanti MC, Schetinger MCR. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research* 2003; 109: 189-194.
- [14] Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, Correa M, Schmatz R, Stefanello N, Thomé G, Morsch VM, Becker L, Bellé L, de Oliveira L, Schetinger MR. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol* 2010; 257:24-30.
- [15] Becker LV, Rosa CS, Souza VCG, Bagatini MD, Casali EA, Leal CA, da Silva JC, Moretto MB, Pinheiro Fde V, Morsch VM, Schetinger MR, Leal DB. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2010; 43:1096-100.
- [16] Maldonado PA, Corrêa MC, Becker LV, Flores C, Moretto MB, Morsch V, Schetinger MRC. Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. *Clin Biochem* 2008; 41:400-6
- [17] Bagatini MD, Martins CC, Battisti V, Spanevello RM, Gasparetto D, Rosa CS, Gonçalves JF, Schetinger MR, dos Santos RB, Morsch VM. Hydrolysis of

- adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2008; 41: 1181-5.
- [18] Leal CA, Schetinger MR, Leal DB, Bauchspiess K, Schrekker CM, Maldonado PA, Morsch VM, da Silva JE. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis. *Mol Cell Biochem* 2007; 304:325-30.
- [19] Pilla C, Emanuelli T, FRASSETTO SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJF. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets* 1996; 7: 225-230.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- [21] Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157: 375-80.
- [22] Fürsternau C, Trentin Dda S, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 2006; 17: 84-91.
- [23] Giusti G, Galanti B. Colorimetric Method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim 1984; 315-323.
- [24] Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 95: 168-78.
- [25] Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramirez JL. Myocardial parasite persistence in chronic Chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:726 – 32.
- [26] Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold Jr RJ, Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57:328–36.
- [27] Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:400-19.
- [28] Rossi MA, Gonçalves S, Ribeiro-dos-Santos R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am J Pathol* 1984; 114:209-16.
- [29] Tanowitz HB, Burns ER, Sinha AK, Kahn NN, Morris SA, Factor SM, Hatcher VB, Bilezikian JP, Baum SG, Wittner M. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43:274-81.
- [30] Gordon EL, Pearson JD, Dickinson ES, Moreau D, Slakey LL. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. Regulation of adenosine production at the cell surface. *J Biol Chem* 1989; 264:18986-95.
- [31] Kauffenstein G, Drouin A, Thorin-Trescases N, Bachelard H, Robaye B, D'Orléans-Juste P, Marceau F, Thorin E, Sévigny J. NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. *Cardiovasc Res* 2010; 85:204-13.
- [32] Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem*. 1999; 262:102-7.

- [33] Soslau G, Youngprapakorn D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1355: 131-40.
- [34] Park HS, Hourani SM. Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5-diphosphate (ADP) in human platelet. *Br J Pharmacol* 1999;127:1359–66.
- [35] Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Skladanowski AC. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol* 2006; 53:269-78.
- [36] Yang D, Chen H, Koupenova M, Carroll SH, Eliades A, Freedman JE, Toselli P, Ravid K. A new role for the A2b adenosine receptor in regulating platelet function. *J Thromb Haemost* 2010; 8:817-27.
- [37] Johnston-Cox HA, Yang D, Ravid K. Physiological implications of adenosine receptor-mediated platelet aggregation. *J Cell Physiol* 2011; 226:46-51.
- [38] Paul S, Feoktistov I, Hollister AS, Robertson D, Biaggioni I. Adenosine inhibits the rise in intracellular calcium and platelet aggregation produced by thrombin: evidence that both effects are coupled to adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 1990; 37:870-5.
- [39] Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD, Przyklenk K. Effect of adenosine A2 receptor stimulation on platelet activation-aggregation: differences between canine and human models. *Thromb Res* 2008;121:689-98.
- [40] Sim DS, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B, Flaumenhaft R. Initial accumulation of platelets during arterial thrombus formation in vivo is inhibited by elevation of basal cAMP levels. *Blood* 2004; 103:2127-34.

Figure Legends

Figure 1. ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in platelets of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means \pm SEM. The symbol ** represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P<0.01$, $n=30$).

Figure 2. E-NPP activity in platelets of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means \pm SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P<0.05$, $n=20$).

Figure 3. E-ADA activity in platelets of patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD). Bars represent means \pm SEM. The symbol *** represents statistical difference from the control group (Student's T test, $P<0.001$, $n=30$).

Figure 4. Platelet aggregation profile in patients with indeterminate form of Chagas' disease (IFCD) and healthy subjects (control). Platelet aggregation was evaluated by using ADP as agonist at concentrations of 5 and 10 μ M. The results are expressed as percentage of aggregation ($n=15$).

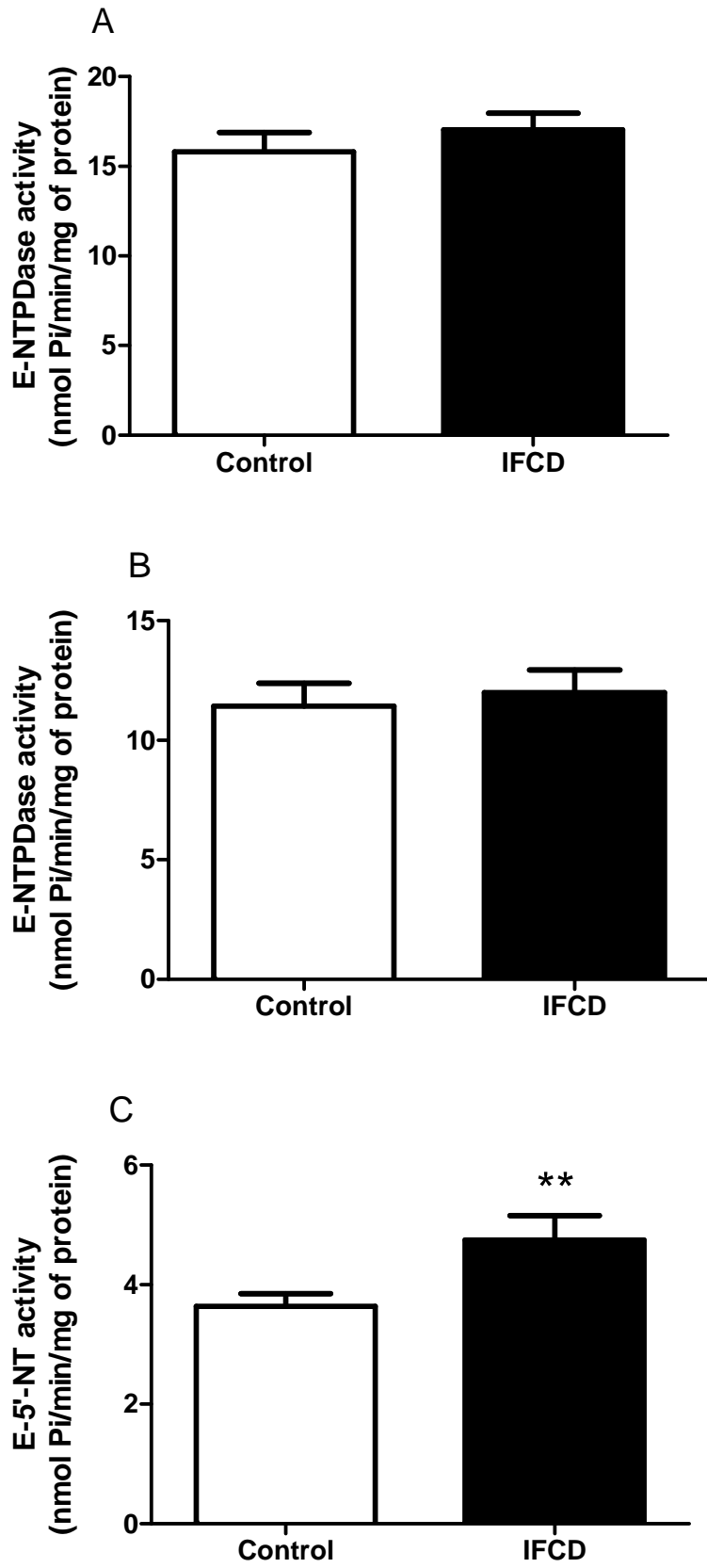


Figure 1

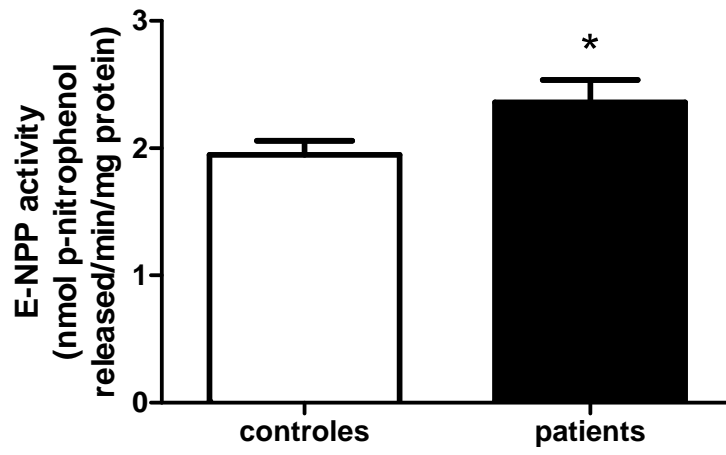


Figure 2

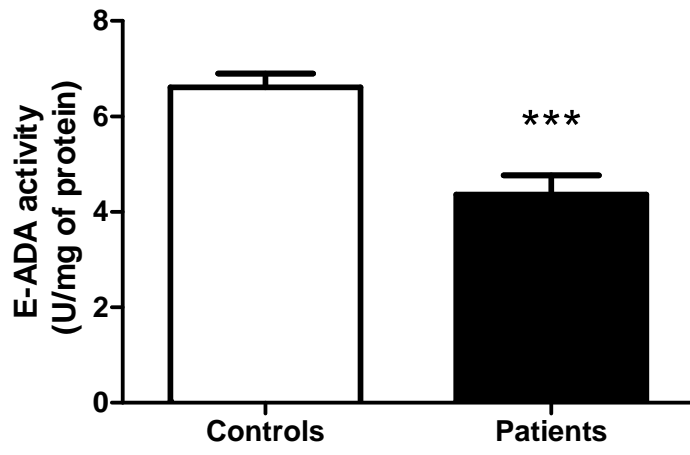


Figure 3

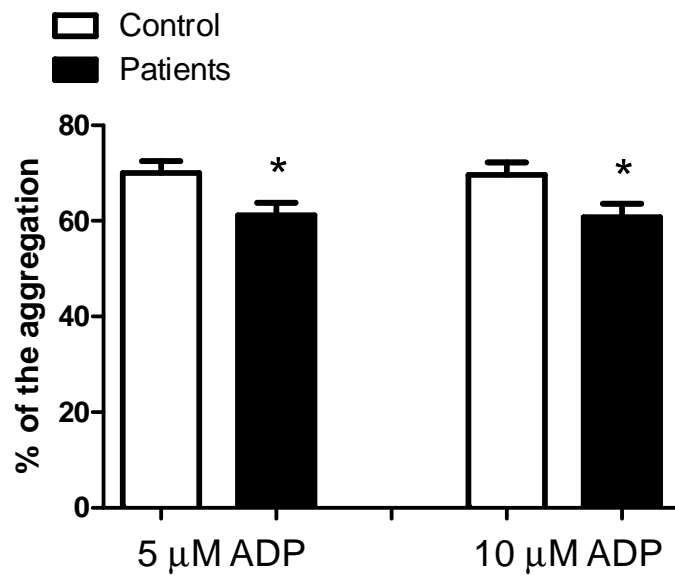


Figure 4

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o envolvimento de ectoenzimas responsáveis pelo metabolismo do ATP, na microcirculação e na resposta imune de pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas. A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um parasito intracelular obrigatório, que leva à uma infecção crônica. A maioria dos indivíduos infectados sobrevive à fase aguda da infecção, mas cerca de 30% desenvolvem a doença inflamatória crônica, que frequentemente resulta em insuficiência cardíaca ou distúrbios gastrointestinais severos (PRATA, 2001).

A regulação da resposta imune adaptativa do hospedeiro é essencial para o controle da replicação do parasito e para minimizar a patologia mediada pela imunidade (ANTONELLI et al., 2005; SOUZA et al., 2007). No entanto, respostas imunes exacerbadas, enquanto eficientes na eliminação do parasito, podem levar a danos teciduais por serem altamente prejudiciais ao hospedeiro (FARIA et al., 2005).

A presença de antígenos parasitários nos infiltrados inflamatórios na fase crônica da infecção suporta a hipótese de que uma persistente estimulação antigênica teria papel importante na patogênese da doença de Chagas (BEN YOUNES-CHENNOUFI et al., 1988; HIGUCHI et al., 1993). Em resposta à persistência do parasito nos tecidos do hospedeiro, a resposta imune específica resulta em processo inflamatório exacerbado, levando à evolução clínica da infecção pelo *T. cruzi*.

Uma vez que está bem definido que o sistema de sinalização purinérgica é um componente fundamental do ambiente imunorregulatório (DI VIRGILIO, 2006) avaliaram-se as atividades das enzimas E-NTPDase e E-ADA em linfócitos de pacientes FIDC. As atividades das enzimas E-NTPDase e E-ADA revelaram uma menor degradação de nucleotídeos (ATP e ADP) e de adenosina, respectivamente, em linfócitos de pacientes FIDC. A atividade diminuída da E-NTPDase poderia estar relacionada à uma modulação enzimática frente à liberação de baixas quantidades de ATP das células em resposta a baixo grau de estímulo gerado pelo *T. cruzi*, durante a fase crônica latente da doença de Chagas.

Apesar de ser tóxico para as células, o ATP é necessário para a manutenção da resposta imune, citotoxicidade e produção de importantes citocinas do tipo 1,

secretadas por linfócitos T CD4+ (LANGSTON et al., 2003), relacionadas à resposta celular. O ATP é liberado para o meio extracelular em baixas quantidades durante uma infecção crônica, podendo atuar como um mediador anti-inflamatório, através do estímulo preferencialmente de receptores purinérgicos P2Y. A ativação dos receptores P2Y leva a uma baixa modulação de citocinas pró-inflamatórias, além de induzir a diferenciação de linfócitos T “nãive” em linfócitos Th2, o que levaria ao aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias (DI VIRGILIO et al., 2009).

Segundo Wang e colaboradores (1997), o aumento da expressão da E-NTPDase em linfócitos pode ser associado ao aumento das atividades ATPásicas e ADPásicas, no entanto, nenhuma alteração na expressão desta enzima foi observada na superfície de linfócitos dos pacientes. Isto demonstra que as alterações hidrolíticas observadas possam resultar de alguma mudança na conformação tridimensional da própria enzima e não de modificações na sua expressão.

Tem sido demonstrado que durante a fase indeterminada da doença de Chagas um fino balanço entre as respostas Th1 e Th2 é fundamental para que ocorra um equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito. Conseqüentemente, há um equilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN- γ , TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL10) que modulam a resistência contra o *T. cruzi* e o desenvolvimento de uma das formas clínicas da doença de Chagas (DUTRA et al. 1997; SATHLER-AVELAR et al., 2008). No entanto, uma regulação de baixa produção de citocinas pró-inflamatórias (produzidas em uma resposta Th1) e da indução de resposta Th2, com aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, pode ser uma consequência imunológica da infecção, relacionada com a adaptação do hospedeiro (PEARCE et al., 1991).

Esta resposta imunorregulatória do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi* tem sido relatada por vários grupos de pesquisadores. Abrahamsohn e colaboradores (1996) demonstraram *in vivo* que a IL-10 exerce um importante papel regulatório na resistência à infecção pelo *T. cruzi* por controlar a patologia da doença em situações de intensa ativação de resposta Th1. Assim como, Souza e colaboradores (2004) observaram que pacientes FIDC apresentam uma menor habilidade de estimular células T CD4+, representando um importante mecanismo de controle da reação inflamatória e, conseqüentemente, desenvolvimento de menor dano tecidual.

Como a atividade da E-5'-NT em linfócitos não foi determinada neste estudo, acredita-se que ela possa estar aumentada nos pacientes com FIDC, pois elevados níveis de adenosina foram determinados no soro dos mesmos. Além da E-5'-NT, que participa da etapa final do metabolismo dos nucleotídeos, catalisando a formação da adenosina extracelular a partir do AMP, duas outras enzimas são importantes para a regulação dos níveis extracelulares da adenosina, a ADA e a adenosina quinase, além dos transportadores de nucleosídeos presentes na superfície das células.

A E-ADA, uma essencial enzima para a diferenciação, desenvolvimento normal e proliferação de linfócitos e do sistema monócito-macrófago (ALDRICH et al., 2000) tem sido usada para monitorar várias doenças na qual a imunidade tem estado alterada (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 1988). A adenosina, produzida pela ação da E-ADA, desempenha um papel direto e central na regulação das respostas inflamatórias por inibir a ativação linfocitária e regular a secreção de citocinas Th1 e Th2 através da ativação de receptores A_{2a} (GESSI et al., 2007). Desta forma, a adenosina atua como um sinal de feedback negativo por neutralizar a estimulação da resposta imune mediada pelo ATP, evitar descontrolada inflamação e diminuir o dano colateral em tecidos saudáveis (GESSI et al., 2007). Portanto, a diminuição na atividade da E-ADA encontrada em linfócitos dos pacientes, poderia estar contribuindo para a preservação de adenosina extracelular, a qual atuaria localmente através de receptores de adenosina, particularmente em receptores A_{2a} , desencadeando seus efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios (BOURS et al., 2006). A adenosina extracelular, por sua vez, diminuiria a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e aumentaria a de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, induzindo à inversão de uma resposta Th1 para Th2.

Sugere-se que os níveis aumentados de AMP encontrados no soro dos pacientes com FIDC, possivelmente possam ser atribuídos à ação da adenilato quinase (EC 2.7.4.3) em resposta a baixos níveis de ATP e elevados níveis de adenosina extracelular. Como proposto por Yegutkin e colaboradores (2002), uma via oposta (anabólica) levaria à recuperação de nucleotídeos de adenina, os quais são importantes para ativação da resposta imune; e à regulação das concentrações de adenosina no meio extracelular, a qual pode ser tóxica para as células e induzir um estado de intensa imunossupressão e conseqüentemente reativação da doença de Chagas.

Portanto, as alterações enzimáticas observadas nos linfócitos, contribuiriam para o estabelecimento de um ambiente anti-inflamatório, comumente encontrado nos pacientes com FIDC, a fim de diminuir os danos teciduais e de resistir à persistência do parasitismo.

As ectoenzimas responsáveis pelo metabolismo do ATP também atuam no sistema vascular, através da manutenção da hemostasia e trombogênese, principalmente por regular a agregação plaquetária (YEGUTKIN et al., 2008). Alguns estudos têm relatado que funções regulatórias desempenhadas pela E-NTPDase na vasculatura, como tromborregulação e permeabilidade endotelial, provavelmente estejam correlacionadas ao aumento da atividade desta enzima em células endoteliais e células musculares lisas vasculares (GORDON et al., 1989). No entanto, ao avaliar a atividade da E-NTPDase em plaquetas de pacientes com FIDC não foram observadas alterações na hidrólise tanto do ATP quanto do ADP.

As plaquetas expressam distintos conjuntos destas ectoenzimas bem como de receptores purinérgicos, regulando os processos tromboembólicos induzidos por lesões vasculares (FÜRSTENAU et al., 2006). Desta forma, avaliou-se a atividade da E-NPP, enzima também responsável pela hidrólise dos nucleotídeos de adenina extracelulares. Foi observado um aumento na atividade desta ectoenzima nas plaquetas dos pacientes, o que levaria ao consumo dos níveis de ATP e conseqüentemente à formação de elevados níveis de AMP extracelular no soro destes pacientes. Esta atividade aumentada contribuiria na regulação dos níveis de ATP e ADP liberados durante ativação plaquetária, uma vez que estes nucleotídeos são capazes de promover o recrutamento de plaquetas ao sítio da lesão vascular, favorecendo a agregação plaquetária e a formação do trombo.

A E-5'-NT, por sua vez, não somente termina a sinalização do ATP, mas gera também intermediários importantes para regulação da agregação plaquetária, como a adenosina, a partir do substrato AMP. A atividade da E-5'-NT demonstrou estar aumentada nas plaquetas dos pacientes, resultando em um aumento na produção de adenosina extracelular, a qual foi confirmada no soro dos mesmos.

Além do aumento das atividades da E-NPP e da E-5'-NT, uma diminuição da atividade da E-ADA em plaquetas foi observada nos pacientes, o que poderia representar um mecanismo dinâmico do organismo, a fim de preservar os níveis de adenosina no ambiente extracelular. Desta forma, a ação cardioprotetora da adenosina (KITAKAZE et al., 1999) minimizaria as alterações estruturais e funcionais

na microvasculatura coronariana, as quais são responsáveis pela isquemia e necrose focal, permitindo que os pacientes permaneçam assintomáticos, com eletrocardiograma e exame radiológico do coração normais.

A adenosina é uma importante molécula sinalizadora na vasculatura, podendo influenciar nas respostas vasomotoras, na função cardíaca, nas respostas inflamatórias e na agregação plaquetária, dependendo do tipo de receptor purinérgico P1 ao qual se liga (BOROWIEC et al., 2006). É considerada um metabólito cardioprotetor por inibir a agregação plaquetária, regular processos inflamatórios e ativar receptores que causam vasodilatação coronariana, fornecendo mais oxigênio e nutrientes para o coração durante condições de isquemia e hipóxia (JENNINGS & STEENBERGEN, 1985; ELY & BERNE, 1992; SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997; BOROWIEC et al., 2006). Também exerce seus efeitos anti-agregantes ao estimular especialmente receptores A_{2A} e A_{2B} (JOHNSTON-COX et al., 2011), que regulam o aumento da produção de AMPc, um inibidor da ativação plaquetária (PAUL et al., 1990). O AMPc, por sua vez, inibe a ativação plaquetária através da ativação da PKA, a qual fosforila diversos substratos, como o receptor IP3, reduzindo a liberação de íons cálcio intracelulares estocados (SIM et al., 2004).

É descrito na literatura que disfunções endoteliais desencadeadas pela infecção pelo *T. cruzi*, favorecem a aderência e agregação plaquetárias, resultando em freqüentes alterações microvasculares na doença de Chagas (ROSSI et al., 1984; ROSSI et al., 1985; TANOWITZ et al., 1990; MARIN-NETO et al., 1992). Os eventos tromboembólicos estão intimamente associados à ativação inflamatória, uma vez que a lesão e a ativação do endotélio levam a alterações na permeabilidade endotelial e ao aumento da adesão de leucócitos e plaquetas (SATTAR et al., 2003). As plaquetas têm um importante papel na manutenção da integridade endotelial e da hemostasia (MARCUS et al., 1997), além de participarem da resposta inflamatória, bem como de eventos que levam à trombogênese (ARBER et al., 1991). A interação entre plaquetas e endotélio danificado estimula a formação de moléculas vasoativas como ATP e ADP, promovendo ativação de plaquetas, e conseqüentemente agregação das mesmas e formação de trombo oclusivo.

Tanto estudos experimentais em murinos quanto *in vitro* têm apresentado que disfunções endoteliais relacionadas à infecção pelo *T. cruzi* levam ao aumento da atividade das plaquetas. Isto contribui para agregação plaquetária intravascular, que

leva a vasoespasmos, à hipoperfusão vascular e áreas de isquemia tecidual, principalmente no miocárdio (ROSSI et al., 1984; TANOWITZ et al., 1990).

Uma excessiva agregação plaquetária pode ocorrer na vasculatura danificada como uma consequência do processo inflamatório desencadeado pela infecção parasitária. Entretanto, os pacientes com FIDC apresentaram uma diminuição na agregação plaquetária, possivelmente contribuindo para a prevenção da formação de trombo oclusivo e conseqüentemente isquemia vascular, o que levaria à evolução clínica cardíaca da doença de Chagas. Desta forma, sugere-se que as alterações nas atividades das ectoenzimas responsáveis pelo metabolismo do ATP em plaquetas de pacientes com FIDC, estejam envolvidas no status da agregação plaquetária observado nestes pacientes.

Em resumo, pode-se concluir que a infecção crônica desencadeada pelo *T. cruzi* provoca alterações bioquímicas, envolvendo a regulação do tipo de resposta imune celular bem como de eventos trombóticos nos pacientes com FIDC. Essas alterações podem ser verificadas através das modificações nas atividades das ectoenzimas, responsáveis pelo metabolismo do ATP extracelular, em linfócitos e plaquetas de pacientes com FIDC, o que poderia estar relacionado com uma adaptação do hospedeiro ao parasitismo persistente pelo *T. cruzi* durante a fase crônica assintomática, evitando assim, a evolução clínica da doença.

6 CONCLUSÕES

- As alterações enzimáticas observadas nos linfócitos dos pacientes com FIDC favorecem uma resposta anti-inflamatória, como resultado de uma adaptação do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*, evitando assim maiores danos teciduais e a evolução clínica da doença.
- A manutenção de baixas concentrações de ATP e altas concentrações de adenosina no meio extracelular, exercida pelas ectoenzimas, induzem a esta resposta anti-inflamatória, por neutralizar a estimulação da resposta imune mediada pelo ATP através de efeitos imunossupressores da adenosina.
- As altas concentrações de adenosina extracelular, resultantes da atividade das ectoenzimas em plaquetas poderiam ser responsáveis também por efeitos vasodilatadores e cardioprotetores, além de propriedades anti-agregantes que contribuem para a prevenção de isquemia e necrose miocárdica, evitando o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica nestes pacientes.
- A sinalização purinérgica mostrou estar envolvida nas respostas imune e tromborregulatória nos pacientes com FIDC.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Introdução ao Sistema Imunológico. In:____. **Imunologia Básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico**, 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. 6, p. 111-127.

ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental Parasitology**, v. 84, p. 231-44, 1996.

ALDRICH, M.B.; BLACKBURN, M.R.; KELLEMS, R.E. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 272, p. 311-315, 2000.

ALIBERTI J.C.; CARDOSO M.A.; MARTINS G.A.; GAZZINELLI R.T.; VIEIRA L.Q.; SILVA J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v. 64, p.1961-1967, 1996.

ALVES-FERREIRA, M.; DUTRA, P.M.; LOPES, A.H.; FERREIRA-PEREIRA, A.; SCOFANO, H.M.; MEYER-FERNANDES, J.R. Magnesium-dependent ecto-ATP diphosphohydrolase activity in *Herpetomonas muscarum muscarum*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 265-271, 2003.

ANDRADE, Z.A. Anatomia patológica da doença de Chagas. **Revista Goiânia de Medicina**, v. 4, p. 103-119, 1958.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; CORREA, R.; SADIGURSKY, M.; FERRANS, V.J. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. **The American Journal of Pathology**, v. 144, p. 1403-1411, 1994.

ANTONELLI, L.R.; DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O., CARVALHO, E.M.; GOLLOB, K.J. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 101, p. 226-230, 2005.

ARAN, J.M.; COLOMER, D.; MATUTES, E.; VIVES-CORRONS, J.L.; FRANCO, R. Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunochemical localization using light and electron microscopy. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39, p. 1001-1008, 1991.

ARBER, N.; BERLINER, S.; PRAS, E.; ARBER, L.; FISHELSON, Z.; KAHN, Y.; BASSAT, M.B.; PINKHAS, J.; ARORSON, M. Heterotypic leucocyte aggregation in the peripheral blood of patients with leukaemia, inflammation and stress. **Nouvelle Revue Française D'Hématologie**, v.33, p.251-255, 1991.

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S.C. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic target. **Blood cells, Molecules and Diseases**, v.36, n.2, p.217-222, 2006.

BAPTISTA-SILVA, J.C.C. Isquemia crônica crítica de membros: diagnóstico clínico. **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA; 2004.

BARSOTTI, C.; IPATA, P.L. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 2214-2225, 2004.

BELLI, S.I.; VAN DRIEL, I.R.; GODING, J.W. Identification and characterization of a soluble form of the plasma cell membrane glycoprotein PC-1 (5'-nucleotide phosphodiesterase). **European Journal of Biochemistry**, v. 217, p. 421-428, 1993.

BEN YOUNÈS-CHENNOUFI, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; TRICOTTET, V.; EISEN, H.; REYNES, M.; SAID, G. Persistence of Trypanosoma cruzi antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 77-83, 1988.

BERMUDES, D.; PECK, K.R.; AFIFI, M.A.; BECKERS, C.J.; JOINER, K.A. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 29252-29260, 1994.

BERRÊDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C.E.; CHRISPIM, P.P.; BELMONT-FIRPO, R.; LEMOS, A.P.; MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M.A.; MEYER-FERNANDES, J.R. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, p. 16-24, 2001.

BOLLEN, M.; GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; STALMANS, W.; STEFAN, C. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.393-432, 2000.

BOROWIEC, A.; LECHWARD, K.; TKACZ-STACHOWSKA, K.; SKLADANOWSKI, A.C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 269-278, 2006.

BOURS, M.J.; 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.

BRITTO C.; CARDOSO M.A.; VANNI C.M.; HASSLOCHER-MORENO A.; XAVIER S.S.; OELEMANN W.; SANTORO A.; PIRMEZ C.; MOREL C.M.; WINCKER, P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**, v. 110, p. 241-247, 1995.

BRUNS, R.F. Adenosine receptors. Roles and pharmacology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 603, p. 211-225; discussion 225-6, 1990.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews**, v. 24, p. 509-581, 1972.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptors subtypes in different systems. **International Reviews of Cytology**, v.240, p.31-304, 2004.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, p. 1471-83, 2007.

CARDILLO F.; POSTOL E.; NIHEI J.; AROEIRA L.S.; NOMIZO A.; MENGEL J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, p. 584-595, 2007.

CASTRO, H.C.; FERREIRA, B.L.A.; NAGASHIMA, T.; SCHUELER, A.; RUEFF, C.; CAMISASCA, D.; MOREIRA, G.; SCOVINO, G.; BORGES, L.; LEAL, M.; FIGUEIRA, M.; PASCHOAL, P.; BERNARDO, V.; BOURGUINHON, S.; RODRIGUES, C.R.; SANTOS, D.O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 321-332, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). New global effort to eliminate Chagas disease. **Weekly Epidemiological Record**, v. 82, p. 259-260, 2007.

CHAGAS, C. Processos patogênicos da tripanozomíase americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 5-59, 1916.

CIMPEAN, A.; STEFAN, C.; GIJSBERS, R.; STALMANS, W.; BOLLEN, M. Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. **The Biochemical Journal**, v. 381, p. 71-77, 2004.

CIRUELA, F.; SAURA, C.; CANELA, E.I.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. **FEBS Letters**, v. 380, p. 219-223, 1996.

CRONSTEIN, B.N.; KRAMER, S.B.; WEISSMANN, G.; HIRSCHHORN, R. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. **The Journal Experimental Medicine**, v.158, p. 1160-1177, 1983.

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

CUNA W.R.; CUNA C.R. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 503-506, 1995.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, p. 107-25, 2001.

DAHLBÄCK B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. **Journal Internal Medicine**, v. 257, p. 209-223, 2005.

DE JESUS, J.B.; DE SÁ PINHEIRO, A.A.; LOPES, A.H.; MEYER-FERNANDES, J.R. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. **Zeitschrift Für Naturforschung C, Journal of Biosciences**, v. 57, p. 890-896, 2002.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1-12, 2003.

DIAS, J.C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, p. 147-156, 1989.

DIAS, J.C.P.; BORGES DIAS, R. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v. 31, p. 105-124, 1979.

DI VIRGILIO, F. ATP as a death factor. **Biofactors**, v. 8, p. 301-303, 1998.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J.M.; MORELLI, A.; TRBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O.R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, p.587-600, 2001.

DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 205-209, 2006.

DI VIRGILIO, F.; BOEYNAEMS, J.M.; ROBSON, S.C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current Opinion Pharmacology**, v. 9, p. 507-13, 2009.

DORN P.; BUEKENS P.; HANFORD, E. Whac-a-mole: future trends in Chagas transmission and the importance of a global perspective on disease control. **Future Microbiology**, v. 2, p. 365-3677, 2007.

DUARTE, M.M.; LORO, V.L.; ROCHA, J.B.; LEAL, D.B.; BEM, A.F.; DORNELES, A.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 2707-2714, 2007.

DUTRA, W.O.; COLLEY, D.G.; PINTO-DIAS, J.C.; GAZZINELLI, G.; BRENER, Z.; PEREIRA, M.E.; COFFMAN, R.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARVALHO-PARRA, J.F. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 51, p. 91-97, 2000.

ENJYOJI, K.; SEVIGNY, J.; LIN, Y.; FRENETTE, P.S.; CHRISTIE, P.D.; ESCH, J.S.I.I.; IMAI, M. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v.5, p.1010-1017, 1999.

ELY, S.W.; BERNE, R.M. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. **Circulation**, v. 85, p. 893-904, 1992.

FACTOR, S.M.; CHO, S.; WITTNER, M.; TANOWITZ, H. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.34, p.246-253, 1985.

FARIA, D.R.; GOLLOB, K.J.; BARBOSA, J. JR.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.R.; LESSA, H.; CARVALHO, L.P.; ROMANO-SILVA, M.A.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; DUTRA, W.O. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 7853-7859, 2005.

FAVALORO, E.J. Differential expression of surface antigens on activated endothelium. **Immunology and Cell Biology**, v. 71, p. 571-581, 1993.

FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; SCHWAEBLE, W.; LEMUS, D.; FERREIRA, A. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 169-174, 2005.

FIETTO, J.L.R.; DEMARCO, R.; NASCIMENTO, I.P.; CASTRO, I.M.; CARVALHO, T.M.; DE SOUZA, W.; BAHIA, M.T.; ALVES, M.J.; VERJOWSKI-ALMEIDA, S. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 454-460, 2004.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R.E.; AGUI, T.; SITKOVSKY, M.V. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 334-340, 1990.

FOX, D.A.; HUSSEY, R.E.; FITZGERALD, K.A.; ACUTO, O.; POOLE, C.; PALLEY, L.; DALEY, J.F.; SCHLOSSMAN, S.F.; REINHERZ, E.L. Ta1, a novel 105 KD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody. **Journal of Immunology**, v. 133, p. 1250-1256, 1984.

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

FRANCO, R.; VALENZUELA, A.; LLUIS, C.; BLANCO, J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunological Reviews**, v. 161, p. 27-42, 1998.

FROJMOVIC, M.M.; PANJWANI, R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. **Biophysical Journal**, v. 16, p. 1071-1089, 1976.

FUENMAYOR, C.; HIGUCHI, M.L.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; GUTIERREZ, P.; AIELLO, V.; PALOMINO, S. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. **Acta Cardiologica**, v. 60, p. 33-37, 2005.

FÜRSTENAU, C.R.; TRENTIN, D.S. ; BARRETO-CHAVES, M.L.M. ; SARKIS, J.J.F. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**, v.17, p.17:84-91, 2006.

GAKIS, C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. **The European Respiratory Journal**, v. 9, p. 623-624, 1996.

GESSI, S.; VARANI, K.; MERIGHI, S.; FOGLI, E.; SACCHETTO, V.; BENINI, A.; LEUNG, E.; MAC-LENNAN, S.; BOREA, P.A. Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 109-16, 2007.

GIMBRONE, M.A. Interleukin-1(IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. **The Journal Experimental Medicine**, v. 160, p. 618-623, 1984.

GODING, J.W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **Journal of Leukocyte Biology**, v.67, p.285-311, 2000.

GODING, J.W.; GROBBEN, B.; SLEGGERS, H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-pyrophosphatase/ phosphodiesterase family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1638, p.1-19, 2003.

GOMES, J.A.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; ROCHA, M.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1185-1193, 2003.

GONZALEZ-ALONSO, J.; OLSEN, D.B.; SALTIN, B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery role of circulating ATP. **Circulation Research**, v.91, p.1046-1055, 2002.

GORDON, E.L.; PEARSON, J.D.; DICKINSON, E.S.; MOREAU, D.; SLAKEY, L.L. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. Regulation of adenosine production at the cell surface. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 18986-95, 1989.

GORELL, M.D.; GYSBERS, V.; McCAUGHAN, G.W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 54, p. 249-264, 2001.

HARKER, L.A.; FINCH, C.A. Thrombokinetics in man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. 963-974, 1969.

HARTWIG, J.H. Platelet structure. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.

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

HERRERA, C.; CASADO, V.; CIRUELA, F.; SCHOFIELD, P.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 127-134, 2001.

HERRERA, R.N.; DIAZ, E.; PEREZ, R.; CHAIN, S.; SANT-YACUMO, R.; RODRIGUES, E.; BIANCHI, J.; COVIELLO, A.; MIOTTI, J.; FLORES, I. Estado protrombótico en estadios tempranos de la enfermedad de Chagas crónica. **Revista Española de Cardiología**, v. 56, p. 377-382, 2003.

HIGUCHI, M.L.; GUTIERREZ, P.S.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial

rejection process. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 423, p. 157-160, 1993.

HIGUCHI, M.L. Doença de Chagas. Importância do Parasita na Patogenia da Forma Crônica Cardíaca. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 64, p. 251-254, 1995.

HOARE, C.A. The Trypanosomes of Mammals. **A Zoological Monograph**. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 749 pp, 1972.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; STILLWAGGON, E.; BENTWICH, Z.; KUMARESAN, J. Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. **Lancet**, v. 368, p. 1865-1866, 2006.

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

IANNI, B.M.; ARTEAGA, E.; FRIMM, C.C.; PEREIRA BARRETTO, A.C.; MADY, C. Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.77, p.59-62, 2001.

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

JANSEN, S.; STEFAN, C.; CREEMERS, J.W.; WAELKENS, E.; VAN EYNDE, A.; STALMANS, W.; BOLLEN, M. Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 3081-3089, 2005.

JENNINGS, R.B.; STEENBERGEN, C. JR Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. **Annual Review of Physiology**, v.47, p. 727-749, 1985.

JOHNSTON-COX, HA.; YANG, D.; RAVID, K. Physiological implications of adenosine receptor-mediated platelet aggregation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, p. 46-51, 2011.

JORGENSEN, L.; ROWSELL, H.C.; HOVIG, T.; GLYNN, M.F.; MUSTARD, J.F. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation and myocardial infarction in swine. **Laboratory Investigation**, v.17, p. 616-644, 1967.

JORGENSEN, L.; HOVIG, T.; ROWSELL, H.C.; MUSTARD, J.F. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation and vascular injury in swine and rabbits. **The American Journal of Pathology**, v. 61, p. 161-170, 1970.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, p. 201-212, 2011.

KACSMARECK, E.; KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; SIEGEL, J.B.; ANRATHER, J.; BEAUDOIN, A.R.; BACH, F.H.; ROBSON, S.C. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33116-33122, 1996.

KAMEOKA, J.; TANAKA, T.; NOJIMA, Y.; SCHLOSSMAN, S.F.; MORIMOTO, C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. **Science**, v. 261, p. 466-469, 1993.

KANSAS, G.S.; WOOD, G.S.; TEDDER, T.F. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 146, p. 2235–2244, 1991.

KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. **Blood**, v. 86, p. 419-443, 1995.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v. 96, p. 2157-2162, 2000.

KINUGAWA, T.; FUJITA, M.; OGINO, K.; KATO, M.; OSAKI, S.; IGAWA, O.; SHIGEMASA, C.; HISATOME, I.; KITAKAZE, M. Catabolism of adenine nucleotides favors adenosine production following exercise in patients with chronic heart failure. **Journal Cardiac Failure**, v. 12, p. 720-725, 2006.

KITAKAZE, M.; MINAMINO, T.; NODE, K.; TAKASHIMA, S.; FUNAYA, H.; KUZUYA, T.; HORI, M. Adenosine and cardioprotection in the diseased heart. **Japanese Circulation Journal**, v. 63, p. 231-243, 1999.

KUKULSKI, F.; LÉVESQUES, S.A.; LAVOIE, E.G.; LECKA, J.; BIGONNESSE, F.; KNOWLES, A.F.; ROBSON, S.C.; KIRLEY, T.L.; SÉVIGNY, J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonist by NTPDase 1,2,3 and 8. **Purinergic Signalling**, v.1, p.193-204, 2005.

LANGSTON, H.P.; KE, Y.; GEWIRTZ, A.T.; DOMBROWSKI, K.E.; KAPP, J.A. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 463-484, 2001.

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

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998, v I e II, p.2623.

LIBBY, P.; ALROY J.; PEREIRA, M.E.A. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. **The Journal Clinical Investigation**, v. 77, p. 127-135, 1986.

LIBBY, P.; WAGNER, S.J.C.; FRIEDMAN, G.B. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. **The Journal Clinical Investigation**, v. 81, p. 487-498, 1988.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Patogenia das Manifestações Cardíacas na Doença de Chagas. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 65, p. 367-375, 1995.

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.

MAGUIRE, J.H.; HOFF, R.; SHERLOCK, I.; GUIMARÃES, A.C.; SLEIGH, A.C.; RAMOS, N.B.; MOTT, K.E.; WELLER, T.H. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. **Circulation**, v. 75, p. 1140-1145, 1987.

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

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.; ISLAM, N.; ALYONCHEVA, T.N.; SAFIER, L.B.; HAJJAR, K.A.; POSNETT, D.N.; SCHOENBORN, M.A.; SCHOOLET, K.A.; GAYLE, R.B.; MALISZEWSKI, C.R. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. **The Journal of Clinical Investigation**, v.996, p.1351-60, 1997.

MARCUS, J.A.; BROEKMN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.F.; ISLAM, N.; PINSKY, D.J.; SESTI, C.; LEVI, R. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/Ectonucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.305, p.9-16, 2003.

MARIN-NETO, J.A.; MARZULLO, P.; MARCASSA, C.; GALLO, JÚNIOR L.; MACIEL, B.C.; BELLINA, C.R.; L'ABBATE, A. Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy. **The American Journal of Cardiology**, v. 69, p. 780-784, 1992.

MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.C.; SIMOES, M.V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. **Circulation**, v. 115, p. 1109-1123, 2009.

MARTIN, M.; HUGUET, J.; CENTELLES, J.J.; FRANCO, R. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. **The Journal of Immunology**, v. 155, p. 4630-4643, 1995.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, D.; ARENAS-BARBERO, J.; NAVARRO-GALLAR, F.; GARCÍA-ESTEBAN, R.; SANTOS-SANCHO, J.; GOMEZ-DE-TERREROS, F. Adenosine deaminase in the acquired immunodeficiency syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 1949, 1988.

MASSBERG, S.; BRAND, K.; GRÜNER, S.; PAGE, S.; MÜLLER, E.; MÜLLER, I.; BERGMEIER, W.; RICHTER, T.; LORENZ, M.; KONRAD, I.; NIESWANDT, B.; GAWAZ, M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 887-896, 2002.

MEDEI, E.H; NASCIMENTO, J.H.M.; PEDROSA, R.C.; CARVALHO, A.C.C. Role of autoantibodies in the physiopathology of Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v. 91, p. 281-286, 2008.

MENEZES, C.A.S.; TEIXEIRA, M.M.; DUTRA, W.O. A resposta imunológica dos pacientes chagásicos. In: Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: MS,2004. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=163>>. Acesso em: 1 mai. 2011.

MINAMINO, T.; KITAKAZE, M.; MORIOKA, T.; NODE, K.; KOMAMURA, K.; TAKEDA, H.; INOUE, M.; HORI, M.; KAMADA, T. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. 238–244, 1996.

MIZUMOTO, N.; KUMAMOTO, T.; ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; MATSUE, H.; ENJYOJI, K.; TAKASHIMA, A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. **Nature Medicine**, v. 8, p. 358-365, 2002.

MORRIS, S.A.; TANOWITZ, H.; MAKMAN, M.; HATCHER, V.B.; BILEZIKIAN, J.P.; WITTNER, M. *Trypanosoma cruzi*: alteration of cAMP metabolism following infection of human endothelial cells. **Experimental Parasitology**, v. 74, p. 69-76, 1992.

MUÑOZ, J.; GÓMEZ I PRAT, J.; GÁLLEGO, M.; GIMENO, F.; TREVIÑO, B.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; RIBERA, O.; MOLINA, L.; SANZ, S.; PINAZO, M.J.; RIERA, C.; POSADA, E.J.; SANZ, G.; PORTÚS, M.; GASCON, J. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). **Acta Tropica**, v. 111, p. 51-55, 2009.

O'FARRELL, P.H. Conserved responses to oxygen deprivation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 671-674, 2001.

PARK, H-S; HOURANI, S.M.O. Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by denosine 5'-diphosphate (ADP) in human platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1359-1366, 1999.

PAUL, S.; FEOKTISTOV, I.; HOLLISTER, A.S.; ROBERTSON, D.; BIAGGIONI, I. Adenosine inhibits the rise in intracellular calcium and platelet aggregation produced by thrombin: evidence that both effects are coupled to adenylate cyclase. **Molecular Pharmacology**, v. 37, p.870-875, 1990.

PEARCE, E.J.; GASPAR, P.; GRZYCH, J.M.; LEWIS, F.A.; SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 159-166, 1991.

PENIDO, M.L.O.; RESENDE, D.M.; VIANELLO, M.A.; BORDIN, F.H.S.; JACINTO, A.A.; DIAS, W.D.; MONTESANO, M.A.; NELSON, D.L.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal of Pharmacology**, v. 570, p. 10-17, 2007.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **International Review of Cytology**, v. 158, p. 141-214, 1995.

PRATA, A. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 81-88, 1999.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. **The Lancet Infectious Disease**, v. 1, p. 92-100, 2001.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R.M.; KHAN, I.A.; NAVARRO, V.S.; VASAVADA, B.C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 115, p. 279-283, 2007.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptores for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 413-492, 1998.

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

RAMOS, S.G.; ROSSI, M.A. Microcirculation and Chagas' disease: hypothesis and recent results. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 123-129, 1999.

REED, S.G. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In: molecular approaches to Parasitology. New York: **Wiley-Liss Inc.**, p. 443-445, 1995.

REIS, D.D.; JONES, E.M.; TOSTES, S.JR.; LOPES, E.R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G.; MCCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 637-644, 1993.

RESTA, R.; YAMASHITA, Y.; THOMPSON, L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. **Immunological Reviews**, v.161, p.95-109, 1998.

REVERTER, J.C. Thromboembolic events and prothrombotic phenomena in Chagas disease. **Enfermedades Emergentes**, v. 8, p. 25-27, 2006.

REVEL, T.; DOGHMI, K. Physiologie de l'hémostase. EMC-Odontologie, v. 1, p. 71-81, 2004.

RIZZO, L.V.; CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, A.R.L. Autoimmunity in Chagas' Disease: Specific Inhibition of Reactivity of CD4+ T Cells against Myosin in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, v. 57, p. 2640-2644, 1989.

ROBSON, S.C.; WU, Y.; SUN, X.; KNOSALLA, C.; DWYER, K.; ENJYOJI, K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 31, p. 217-33, 2005.

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

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

ROSSI, M.A.; GONÇALVES, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. **The American Journal of Pathology**, v. 114, p. 209-216, 1984.

ROSSI, M.A.; CAROBREZ, S.G. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. **British Journal Experimental of Pathology**, v. 66, p. 155-160, 1985.

ROSSI, M.A.; MENGEL, J.O. Patogênese da miocardite chagásica crônica: o papel de fatores autoimunes e microvasculares. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 593-599, 1992.

ROSSI, M.A. Aortic endothelial cell changes in the acute septicemic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection in ratas: scanning and transmission electron microscopy study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 321-327, 1997.

RÜCKER, B.; ALMEIDA, M.E.; LIBERMANN, T.A.; ZERBINI, L.F.; WINK, M.R.; SARKIS, J.J. Biochemical characterization of ecto-nucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase (E-NPP, E.C. 3.1.4.1) from rat heart left ventricle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 306, p. 247-54, 2007.

RUSSELL, R. Mechanisms of disease: Atherosclerosis – an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v.320, n.2, p.115-126, 1999.

SAKAGAMI, H.; AOKI, J.; NATORI, Y.; NISHIKAWA, K.; KAKEHI, Y.; NATORI, Y.; ARAI, H. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family. **The Journal Biological Chemistry**, v. 280, p. 23084-23093, 2005.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D.M.; MASSARA, R.L.; DE LANA, M.; PINTO DIAS, J.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELÓI-SANTOS, S.M.; MARTINS-FILHO, O.A. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 103-13, 2008.

SATTAR, N.; MCCAREY, D.W.; CAPELL, H.; MCINNES, I.B. Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. **Circulation**, v.108, p. 2957-63, 2003.

SAURA, C.; CIRUELA, F.; CASADO, V.; CANELA, E.I.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. **Journal Neurochemistry**, v. 66, p. 1675-1682, 1996.

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D.M.; MENDES-DA-CRUZ, D.A.; SILVA-MONTEIRO, E.; PEREZ, A.R.; AOKI MDEL, P.; BOTTASSO, O.; GUIÑAZU, N.; SILVA-BARBOSA, S.D.; GEA, S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, p. 107-124, 2007.

SCHAFER, A.I. Antiplatelet therapy. **The American Journal of Medicine**, v. 101, p. 199-209, 1996.

SHAROYAN, S.; ANTONYAN, A.; MARDANYAN, S.; LUPIDI, G.; CRISTALLI, G. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochimica Polonica**, v.53, p. 539- 546, 2006.

SILVA, J.S.; ALIBERTI, J.C.; MARTINS, G.A.; SOUZA, M.A.; SOUTO, J.T.; PÁDUA, M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 111-115, 1998.

SIM, D.S.; MERRILL-SKOLOFF, G.; FURIE, B.C.; FURIE, B.; FLAUMENHAFT, R. Initial accumulation of platelets during arterial thrombus formation in vivo is inhibited by elevation of basal cAMP levels. **Blood**, v. 103, p. 2127-34, 2004.

SIXMA, J.J.; SLOT, J.W.; GEUZE, H.J. Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. **Methods in Enzymology**, v. 169, p. 301-311, 1989.

SOBOL, A.B.; WATALA, C. The role of platelets in diabetes-related vascular complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.50, p.1-16, 2000.

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.

SOUZA, P.E.; ROCHA, M.O.; ROCHA-VIEIRA, E.; MENEZES, C.A.; CHAVES, A.C.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5283-5291, 2004.

SOUZA, P.E.; ROCHA, M.O.; MENEZES, C.A.; COELHO, J.S.; CHAVES, A.C.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. *Trypanosoma cruzi* infection induces Differential Modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chaga's disease. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 1886-1894, 2007.

SPRAGUE, R.S.; STEPHENSON, A.H.; ELLSWORTH, M.L. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, p.350-355, 2007.

SPRONK, H.M.H.; VAN DER VOORT, D.; TEN CATE, H. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. **Thrombosis Journal**, v. 2, p. 1-10, 2004.

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

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 361-70, 2006.

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

STRUKOVA, S.M. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, p. 8-18, 2001.

TANOWITZ, H.B.; BURNS, E.R.; SINHA, A.K.; KAHN, N.N.; MORRIS, S.A.; FACTOR, S.M.; HATCHER, V.B.; BILEZIKIAN, J.P.; BAUM, S.G.; WITTNER, M. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, p. 274-281, 1990.

TARLETON, R.L.; GRUSBY, M.J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L.H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **International Immunology**, v. 8, p. 13-22, 1996.

TARLETON, R.L. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 550-554, 2001.

TARLETON, R.L.; REITHINGER, R.; URBINA, J.A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E. The challenges of Chagas Disease – grim outlook or glimmer of hope? **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, p. e332, 2007.

TORRES, I.L.; BUFFON, A.; DANTAS, G.; FÜRSTENAU, CR.; BÖHMER, A.E.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J.; DALMAZ, C.; FERREIRA, M.B. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, p. 181-186, 2002.

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.

UNGERER, J.P.J.; OOSTHUIZEN, H.M.; BISSBORT, S.H.; VERMMAK, W.J.H. Serum adenosine deaminase: isoenzyme and diagnostic application. **Clinical Chemistry**, v. 38, p. 1322-1326, 1992.

VANNI, D.S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A.M.; DAHER, J.P.L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.3, p.181-189, 2007.

VAN VOORHIS, W.C. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 239-248, 1992.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas”. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 176-293, 1911.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, p. 7-12, 2000.

VORCHHEIMER, D.A.; BECKER, R. Platelets in atherothrombosis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, p. 59-68, 2006.

WAKEFIELD, T.W.; MYERS, D.D.; HENKE P.K. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.28, n.3, p.387-91, 2008.

WANG, T.F.; ROSENBERG, P.A.; GUIDOTTI, G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 47, p. 295-302, 1997.

WEINSTEIN, C.; FENOGLIO, J.J. Myocarditis. **Human Pathology**, v. 18, p. 613-618, 1987.

YEGUTKIN, G.G.; HENTTINEN, T.; SAMBURSKI, S.S.; SPYCHALA, J.; JALKANEN, S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. **The Biochemical Journal**, v. 367, p. 121-8, 2002.

YEGUTKIN, G.G.; SAMBURSKI, S.S.; JALKANEN, S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. **The FASEB Journal**, v. 17, p. 1328–1330, 2003.

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

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**.1ª ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2004.

ZAVIALOV, A.V; ENGSTROM, A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **The Biochemical Journal**, v. 391, p. 51-57, 2005.

ZIMMERMANN, H. Extracellular purine metabolism. **Drug Development Research**, v. 39, p. 337–352, 1996.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, p. 299-309, 2000.

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

8 ANEXOS

Anexo A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título do projeto:

“Avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com Doença de Chagas”

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Instituição/Departamento : Departamento de Microbiologia e Parasitologia– UFSM

Telefone para contato: (55) 3220-9581 ou (55) 9153-3673

Local de coleta de dados: _____

Nome da paciente: _____ Idade: _____ anos

Responsável legal: _____

Objetivo do estudo/Riscos/Procedimentos/Benefícios/Sigilo:

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa e a responder um questionário, de forma voluntária, tendo o direito de desistir a qualquer momento.

Objetivo: a pesquisa avaliará a atividade de algumas substâncias que compõem o sangue de pacientes com Doença de Chagas e de pessoas sem qualquer outra doença, para melhor entendermos sobre a Doença de Chagas e assim obtermos informações capazes de futuramente auxiliar no controle e novos tratamentos, já que no momento não temos vacinas nem tratamentos específicos para esta doença.

Procedimento e riscos: a pesquisa consistirá na coleta de sangue podendo ocorrer o risco de um pequeno desconforto devido à picada da agulha, e do local da coleta ficar dolorido ou arroxado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde.

Benefícios: os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante e consiste apenas para ajudar em novos estudos sobre a evolução, controle e tratamento da Doença de Chagas.

Confidencialidade: as informações fornecidas no questionário serão de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Em nenhum momento será revelado ou utilizado seu nome.

Acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos deste estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, assim como a garantia de que minhas informações serão preservadas. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Santa Maria, de de

Assinatura do sujeito de pesquisa ou

representante legal (para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

N. identidade

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Santa Maria, de de

Assinatura do responsável pelo estudo

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com os pesquisadores:

Daniela Bitencourt Rosa Leal – (055) 3220-9581

Viviane do Carmo Gonçalves Souza – (055) 9153-3673

Anexo B- Coleta dos dados**COLETA DE DADOS**

Titulo do projeto:

“Avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com Doença de Chagas”

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal - UFSM

Instituição/Departamento : Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFSM

Telefone para contato:(55) 3220- 9581 ou (55) 9153-3673

Identificação número: _____

Data da coleta : _____

Responsável pela coleta: _____

1. Grupo em que pertence o paciente:

- com doença de chagas recém diagnosticado
 com doença de chagas em fase aguda
 com doença de chagas em fase indeterminado
 com doença de chagas em fase crônica - digestiva
 com doença de chagas em fase crônica - cardíaca
 sem a doença de chagas

2. Paciente com a Doença de Chagas está em tratamento? Com qual medicamento (s)?

não sim _____

3. Paciente é fumante? sim não

4. Paciente é obeso? sim não

5. Paciente está sob uso de algum medicamento nos últimos dias?

não sim **Qual?** _____

6. Possui umas das seguintes doenças? Qual?

Hipertensão Doença cardíaca Diabetes Doença auto-imune
 (Lúpus, p. exemplo)
 Câncer Artrite reumatóide Outra infecto-parasitária

7. Onde mora? (cidade, estado, etc) _____

8. Possui familiares com a Doença de Chagas?



9. Como e há quanto tempo descobriu estar infectado?

10. Já fez transfusão sanguínea? sim não

Observações: _____

Outras informações relevantes: _____

Anexo C- Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com Doença de Chagas.

Número do processo: 23081.008343/2009-10

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0130.0.243.000-09

Pesquisador Responsável: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Setembro/2010- Relatório parcial
Agosto/2011- Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 01/09/2009

Santa Maria, 01 de setembro de 2009.



Edson Nunes de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.

Anexo D- Carta de Submissão do Manuscrito I

De: Daniela Bitencourt Rosa Leal (dbitencourtrosaleal@gmail.com)
Para: vicgsouza@yahoo.com.br;
Data: Domingo, 26 de Junho de 2011 15:30:12
Cc:
Assunto: Fwd: Clinical Biochemistry Submission - Manuscript Number Assigned

----- Forwarded message -----

From: **CLB (ELS)** <clbi@elsevier.com>
Date: 2011/6/26
Subject: Clinical Biochemistry Submission - Manuscript Number Assigned
To: danibr1@smail.ufsm.br

Ms. No.: CLB-D-11-00393

Title: ALTERATION OF NTPDASE AND ADA ACTIVITIES IN LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS' DISEASE

Corresponding Author: Dr. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Authors: Viviane Souza; Karine Schlemmer; Cristiano Noal; Jeandre Jaques; Carine Zimmermann; Claudio Leal; Juliana Fleck; Emerson Casali; Vera Morsch; Maria Schetinger; Daniela Bitencourt Rosa Leal, Ph.D.

Dear Dr. Leal,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: CLB-D-11-00393

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/clb/>

Your username is: danibr1

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/clb/automail_query.asp.

Thank you for submitting your work to Clinical Biochemistry.

Kind regards,

D. Jones

Administrative Support Agent [30-Mar-11]

Clinical Biochemistry

Phone: (619) 699-6218

E-mail: clbi@elsevier.com

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further

Anexo E- Comprovante de Submissão do Manuscrito II

De: Daniela Bitencourt Rosa Leal (dbitencourtrosaleal@gmail.com)

Para: vicgsouza@yahoo.com.br;

Data: Quinta-feira, 9 de Junho de 2011 17:09:18

Cc:

Assunto: Fwd: Submission Confirmation for PURINERGIC SYSTEM ECTOENZYMES PARTICIPATE IN THE THROMBOREGULATION OF PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS' DISEASE

----- Forwarded message -----

From: **Thrombosis Research** <thrombosisresearch@elsevier.com>

Date: 2011/6/9

Subject: Submission Confirmation for PURINERGIC SYSTEM ECTOENZYMES PARTICIPATE IN THE THROMBOREGULATION OF PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS' DISEASE

To: danibr1@smail.ufsm.br

Dear Dr. Leal,

Your submission entitled "PURINERGIC SYSTEM ECTOENZYMES PARTICIPATE IN THE THROMBOREGULATION OF PATIENTS WITH INDETERMINATE FORM OF CHAGAS' DISEASE" has been received by journal Thrombosis Research

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/tr/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Thrombosis Research Editorial Office

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.