



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

**ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE  
DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DA  
ADENINA EM LINFÓCITOS DE GESTANTES  
SOROPOSITIVAS PARA TOXOPLASMOSE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Tatiana Montagner Dalcin Bertoldo**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE  
DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DA  
ADENINA EM LINFÓCITOS DE GESTANTES  
SOROPOSITIVAS PARA TOXOPLASMOSE**

**Tatiana Montagner Dalcin Bertoldo**

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  
Co-orientador: Prof. (Dr) Mario Luiz de La Rue**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**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

**ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE  
DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DA  
ADENINA EM LINFÓCITOS DE GESTANTES SOROPOSITIVAS PARA  
TOXOPLASMOSE**

elaborada por  
**Tatiana Montagner Dalcin Bertoldo**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
(Presidente/Orientador)**

---

**Dr. Michel Mansur Machado (UNIPAMPA)**

---

**Dr<sup>a</sup>. Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM)**

Santa Maria, 26 junho de 2013.

*“Não se preocupe em entender.  
Viver ultrapassa todo entendimento.  
Mergulhe no que você não conhece”.*

*Clarice Lispector*

*Dedico este trabalho ao meu filho,  
Bruno, razão da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, por me acompanhar e me iluminar nestes anos de caminhada.

Aos meus familiares pelo amor, carinho e incentivo.

Ao meu marido, Alencar, obrigada por estar presente em minha vida. Ao meu filho, Bruno, que apesar da pouca idade soube compreender minhas ausências.

Agradeço, imensamente, a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos. Por acreditar e confiar em mim, principalmente por ter me dado a oportunidade de aprender mais.

Aos meus colegas e amigos do laboratório 4229, vocês são pessoas maravilhosas, adoráveis, amigas que ficarão guardadas no meu coração. Obrigada pelo carinho, pela atenção, pelo aprendizado, pela paciência e pelo apoio.

Em especial ao João Felipe que esteve comigo em todos os momentos deste trabalho, meu profundo agradecimento. À Lívia e à Karine pelo auxílio e colaboração prestados.

Aos colegas do laboratório de análises clínicas (LAC/HUSM) minha gratidão a todos que me incentivaram e torceram por mim.

Às gestantes, sem vocês este trabalho não seria realizado, muito obrigada.

Enfim, a todos que colaboraram neste estudo de alguma forma, meu sincero agradecimento.

## RESUMO

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

### ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DA ADENINA EM LINFÓCITOS DE GESTANTES SOROPOSITIVAS PARA TOXOPLASMOSE

AUTORA: TATIANA MONTAGNER DALCIN BERTOLDO  
ORIENTADORA: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL  
Data e local de Defesa: Santa Maria, 26 de Junho de 2013.

A toxoplasmose, causada pelo protozoário intracelular *Toxoplasma gondii* é uma doença infecciosa, e com isso, desencadeia a ativação do sistema imune. A gestação, por sua vez, demonstra características da resposta inflamatória sistêmica. As ectoenzimas como: E-NTPDase e E-ADA, além de possuírem importante atividade na regulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina, possuem ações extremamente importantes no sistema imunológico. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar a atividade de enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de gestantes com anticorpos para *Toxoplasma gondii*. Foram incluídas na pesquisa, gestantes com sorologia positiva (imunes) e com sorologia negativa (suscetíveis) para toxoplasmose, no último trimestre gestacional, previamente diagnosticadas no serviço pré-natal do HUSM. E também, mulheres não gestantes com sorologia positiva e com sorologia negativa para toxoplasmose, no período de março a dezembro de 2012. Foram determinadas as atividades enzimáticas das ectoenzimas: E-NTPDase e E-ADA nos linfócitos das gestantes e das não gestantes. Os dados encontrados revelaram uma alteração nas atividades das ectoenzimas do sistema purinérgico no grupo de gestantes. Os resultados demonstraram um aumento da atividade da E-NTPDase, podendo levar a uma diminuição dos níveis de nucleotídeos ATP e ADP; e um aumento na atividade da E-ADA, podendo ocasionar uma diminuição da concentração de adenosina nos grupos: III (gestantes soronegativas para toxoplasmose) e IV (gestantes soropositivas para toxoplasmose) quando comparados ao grupo controle (I: mulheres não gestantes soronegativas para toxoplasmose). As gestantes soropositivas para toxoplasmose quando comparadas com as gestantes soronegativas não apresentaram alteração, revelando assim, que a toxoplasmose na sua fase crônica, possivelmente não interfere na sinalização purinérgica. Em conclusão, o terceiro trimestre gestacional mostra-se uma condição fisiológica que envolve a sinalização purinérgica e que a toxoplasmose em sua fase crônica não parece ser capaz de alterar esta sinalização.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose. Linfócitos. Gestação. Sistema purinérgico.

## ABSTRACT

### ENZYME ACTIVITY THAT DEGRADE NUCLEOTIDE AND NUCLEOSIDE OF ADENINE IN LYMPHOCYTES OF PREGNANCY SEROPOSITIVE FOR TOXOPLASMOSIS

AUTHOR: TATIANA MONTAGNER DALCIN BERTOLDO  
ADVISOR: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL  
Place and Date: Santa Maria, June 26th, 2013.

Toxoplasmosis, caused by the intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* is an infectious disease, and this triggers the activation of the immune system. The pregnancy, in turn, shows characteristics of systemic inflammatory response. The ecto-enzymes as E-NTPDase and E- ADA activities in addition to possessing important in regulating the levels of adenine nucleotides and nucleoside, have shares extremely important in the immune system. Thus, the aim of this study was to determine the activity of enzymes that degrade adenine nucleotides and nucleoside in lymphocytes of women with antibodies to *Toxoplasma gondii*. Were included in the study, pregnant women seropositive (immune) and seronegative (susceptible) to toxoplasmosis in the last trimester of pregnancy, previously diagnosed service prenatal HUSM. Also, non-pregnant women seropositive and seronegative for toxoplasmosis, in the period from March to December 2012. We determined the enzymatic activities of ecto-enzymes: E-NTPDase and E-ADA in lymphocytes of pregnant and non-pregnant. The results showed an increase of the E-NTPDase activity and may lead to decreased levels of nucleotides ATP and ADP, and an increase in the activity of E-ADA, which may cause a decrease in the concentration of adenosine in groups: III (seronegative pregnant women toxoplasmosis) and IV (seropositive pregnant women for toxoplasmosis) when compared to the control group (I: non-pregnant women seronegative for toxoplasmosis). Pregnant women seropositive for toxoplasmosis compared with seronegative pregnant women did not change, thus revealing that toxoplasmosis in its chronic phase, may not interfere with purinergic signaling. In conclusion, the third trimester of pregnancy appears to be a physiological condition that involves purinergic signaling and toxoplasmosis in its chronic phase does not seem to be able to change this signaling.

**Keywords:** *Toxoplasmosis. Lymphocytes. Pregnancy. Purinergic system.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caminhos para infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	15
Figura 2 - Representação dos componentes do sistema purinérgico.....	21
Figura 3 - Representação da hidrólise dos nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) e nucleosídeo (adenosina) pela ação de ectoenzimas .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADP:** Adenosina difosfato

**AMP:** Adenosina monofosfato

**ATP:** Adenosina trifosfato

**E-ADA:** Ecto- adenosina desaminase

**E-NTPDase:** Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

**E-NPP:** Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

**E-5-NT:** Ecto-5'-nucleotidase

**HUSM-** Hospital Universitário de Santa Maria

**HLA-C:** Complexo de Histocompatibilidade Principal C

**HLA-G:** Complexo de Histocompatibilidade Principal G

**IL-4:** Interleucina-4

**IL-5:** Interleucina-5

**IL-6:** Interleucina-6

**IL-8:** Interleucina-8

**IL-12:** Interleucina-12

**INF- $\gamma$ :** Interferon gama

**NK:** Células natural killer

**NKu:** Células natural killer uterinas

**TNF:** Fator de necrose tumoral

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A</b> - Carta de Aprovação do Comitê de Ética .....	55
<b>Anexo B</b> - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	56
<b>Anexo C</b> - Coleta de Dados .....	59
<b>Anexo D</b> - Termo de Compromisso para Utilização de Dados (Termo de Confidencialidade) .....	61

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivo geral .....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
<b>MANUSCRITO .....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>55</b>

## **APRESENTAÇÃO**

- Esta dissertação está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução e os objetivos.
- A seguir, os resultados estão apresentados na forma de manuscrito, o qual se encontra na seção Manuscrito.
- O item conclusão está disposto após o manuscrito.
- As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem no item Introdução.

## 1 INTRODUÇÃO

No ano de 1908, o *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose, foi descrito pela primeira vez por Nicolle e Manceaux. Estes, o encontraram na Tunísia, infectando um roedor, o *Ctenodactylus gondii*. Ainda neste mesmo ano, Manceaux encontrou o mesmo protozoário no Brasil, porém em coelhos de laboratório. Em humanos o primeiro caso de infecção aconteceu no ano de 1937 (FERREIRA et al., 2003) e até o final do século XX, ainda não estavam completamente esclarecidos os mecanismos de transmissão da doença, do animal para o homem (JOBIM; SILVA, 2004).

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário que pertence à família Sarcocystidae, filo Apicomplexa, sendo um parasito obrigatório, o qual necessita do meio intracelular para sua sobrevivência e multiplicação, embora seu ciclo vital complexo inclua também fases extracelulares. Este parasito desenvolveu capacidades que permitem a sua sobrevivência sem destruir seus hospedeiros, dessa forma perpetuando a espécie. Acredita-se que seu sucesso como patógeno intracelular deva-se a adaptações morfológicas e funcionais especializadas que o tornam apto a invadir, residir e replicar-se em praticamente todos os tipos de células dos animais de sangue quente (SACKS; SHER, 2002).

Seu ciclo biológico (figura 1) apresenta três formas de desenvolvimento: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Os taquizoítos são organismos de rápida proliferação (GROSS et al., 2004). São encontrados durante a fase aguda da infecção, sendo também denominada forma proliferativa, forma livre ou trofozoíto (REY, 2002). Já os bradizoítos são organismos de proliferação lenta ou de repouso nos cistos do *Toxoplasma* e se desenvolvem durante a infecção crônica no cérebro, retinas, músculo esquelético e cardíaco e em qualquer outra parte. Os esporozoítos desenvolvem-se nos esporocistos, dentro dos oocistos que são eliminados pelas fezes dos gatos (NEVES, 2004).

No aparelho gastrointestinal dos hospedeiros definitivos, os membros da família Felidae (gatos domésticos e felinos selvagens), ocorre a reprodução sexuada do *Toxoplasma*. Através dos excrementos desses animais, o *Toxoplasma gondii* contamina o solo sob a forma de oocistos, que contêm oito esporozoítos no seu interior. O processo de esporulação, necessário para que os oocistos se tornem

contaminantes, ocorre após 1 a 21 dias no solo, onde permanecem viáveis por até 18 meses, principalmente em solos úmidos das regiões de clima temperado. Durante a infecção aguda no gato, milhões de oocistos são excretados pelas fezes durante 7 a 21 dias. A contaminação em humanos pelos oocistos pode ocorrer, com a ingestão de alimentos crus, que tiveram contato com o solo; em atividades que incluam manuseio direto da terra; no consumo ou algum tipo de contato com água contaminada; ou por contato direto com gatos infectados (DUBEY et al., 1998; SAEIJ et al., 2005).

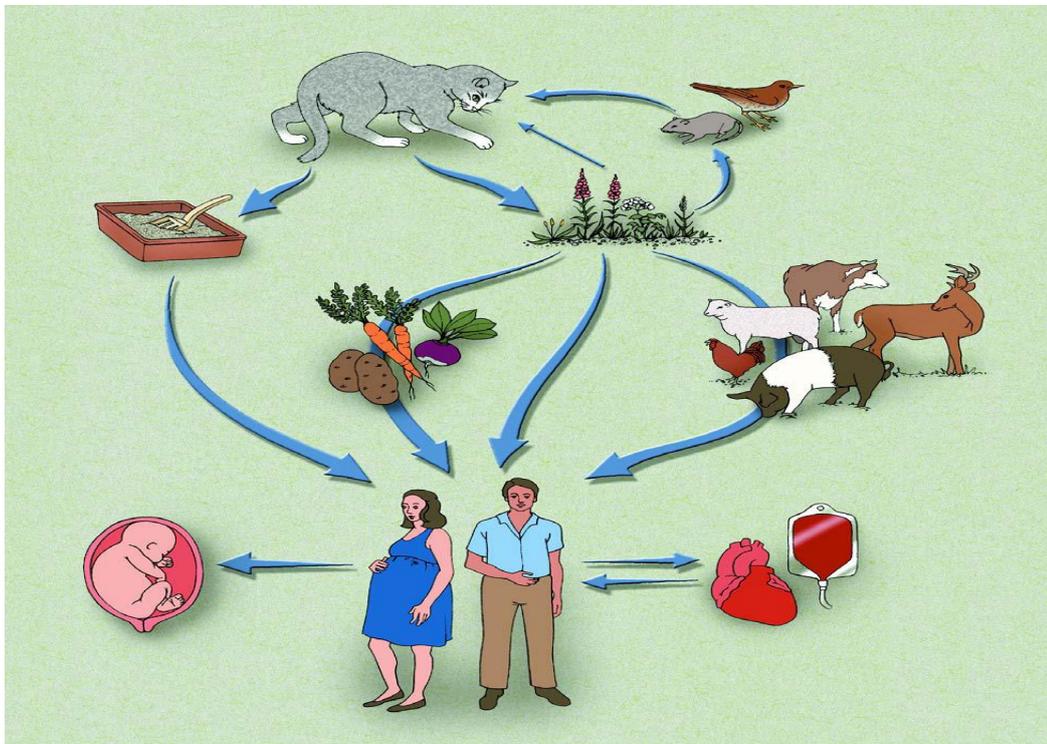


Figura 1 - Caminhos para a infecção por *Toxoplasma gondii*. O trato intestinal felino é a única fonte para a produção de oocistos do *Toxoplasma gondii*. A transmissão para os seres humanos geralmente ocorre através da ingestão de oocistos de fontes contaminadas (por exemplo, solo, cama de gato, hortaliças, água) ou a ingestão de cistos teciduais em carne mal cozida de animais infectados. Embora a infecção do feto ocorra mais frequentemente após a infecção aguda por *Toxoplasma gondii* em uma mulher grávida, pode também ocorrer depois a reativação da infecção latente em uma mulher grávida ou indivíduos imunocomprometidos (Adaptado de LYNFIELD; GUERINA, 1997).

A prevalência da toxoplasmose em gestantes varia conforme regiões geográficas, características climáticas, fatores culturais e hábitos alimentares (KAPPERUD et al., 1997). A forma adquirida da doença geralmente passa sem manifestações, embora possa causar linfadenopatia e febre baixa, em um quadro

similar à mononucleose. Em pacientes imunocompetentes, a doença progride para um estágio crônico e sem a presença de sintomas. Apesar da infecção por *Toxoplasma gondii* ser geralmente assintomática nos indivíduos imunocompetentes, apresenta quadros clínicos de alta gravidade em imunossuprimidos (transplantados, submetidos a quimioterápicos ou portadores de HIV), podendo levar à morte. Em gestantes, pode ocorrer aborto espontâneo, nascimento prematuro, morte neonatal, ou sequelas graves no feto como: retinocoroidite, calcificações cerebrais e hidrocefalia ou microcefalia, se a infecção for adquirida durante a gestação, principalmente nos primeiros dois trimestres (JOINER et al., 1993). As lesões oculares são freqüentes na toxoplasmose congênita, a qual possui uma prevalência muito alta no Brasil, de 1/3.000 nascidos vivos, quando comparada a outros países (NETO et al., 2000). O tempo de gestação no qual a mulher se encontra quando adquire a infecção pelo parasito é importante para a patogenicidade da infecção. Conforme Remington e colaboradores (2006), a incidência da infecção congênita no primeiro trimestre é pequena (4,5%) e aumenta no terceiro trimestre (75%). Para Neves (2005), na infecção congênita ou transplacentária o risco da transmissão uterina cresce de 14% no primeiro trimestre da gestação após infecção materna primária, até aproximadamente 59% no último trimestre da gestação.

A transmissão congênita ocorre quase sempre no estágio inicial da infecção, durante a fase aguda (parasitemia), porém, em casos excepcionais, pode ocorrer transmissão ao feto durante a fase crônica da infecção materna (REMINGTON et al., 2006).

A patogenia na espécie humana parece estar ligada a alguns fatores importantes, como cepa do parasito, resistência do hospedeiro e o modo pela qual o indivíduo se infecta. Entretanto, a transmissão congênita é frequentemente mais grave, e a toxoplasmose adquirida após o parto pode apresentar uma evolução variável, dependendo diretamente da virulência da cepa (NEVES, 2005).

Diversos estudos têm sido realizados em relação à resposta imune apresentada pelo organismo em resposta ao *Toxoplasma gondii*, produzindo maiores esclarecimentos a respeito desta infecção. Estudos de diversos pesquisadores principalmente com modelos animais, compilaram as principais descobertas nessa área. O principal mecanismo de resistência ao parasita é a imunidade celular, mediada pelas células T, tanto da linhagem TCD4<sup>+</sup>, quanto da TCD8<sup>+</sup> (SUBAUSTE; REMINGTON, 1993; DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

Seguindo-se à infecção oral por *Toxoplasma gondii* inicia-se uma resposta imune, inicialmente inespecífica, seguida de uma forte resposta celular Th1, além da produção de imunoglobulinas anti-Toxoplasma. Na maioria das vezes, esta resposta obriga o parasito a encistar-se em tecidos, passando para um estágio de latência ou cronicidade, no qual é vigiado pelo sistema imunológico. Relatos de pesquisas, também comprovaram o papel central, principalmente do interferon gama (INF-  $\gamma$  ), no controle das infecções por *Toxoplasma gondii* (OLLE et al., 1996; BOUT et al., 2002; HUANG; KASPER, 2004).

A infecção por este parasito está presente em elevada porcentagem na população, em geral sob forma crônica. Esta forma é evidenciada pela presença de anticorpos séricos, específicos para componentes antigênicos do toxoplasma, geralmente em títulos baixos. Os casos de toxoplasmose aguda podem ser identificados por meio de marcadores sorológicos que, na verdade, são indicadores de uma infecção recente. Um marcador clássico para essa forma se apresenta como anticorpos IgM anti-toxoplasma. Outros tem sido referidos, como anticorpos IgG de títulos altos ou em rápida elevação, o que corresponde à fase de transição. Os métodos sorológicos são os mais usados no diagnóstico da toxoplasmose. Para gestantes e mulheres em idade fértil, é de suma importância que os marcadores sorológicos diferenciem infecção latente da infecção recente. A triagem sorológica deve compreender a pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra *T. gondii* para que se possa distinguir entre os três perfis sorológicos possíveis da doença. O perfil I está presente na soroconversão recente e caracteriza-se pela presença de IgM e IgG de baixa avidéz. O perfil II ou de transição apresenta elevados níveis de IgG, com índices de avidéz crescente, e redução gradativa de IgM. Finalmente, o perfil III, característico da infecção crônica ou latente, apresenta apenas anticorpos IgG geralmente em baixos títulos e com elevada avidéz (VAZ, 2007).

Apesar da grande maioria das infecções por *T. gondii* serem assintomáticas, a identificação da toxoplasmose gestacional depende fundamentalmente de testes sorológicos realizados de forma sistemática (GALVÁN; MONDRAGÓN, 2001; MONTROYA, 2002). As respostas de imunoglobulinas específicas são observadas normalmente nas gestantes, pois ao contrário do que ocorre com os linfócitos T, há muito pouca alteração nos linfócitos B durante a gestação (WEINBERG, 1984). Os anticorpos IgG surgem geralmente após uma a duas semanas da infecção pelo *T. gondii*, atingem um pico, normalmente em quatro a oito semanas, mas há casos em

que o pico pode ser postergado até 36 semanas (JENUM; STRAY-PEDERSEN, 1998).

No Rio Grande do Sul observou-se uma prevalência de 4,8 casos de infecção aguda por *T. gondii* por 1000 mulheres atendidas em um hospital público de Porto Alegre (VARELLA et al., 2009). Outro estudo demonstrou uma prevalência sorológica para presença de anticorpos para o *T. gondii* de 70,3%, em gestantes que procuraram o ambulatório de pré-natal de alto risco do Hospital Universitário de Santa Maria (BECK et al., 2011).

Na fase aguda da infecção há intensa parasitemia e multiplicação acelerada dentro das células, por reprodução assexuada. Nesta fase o parasito é particularmente capaz em atravessar barreiras teciduais, como a barreira hematoencefálica, a hemato-retiniana e a placenta. É nesta fase que acontece a passagem transplacentária, com raras exceções sabe-se que a placenta, uma vez infectada, pode representar uma fonte potencial de infecção para o feto, mesmo após ter cessado a parasitemia materna (CARRUTHERS, 2002; BARRAGAN et al., 2003).

A toxoplasmose geralmente é benigna, sendo autolimitada, e em 90% dos casos, ela não apresenta sintomatologia ou é oligossintomática. Nos casos sintomáticos, destacam-se algumas formas de manifestação clínica da doença como a ocular, a toxoplasmose no paciente imunossuprimido e a gestacional (FRENKEL, 2005).

O processo gestacional é uma condição fisiológica, onde várias mudanças imuno-endócrinas ocorrem com o objetivo de facilitar a imunossupressão e a tolerância (PEREIRA et al., 2005).

A gestação exibe muitas características da resposta inflamatória sistêmica, em termos de leucocitose, aumento de monócitos, atividade fagocítica, ativação de complemento, ativação do sistema de coágulo, ativação de plaquetas, além disso leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina IL-6, IL-12, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ). Estas alterações representam uma resposta inflamatória estéril, provocada pela própria gravidez (MELCZER et al., 2003).

Durante o período gestacional, a implantação é o processo pelo qual o blastocisto se liga intimamente ao endométrio materno. Nesta fase, o feto semi-alogênico está em contato direto com as células uterinas; apesar disso, a rejeição fetal pelo sistema imunitário da mãe, na maioria dos casos, é evitada. Têm sido propostas diversas explicações: um efeito mecânico de barreira do trofoblasto,

supressão do sistema imunológico materno durante a gravidez, e a ausência das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade (MHC) no trofoblasto. O trofoblasto não é mais que a camada externa de células do blastocisto, que dá origem à placenta. Neste processo, o trofoblasto prolifera originando o citotrofoblasto que, após proliferação e diferenciação, dá origem a uma outra camada de células designada sinciotrofoblasto (GOLDSBY et al., 2000).

O "paradoxo imunológico da gestação" é relatado quando o desenvolvimento do feto não é afetado, embora seus antígenos sejam reconhecidos como estranhos pela mãe. Evidências suportam que o predomínio do perfil de imunidade Th2 seja o que assegura a manutenção da gestação, pois sendo o feto um tecido estranho ao organismo materno, a atividade citotóxica dos linfócitos Th1 poderia comprometer sua viabilidade. Efetivamente, foi demonstrado que na interface materno-fetal há produção de citocinas do perfil Th2 (PICCINNI et al., 2000).

As citocinas provenientes do complexo feto-placenta estão envolvidas em todas as etapas do processo de reprodução. Influenciam o desenvolvimento dos gametas, a implantação, a evolução da gestação e, finalmente, o desencadeamento e o próprio trabalho de parto (CHOUDHURK; KNAPP, 2001; PICCINNI, 2007). Compondo uma rede, as citocinas interagem entre si exercendo múltiplos efeitos que dependendo das condições podem favorecer ou prejudicar o desenvolvimento da gestação.

Wegmann e colaboradores (1993) apresentaram a primeira teoria para tentar explicar a participação das citocinas na gestação. De acordo com esta proposição, citocinas de perfil Th1 exercem efeito deletério, induzindo a reação inflamatória e a necrose placentária, podendo assim comprometer o desenvolvimento do feto e/ou placenta. Por outro lado, as citocinas Th2 são benéficas para a gestação, promovendo a proliferação e diferenciação de células trofoblásticas e a placentação, além disso, desempenham um papel protetor sobre a unidade feto-placentária inibindo a produção de citocinas do tipo Th1. De acordo com esta teoria, o sucesso gestacional está associado ao desenvolvimento preferencial de perfil Th2. A continuidade das investigações mostrou que esta proposição é muito restrita, e assim está sendo progressivamente reformulada (CHAOUAT, 2007).

A progesterona promove a produção de IL-4 e IL-5, sendo essencial para a implantação do embrião, exercendo também um papel na inibição da atividade das células NK, que na gestação normal encontram-se diminuídas na circulação

periférica, embora concentradas no local onde o trofoblasto fetal invade a decídua. A dinâmica das células Natural Killers uterinas (NKu) sugere que elas controlam a invasão placentária, mas sua regulação pela progesterona e pelas citocinas do perfil Th2 impede seu potencial efeito abortivo (SZEKERES et al., 2001; SZEKERES, 2002).

A interação entre as moléculas HLA-C expressas pelas células trofoblásticas e as células NKu, presentes na decídua, representam um mecanismo de proteção do trofoblasto contra os efeitos exercidos por mediadores citotóxicos liberados por células NK. De modo similar, as moléculas HLA-G atuam no sentido de proteger as células trofoblásticas contra a agressão pelo sistema imunológico materno (TABIASCO et al., 2006). A maioria dos linfócitos T que se encontram na decídua se localizam nos grandes grupamentos de células linfóides (LCC), próximos às glândulas endometriais. O número de linfócitos T e as proporções de subpopulações de células T em sangue periférico se modificam durante a gravidez, diminuindo desde o primeiro trimestre progressivamente até o termo, voltando aos níveis normais no puerpério (ALUVIHARE; BETZ, 2006).

Diante do exposto, sabe-se que o sistema imune está diretamente envolvido com o processo gestacional e em diversos processos inflamatórios. Entre os mediadores que sinalizam as respostas a diversas condições fisiológicas ou patológicas está o sistema purinérgico. As sinalizações purinérgicas desempenham um importante papel na modulação da resposta imune através de biomoléculas extracelulares, como os nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídeo adenosina (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003).

Esta sinalização (Figura 2) envolve três principais componentes entre eles, os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina; os receptores purinérgicos através dos quais eles exercem seus efeitos e as ectoenzimas que são responsáveis pelo controle dos níveis destas moléculas no meio extracelular (ATKINSON et al., 2006).

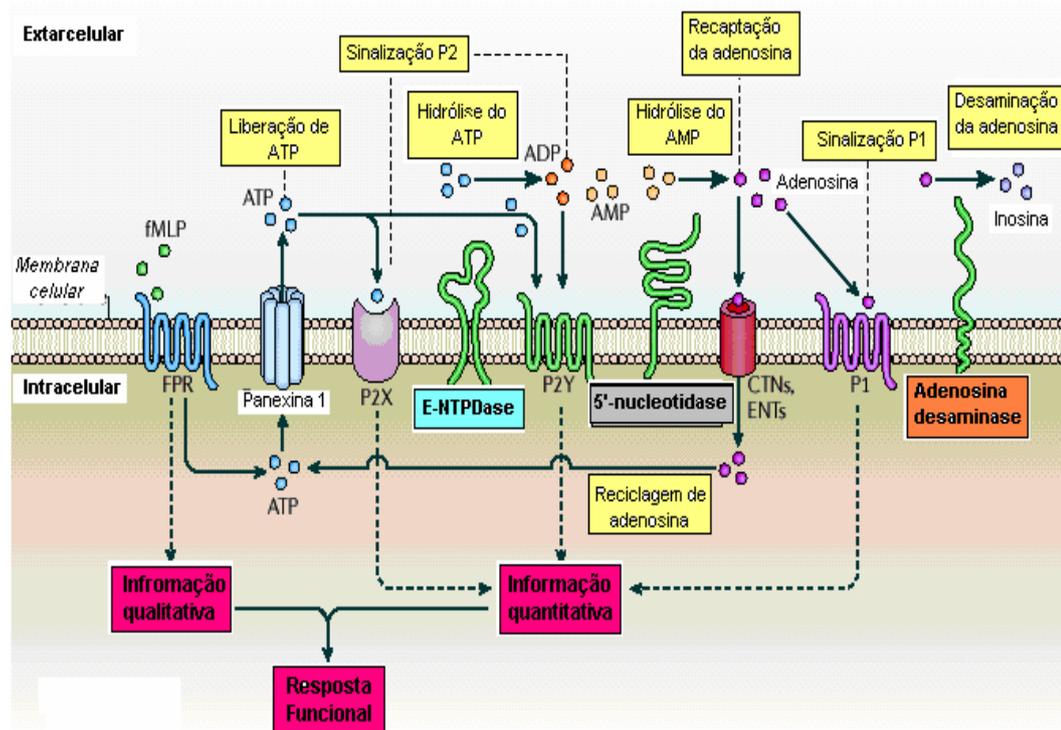


Figura 2 - Representação dos componentes do sistema purinérgico (Adaptado de JUNGER, 2011).

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. Os principais nucleotídeos que exercem funções biológicas são: o ATP, o ADP e o AMP (ATKINSON et al., 2006).

Altas 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 linfócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas, servem como mediadores capazes de modular o processo de inflamação e trombose vascular. O ATP, em baixas concentrações é considerado uma molécula com atividade anti-inflamatória, e em elevadas concentrações desenvolve respostas pró-inflamatórias, exercendo papel essencial nas funções desempenhadas por linfócitos, sendo necessário para a secreção de importantes citocinas das células T, como interferon- $\gamma$  e interleucina-2 (IL-2) que estão envolvidas na indução de resposta imune a antígenos estranhos, além de apresentar outros efeitos em muitos processos biológicos, como contração

do músculo liso, neurotransmissão, inflamação e dor (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; SITKOVSKY, 1998; SNEDDON et al., 1999; DING et al., 2000).

O ATP em elevadas concentrações pode atuar como uma potente molécula citotóxica, capaz de levar à morte diferentes classes de células, pela formação de grandes poros na membrana plasmática, com exceção daquelas que possuem alto poder de quebra do ATP em sua superfície (FILIPPINI et al., 1990).

O ADP no meio extracelular atua como mediador primário da ativação plaquetária, contribuindo para homeostasia e formação de trombos, através do seu efeito agregatório após danos teciduais. 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 (ELLY; BERNE, 1992; SOSLAU; YOUNGPRAPAKORN, 1997; BOROWIEC et al., 2006).

Após serem liberados no meio extracelular, os nucleotídeos interagem com receptores purinérgicos específicos, mediando eventos de resposta imune, de inflamação, de agregação plaquetária (BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2007). Esses receptores são divididos em duas subfamílias, aqueles acoplados à proteína G (P2Y) e aqueles ligados a canais iônicos (P2X), sendo que, em mamíferos, já foram identificados oito tipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) e sete tipos de receptores P2X (P2X1 – P2X7) (BURNSTOCK, 2006). A sinalização purinérgica é concluída, então, pela ação de ectoenzimas que hidrolisam os nucleotídeos até os seus respectivos nucleosídeos, no meio extracelular (ZIMMERMANN, 1994).

Com isso, sabe-se que as moléculas de nucleotídeos após desempenhar suas funções orgânicas, devem ser degradadas de modo a manter seus níveis extracelulares em concentrações fisiológicas. Para isto, existe este sistema responsável pelo controle dos seus níveis extracelulares, exercido por enzimas ancoradas na membrana plasmática das células, como plaquetas, linfócitos e células endoteliais ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel. As ectoenzimas que hidrolisam nucleotídeos são conhecidas como ectonucleotidases e podem ser classificadas como família das E-NTPDases (EC 3.6.1.5; nucleosídeo trifostato 5'-difosfohidrolase, CD39 ou apirase), família das E-NPPs (nucleosídeo pirofosfato/fosfodiesterase), fosfatases alcalinas e 5'-nucleotidase (5'-NT; EC 3.1.3.5, CD73)) sendo amplamente distribuídas nos tecidos (ZIMMERMANN, 2000).

O conjunto de ação destas enzimas, formam uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP, formando AMP. A seguir a enzima E-5'-nucleotidase hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001). Ainda, seguindo a seqüência de degradação dos nucleotídeos, existe a enzima ecto-adenosina deaminase (E-ADA), a qual regula as concentrações de adenosina, através da conversão e formação de inosina (ZIMMERMANN, 2000; BOURS et al., 2006).

A E-NTPDase inicia a cascata de hidrólise de nucleotídeos da adenina (Figura 3), sendo conhecida como um marcador de superfície celular (CD39). Está presente em linfócitos, plaquetas e células do endotélio vascular, desempenhando importante controle da função dos linfócitos, incluindo o reconhecimento do antígeno e ativação de funções efetoras das células T citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990), além da capacidade de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (MALISZEWSKI et al., 1994; KACSMAREK et al., 1996).

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

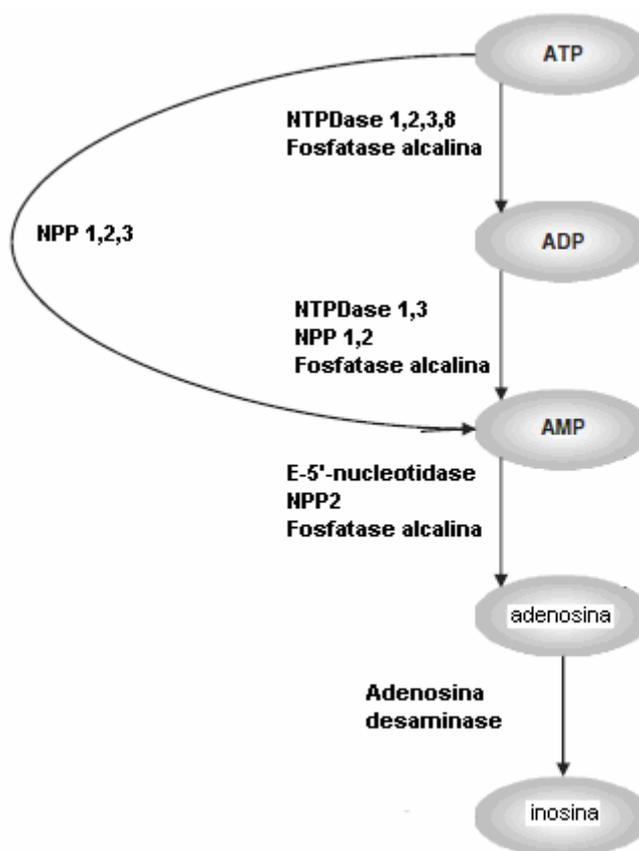


Figura 3 - Representação da hidrólise de nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) e nucleosídeo adenosina pela ação de ecto-enzimas (Adaptado de BOURS et al., 2006).

Por sua vez, a E-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) é responsável pela hidrólise de AMP formando adenosina (ZIMMERMANN, 2001; COLGAN et al., 2006). Além dessas, existe a E-ADA (EC 3.5.4.4, adenosina desaminase), que também pode estar localizada na superfície da membrana celular, como uma ectoenzima (YEGUTKIN, 2008), importante na diferenciação e proliferação de linfócitos, sendo usada para monitorar várias patologias imunológicas (POURSHARIFI et al., 2008).

A enzima adenosina desaminase (ADA; EC 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.

Regular a concentração da adenosina extracelular, foi uma das primeiras funções fisiológicas atribuídas à E-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 ectonucleotidases. 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 (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004).

Além de possuírem importante atividade na regulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos da adenina, as ectoenzimas possuem ações extremamente importantes no sistema imunológico (SALAZAR-GONZALEZ et al., 1985; BENREZZAK et al., 1999). Enzimas do sistema purinérgico, como a E-NTPDase e a E-ADA, estão presentes na membrana dos linfócitos desempenhando um importante papel na resposta inflamatória.

Considerando que a gestação é caracterizada por alterações imunológicas e que a toxoplasmose pode ser um agravante no sistema imune da gestante, é de interesse clínico investigar a ação das ectoenzimas do sistema purinérgico em linfócitos de gestantes soropositivas para toxoplasmose.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar a atividade das enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de gestantes soropositivas para toxoplasmose.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar a atividade da E-NTPDase em linfócitos de gestantes soropositivas para toxoplasmose;
- Verificar a atividade da E-ADA em linfócitos de gestantes soropositivas para toxoplasmose.

## MANUSCRITO

### **E-NTPDase AND E-ADA ACTIVITIES IN LYMPHOCYTES FROM PREGNANT WOMEN SEROPOSITIVE FOR TOXOPLASMOSIS**

Tatiana Montagner Dalcin Bertoldo<sup>a</sup>; João Felipe Peres Rezer<sup>a</sup>; Jeandre Augusto dos Santos Jaques<sup>a</sup>; Lívia Gelain Castilhos<sup>a</sup>; Jader Betsch Ruchel<sup>a</sup>; Claudia de Mello Bertonchelli<sup>a</sup>; Cristiano Bicca Noal<sup>a</sup>; Mario Luiz de La Rue<sup>a</sup>; Daniela Bitencourt Rosa Leal<sup>a</sup>.

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

*\* Corresponding author:*

*Daniela Bitencourt Rosa Leal*

*Fax: + 55-553220-8242*

*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: [daniela.leal@ufsm.br](mailto:daniela.leal@ufsm.br)*

**ABSTRACT:** The aim of this study was to investigate the activities of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5, CD39) and adenosine deaminase (E-ADA, EC 3.5.4.4) in lymphocytes of pregnant women seropositives for toxoplasmosis. The study analyzed pregnant and non-pregnant with no reagent and reagent serological for toxoplasmosis, according to laboratory criteria. The control groups were composed of forty five non-pregnant: no reagent serological (n=30) and reagent serological for toxoplasmosis (n=15). The pregnant groups were composed of eighty women in the third trimester gestational :no reagent serological (n=30) and reagent serological for toxoplasmosis (n=50). Peripheral blood lymphocytes were isolated, and activity of E-NTPDase and E-ADA were analyzed. The results showed an increase of 87.6% and 35.6% in E-NTPDase activity (ATP and ADP as substrate, respectively) in pregnant seronegative for toxoplasmosis group (III) when compared to the control group (I). An increase was also observed in E-ADA activity in pregnant (57.5% in pregnant seronegative for toxoplasmosis group and 66.9% in pregnant seropositive for toxoplasmosis group). This study demonstrated that ectoenzymes of purinergic signaling were not altered in the chronic phase of toxoplasmosis, but enzymatic modification occurred due to the gestational process.

**Key words:** *Lymphocytes. E-NTPDase. E-ADA. Pregnancy. Toxoplasmosis.*

## 1 INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a zoonotic disease whose etiological agent is *Toxoplasma gondii*. This parasite is in its life cycle two hosts, the cat as definitive and man or other mammals as intermediaries. Among the various modes of transmission of this parasite, we highlight the ingestion of oocysts found in soil, water and food, tissue cysts found in raw meats and undercooked, and via the placenta (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007).

The reactivation can occur, because once infected host becomes the bearer of intracellular cysts, kept under control by cellular immunoinflammatory mechanisms (NEVES, 2003). The pregnancy, although a healthy physiological state for most women, requires a complex integration and coordination of many biological processes, including metabolic, endocrine, immune and vascular (VAZ, 2007).

King et al. (2000) report that in a normal pregnancy, trophoblast cells are resistant to lysis by cytotoxic T lymphocytes, direct cytotoxicity by NK cells and antibody-dependent cytotoxicity. In this context, cytokines play a complex role, acting directly on the modulation of the immune response.

It is known that the immune system is involved directly with the gestational process and other inflammatory processes. Among the mediators signaling responses to various physiological or pathological conditions is involved purinergic system. The signals purinergics play an important role in modulating the immune response towards the extracellular biomolecules such as adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their nucleoside derivative, adenosine (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003).

Adenine nucleotides are extracellular signaling molecules which play an important role in regulating the immune response (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004) adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their derived from nucleoside adenosine are important molecules mediation of many biological and pathological events (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003). These molecules are controlled dynamically during inflammation a group of membrane-bound enzymes expressed in immune cells (BOURS et al., 2006). The ecto-enzyme nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5, CD39) catalyzes sequential hydrolysis of ATP nucleotides to ADP and AMP, ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) catalyzes hydrolysis of AMP to adenosine, (ZIMMERMANN, 2001) and ecto-

adenosine deaminase (ADA-E, EC 3.5.4.4) catalyzes the irreversible deamination of adenosine and deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine, respectively (FRANCO et al., 1997). Considering that pregnancy and toxoplasmosis may be characterized by a systemic inflammatory response and involvement modulation of purinergic system in these events, the aim of this study was to investigate the E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes from pregnant women seropositive for toxoplasmosis to get a better understanding of their immune status.

## **2 PARTICIPANTS AND METHODS**

### **2.1 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). All the other chemicals used in this experiment were of analytical grade and of the highest purity.

### **2.2 Participants**

The study consisted of non-pregnant women and pregnant, both healthy, according with hematological parameters. Complete hemogram was performed in the blood samples collected in tubes 7,2 mg dipotassium EDTA anticoagulant (Sysmex XT 2100D, Roche Diagnostic, USA). Participants showed a hemogram in accordance with references values (FAILACE, 2003) shown in Table 1. Thirty non-pregnant women seronegative for toxoplasmosis and fifteen non-pregnant women seropositive for toxoplasmosis ( $25 \pm 3.5$  years, both) as the control group. The group of thirty pregnant women seronegative for toxoplasmosis and fifty pregnant women seropositive for toxoplasmosis ( $29 \pm 2.8$  years, both) in the third trimester of pregnancy, were carefully selected by the Federal University of Santa Maria Hospital. The highest number of pregnant women were found in the last trimester of pregnancy, since they are forwarded by the obstetrician attending the clinic for the

University Hospital. Pregnant women receive this assistance during pregnancy until delivery. From each participant were collected about 10 milliliters of peripheral blood with and without anticoagulant.

The serological method used was a chemiluminescent microparticle immunoassay-Abbott Diagnostics Architect plus- for the qualitative detection of IgG and IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. IgG was considered reagent when the concentration was greater than or equal to 8.0 UI / mL and no reagent when the concentration is less than or equal to 3.99 UI / mL. IgM was considered reagent when the index was greater than or equal to 1.20 and no reagent when the concentration is less than 0.8. Intermediate values for IgG were considered inconclusive when concentration was greater or equal to 4.0 to less than 7.99 UI/mL. Intermediate values for IgM were considered inconclusive when the index was between 0.80 to 1.20. Non-pregnant women and pregnant, both were considered seropositive for toxoplasmosis when presented IgG assay reagent followed by IgM no reagent. when participants presented results no reagent for IgG and IgM antibodies, they were considered susceptible to infection (seronegative). No cases were found for IgM reagent in the groups of the pregnant and non- pregnant.

All selected participants were not subjected to any pharmacological treatment during the past 30 days and some women with autoimmune disease or immunodeficiency and with hypertension and high cholesterol were excluded from this study. All participants signed a term of declared consent to participate in the study. The Human Ethics Committee of the Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria approved the project under CAAE 0380.0.243.000-11.

### **2.3 Isolation of lymphocytes from human blood**

Lymphocyte-rich mononuclear cells were isolated from blood collected with EDTA as anticoagulant and separated on Ficoll–Histopaque density (BÖYUM, 1968) as previously described. The percentage of lymphocytes was higher than 93% as previously described (JAQUES et al., 2011). 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.

## **2.4 E-NTPDase activity determination**

After lymphocytes isolation, E-NTPDase activity was determined as previously described, (LEAL et al., 2005) in which the reaction medium contained 0.5 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 120mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 60mmol/l glucose and 50mmol/l Tris- HCl buffer at pH 8.0, with a final volume of 200  $\mu\text{l}$ . Twenty microlitres of the intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction medium (2–4  $\mu\text{g}$  of protein) and pre-incubated for 10 min at 37° C, and incubation proceeded for 70 min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mmol/l and stopped with 200  $\mu\text{l}$  of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by a method previously described (CHAN et al., 1986) using malachite green as colorimetric reagent and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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 the specific activity is reported as nmol of Pi released min/mg/ protein.

## **2.5 E-ADA activity determination**

E-ADA was determined as previously described (GIUSTI; GALANTI, 1984). Briefly, 25  $\mu\text{l}$  of lymphocytes reacted with 21mmol/l of adenosine pH 6.5 and was incubated at 37°C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when E-ADA acts in excess of adenosine. The protein content used for the platelet experiment was adjusted to 0.7–0.9 mg/ml. Results were expressed in units per milligram of protein (U/mg/protein). One unit (1/U) of E-ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1mmol/l ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

## **2.6 Protein determination**

Protein was measured by Coomassie blue method (BRADFORD,1976) using serum albumin as standard.

## 2.7 Statistical analysis

Data were analyzed by a one way ANOVA. Post hoc analyses were carried out by the Kruskal- Wallis Test and Post-Hoc Dunn's. A probability of  $P<0.05$  was considered significant. All data are expressed as mean  $\pm$  Standard error of the mean (SEM).

## 3 RESULTS

### 3.1 E-NTPDase activity determination

Figure 1 shows the comparison between non-pregnant and pregnant, as well as their respective groups with positive serology and negative serology for toxoplasmosis on ATP and ADP hydrolysis by E-NTPDase in lymphocytes. Results of lymphocytes E-NTPDase activity with ATP as substrate are shown in Figure 1A. As can be observed, the hydrolysis of ATP was altered in pregnant seronegative for toxoplasmosis (III) (57.8 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=4.53; n=30;  $P<0.001$ ) and in pregnant seropositive for toxoplasmosis (IV) (57.0 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=4.3; n=50;  $P<0.001$ ) when compared to control group (I): non-pregnant seronegative for toxoplasmosis (30.8 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=1.57; n=30), demonstrating that ATP hydrolysis was increased in 87.6% in pregnant seronegative for toxoplasmosis group (III) and in 85.1% in pregnant seropositive for toxoplasmosis group (IV) when compared to the control group (I) .

In addition, results obtained for the lymphocytes E-NTPDase activity with ADP as substrate are shown in figure 1B. Where the ADP hydrolysis was also increased in 35.6% in pregnant seronegative for toxoplasmosis group (III) (56.4 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=4.0; n=30;  $P<0.05$ ) and in 35.2% in pregnant seropositive for toxoplasmosis group (IV) (56.1 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=3.6; n=50;

$P < 0.05$ ) when compared to the control group (I): non-pregnant seronegative for toxoplasmosis (41.5 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=2.0; n=30).

### **3.2 Adenosine deaminase activity determination (E-ADA)**

Results obtained for adenosine hydrolysis by E-ADA are shown in Figure 2. As can be seen, adenosine hydrolysis was altered in pregnant seronegative for toxoplasmosis group (III) (47.1 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=4.5; n=30;  $P < 0.05$ ) and in pregnant seropositive for toxoplasmosis group (IV) (49.9 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=3.9; n=50;  $P < 0.01$ ) when compared to the control group (I): non-pregnant seronegative for toxoplasmosis (29.9 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=2.3; n=30). These alteration was 57.5% in pregnant seronegative for toxoplasmosis group (III) and 66.9% in pregnant seropositive for toxoplasmosis group (IV).

## **4 DISCUSSION**

*Toxoplasma gondii* infection is usually asymptomatic in immunocompetent individuals, but in immunocompromised patients usually present high severity, and may even lead to death. In pregnant women can cause miscarriage, premature birth, neonatal death or severe sequelae in the fetus (JOINER; DUBREMETZ, 1993). Congenital transmission occurs almost always in the early stage of infection in the acute phase, however, in rare cases, can occur transmission to the fetus during the chronic phase of maternal infection (GARCIA, 1968; REMINGTON et al., 2006).

Gestational process is a physiologic condition where several immun-endocrine changes take place with the aim of facilitating immunosuppression and tolerance (PEREIRA et al., 2005). In normal human pregnancy there is a relative suppression of Th1 type cytokines in response to lymphocytes, leading to a Th2 type response in the maternal-fetal interface (WEGMAMN et al., 1993; PICINNI et al., 1998; SAITO, 2000).

The inflammatory process is necessary for successful implantation, but excessive inflammation can cause loss of the embryo (ZENCLUSSEN et al., 2005). The predominance of Th1 immunity is observed in abortion, but the predominance of

Th2 immunity is also reported in recurring loss (BATES et al., 2002; CHAOUAT et al., 2003). Therefore, adequate balance for Th1/Th2 immunity, may be set to the maintenance of pregnancy (RAGHUPATHY, 1997). Th1 subset of CD4<sup>+</sup> lymphocytes produce pro-inflammatory cytokines (IL-1,IL-2,IL-8, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ), which are important for promoting the expansion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which recognize and destroy infected cells. While Th2 subset of CD4<sup>+</sup> lymphocytes, produce anti-inflammatory cytokines such as: IL-4,IL-5,IL-6,IL-10 (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996).

In the immune system, the ATP at low concentrations, is important to maintain immune functions, but can become toxic at higher concentrations (FILIPPINI et al., 1990). The ATP released into the extracellular environment at high concentrations activates the purinergic receptors P2X (ligand-gated ion channel) pro-inflammatory and contributes to tissue injury and inflammation (DI VIRGILIO, 1995). The extracellular ATP at low concentration, possesses affinity for P2y receptor (G protein coupled receptors) subtype on the surfaces of lymphocytes, this purinergic receptor stimulate the Th2 immune response, leading to the production of anti-inflammatory cytokines (BOURS et al., 2006). The extracellular ATP is related to one of its degradations products, the nucleoside adenosine (SITKOVSKY, 2003). The ectoenzymes, E-NTPDase and E-ADA, control the extracellular concentration of ATP and adenosine (BOURS et al., 2006). The immunosuppressive actions of adenosine are triggered by activation of four receptor subtypes: A1, A2A, A2B and A3. These receptors are transmembrane glycoproteins coupled to protein G (MERIGHI et al., 2003).

The purinergic signaling system is a key component of the immunoregulatory environment (DI VIRGILIO, 2006) and during pregnancy may occur several changes, especially immuno-endocrine. Therefore, we evaluated the activities of the enzymes E-NTPDase and E-ADA in lymphocytes of pregnant women seropositive for toxoplasmosis during the third trimester of pregnancy. It was observed increased activity of E-NTPDase and E-ADA in groups of pregnant women seronegative and seropositive for toxoplasmosis, in the third trimester gestational when compared with the control group. The control group consists of non-pregnant women seronegative for toxoplasmosis. Corroborating our results, several studies have reported changes in these ectoenzymes such as in some autoimmune diseases (SPANEVERELLO et al.,

2010), parasitological diseases (SOUZA et al., 2012; TONIN et al., 2012) and diabetes (SCHMATZ et al., 2009).

Our data showed that there is an increase activity of the E-NTPDase, which plays an important role in the inflammatory response. Similar increases were found in platelets NTPDase activity in pregnant without complications between the 35<sup>th</sup> and 40<sup>th</sup> gestational week (LEAL et al., 2007). This increase of the enzyme E-NTPDase suggests the hydrolysis increased of nucleotides ATP and ADP, that could lead decreases the levels these nucleotides (ATP and ADP). The ATP at low concentrations is considered molecule with activity anti-inflammatory, showing a Th2 immune response present in the third trimester of pregnancy, possibly to maintain the fetus until there survival conditions outside the uterine cavity.

Moreover, the increase of E-NTPDase suggests a decrease of levels of ATP and ADP, generating a large amount of adenosine, which is converted to inosine by E-ADA. As large amounts of ATP are released from injured cells, the rapid hydrolyses of ATP and ADP (by E-NTPDase and E-NPP) and AMP (by 5'-nucleotidase) favors the production of adenosine, which possesses anti-inflammatory and analgesic properties (FREDHOLM et al., 1994).

This study also demonstrated high activity of the E-ADA, which could lead to reduced levels of extracellular adenosine. This situation may be related with the preparation of the maternal organism for parturition, since labor is involved with pro-inflammatory interleukins: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 (GARGANO, 2008). The T cells have the ability to control the chronic phase of toxoplasmosis, minimizing damage to the host due to their production of cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012). Thus, inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  besides being involved in the end of the third trimester gestational also are necessary for immunity to *T. gondii*. The IFN- $\gamma$  is the major mediator of resistance to *T. gondii* and promotes multiple intracellular mechanisms to kill the parasite and inhibit its replication (NATHAN et al., 1983). In addition, members of the TNF family, such as, CD40L, TNF- $\alpha$  and LT- $\alpha$ , are also required for protection during the chronic stage of infection (REICHMANN et al., 2000; SCHLUTER et al., 2003). Thus, through the reports mentioned suggest that the increased activity of E-ADA, which may lead to decreased levels of adenosine can be related maternal preparation for labor, since there was no change in the groups with toxoplasmosis in its chronic phase.

Furthermore, the toxoplasmosis in its chronic phase involves the activation of cytokines, which can contribute to immunity during the chronic stage of infection, keeping the resistance mechanisms of the host. The infection caused by *T. gondii* in its chronic phase resulted in no change in the activity of ectoenzymes the purinergic system in lymphocytes from pregnant women and from non-pregnant women, consequently, the extracellular concentrations of nucleotides and nucleoside were not altered. More studies should be added to this to obtain a better understanding of the level of purinergic receptors and its influence on physiological and pathological pregnancy process involving toxoplasmosis.

In conclusion, this study showed that the toxoplasmosis in its chronic phase does not alter the purinergic signaling system and the activity of ectoenzymes, E-NTPDase and E-ADA, are increased during third trimester of pregnancy, demonstrating that the purinergic system can be involved in the maintenance of this physiological process.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE and PIVIC/UFSM), Brazil.

## REFERENCES

- 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.
- BATES, M. D. et al. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? **Hum. Reprod.**, v. 17, p. 2439-2444, 2002.
- BOURS, M. J. et al. Adenosine 50-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v. 112, p. 358-404, 2006.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.**, v. 97, p. 77-89, 1968.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int. Rev. Cytol.**, v. 240, p. 31-304, 2004.
- CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> - stimulated ATPase activity. **Anal Biochem.**, v. 157, p. 375-80, 1986.
- CHAOUAT, G. et al. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway single therapy concept. **Am J. Reprod. Immunol.**, v. 50, p. 177-186, 2003.
- DI VIRGILIO, F. The P2Z purinoreceptor: An intriguing role in immunity, inflammation and cell death. **Immunology Today**, v. 16, p. 524-528, 1995.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 205-209, 2006.

DUPONT C.D.; CHRISTIAN A.D.; HUNTER A. C. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin. Immunopathol.**, v. 34, p.793–813, 2012.

FAILACE, R. **Hemograma**: Manual de Interpretação. Porto Alegre: Artmed, 2003.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. et al. Frequência das infecções pelo HIV-1, rubéola, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes simplex, hepaite B, hepatite C, doença de chagas, e HTLV I/II em gestantes, do estado do Mato grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 181-187, 2007.

FILIPPINI, A. et al. 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.

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

FREDHOLM, B. B. et al. Nomenclature and classification of purinoreceptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, n. 46, p. 143-152, 1994.

GARCIA, A. G. P. Congenital toxoplasmosis in two successive sibs. **Arch. Dis. Child.** v. 43, n. 705-10, 1968.

GARGANO, J. W. et al. Mid-pregnancy circulating cytokine levels, histologic chorioamnionitis and spontaneous preterm birth. **J. Reprod. Immunol.**, n. 79, p. 100-110, 2008.

GIUSTI, G.; GALANTI B. Colorimetric Method. In: Bergmeyer HU, editor. Methods of enzymatic analysis. **Verlag Chemie**: Weinheim, p. 315-323, 1984.

JAQUES, J. A. S. et al. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of NTPDase activity. **Analytical Biochemistry** (Print), v. 410, p. 34-39, 2011.

JOINER, K. A.; DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. **Infect. Immun.**1993;61:1169-72.

KING, A. et al. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors – a review. **Placenta**, v. 21(suppl A), p. S81-S85, 2000.

LEAL, D. et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1746, p.129-34, 2005.

LEAL, C. A. M. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis. **Mol. Cell. Biochemin.**, v.304, p. 325-330, 2007.

MERIGHI, S. et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 100, p. 31-48, 2003.

NATHAN, C. F. et al. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, v.158, n.3, p. 670–689, 1983.

NEVES, D. P. **Parasitologia dinâmica**: São Paulo. Ed: Ateneu, 2003.

PEREIRA, C. A. et al. Immunity in the normal pregnancy and in the patient with systemic lupus erythematosus (SLE). **Rev. Bras. Reumatol**, São Paulo, v. 45, n. 3, may/june, 2005.

PICCINNI, M. P. et al. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T- helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. **Nat. Med.**, v. 4, p. 1020-1024, 1998.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunol. Today**, v. 18, p. 478-482, 1997.

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

REICHMANN, G. et al. The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. **Infect. Immun.**, v. 68, n.3, p.1312–1318, 2000.

REMINGTON, J. S. et al. Toxolasmosis. In: REMINGTON, J.; KLEIN, J.; WILSON C. B. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, 6. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, p.947-1091, 2006.

SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **J. Reprod. Immunol.** v. 47, p. 87-103, 2000.

SCHLUTER, D. et al. Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. **J. Immunol.**, v. 170, n. 12, p. 6172-6182, 2003.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 84, p. 345-350, 2009.

SITKOVSKY, M. V. Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 493-501, 2003.

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

SPANLEVELLO, R. M. et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. **J. Neurol.**, v. 257, p. 24-30, 2010.

TONIN, A. A. et al. Activities of the enzymes NTPDase, 5'-Nucleotidase and Adenosine Deaminase in platelets of rats experimentally infected with *Leptospira interrogans* Serovar icterohaemorrhagiae. **Acta Scientiae Veterinariae** (Online), v. 40, p. 1078, 2012.

VAZ, A. J. **Imunoensaios: Fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro. Ed: Guanabara koogan, 2007.

WEGMANN, T. G. et al. Birectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunol. Today**, v. 14, p. 353-356, 1993.

ZENCLUSSEN, A. C. et al. Abnormal Tcell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T

regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. **Am J. Pathol.**, v. 166, p. 811-822, 2005.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44–5, 2001.

**Table 1** - Hematological determination in women pregnant: pregnant seronegatives toxoplasmosis, pregnant seropositives and non pregnant seronegatives toxoplasmosis, seropositives toxoplasmosis<sup>a</sup>

<i>Item<sup>b</sup></i>	<i>Non- pregnant seronegative toxoplasmosis (n=30)</i>	<i>Non- pregnant seropositive toxoplasmosis (n=15)</i>	<i>Pregnant seronegative toxoplasmosis (n=30)</i>	<i>Pregnant seropositive Toxoplasmosis (n=50)</i>	<i>Reference range (Women)<sup>c</sup></i>
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	4.36 $\pm$ 0.06	4.28 $\pm$ 0.05	3.81 $\pm$ 0.12	3.70 $\pm$ 0.12	4.70 $\pm$ 0.70
Hemoglobin (g/dL)	13.28 $\pm$ 0.18	13.16 $\pm$ 0.14	11.20 $\pm$ 0.31	11.03 $\pm$ 0.32	13.60 $\pm$ 2.00
HCT (%)	39.48 $\pm$ 0.59	39.12 $\pm$ 0.32	33.01 $\pm$ 0.92	33.85 $\pm$ 0.97	42.00 $\pm$ 6.00
MCV (pg)	90.60 $\pm$ 1.15	89.86 $\pm$ 0.59	88.33 $\pm$ 1.24	87.78 $\pm$ 0.91	89.00 $\pm$ 9.00
MCHC (g/dL)	33.63 $\pm$ 0.13	33.26 $\pm$ 0.15	33.10 $\pm$ 0.25	32.61 $\pm$ 0.28	31-36
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	7.047 $\pm$ 0.49	7.367 $\pm$ 0.46	10.17 $\pm$ 0.43	10.15 $\pm$ 0.33	3.60 - 11.00
Lymphocytes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	2.45 $\pm$ 0.15	2.48 $\pm$ 0.26	1.72 $\pm$ 0.13	1.66 $\pm$ 0.19	1.00 - 4.50
Neutrophils ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	3.85 $\pm$ 0.12	4.13 $\pm$ 0.31	6.69 $\pm$ 0.21	6.87 $\pm$ 0.17	1.50 - 7.00
Monocytes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.53 $\pm$ 0.05	0.54 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.08	0.79 $\pm$ 0.08	0.10- 1.00
Eosinophils ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.12 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0 - 0.50
Basophils ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.03	0.016 $\pm$ 0.00	0.020 $\pm$ 0.01	0-0.20
Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	237.5 $\pm$ 9.55	253.1 $\pm$ 5.36	225.6 $\pm$ 11.0	222.6 $\pm$ 8.0	140 - 360

<sup>a</sup> Results are presents as means  $\pm$  SEM;

<sup>b</sup> RBC, red blood cells; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; CHCM, mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC, white blood cells.

<sup>c</sup> Take from Failace (2003) to according with age and sex.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1A e 1B** - E-NTPDase activity in lymphocytes obtained from non-pregnant seronegatives for toxoplasmosis (I), non-pregnant seropositives for toxoplasmosis (II), pregnant seronegatives for toxoplasmosis (III) and pregnant seropositives for toxoplasmosis (IV), using ATP (**1A**) and ADP (**1B**) as substrates. Data represent the mean value  $\pm$  standard error. Bars represent mean S.E.M. (a,b) Indicates a significant  $P < 0.05$ , one way ANOVA by Kruskal- Wallis test and Post-Hoc Dunn's. Different letters represent statistical difference between the groups. Same letter do not differ statistically.

**Figure 2** - E-ADA activity in lymphocytes obtained from non-pregnant seronegatives for toxoplasmosis (I), non-pregnant seropositives for toxoplasmosis (II), pregnant seronegatives for toxoplasmosis (III) and pregnant seropositives for toxoplasmosis (IV), using adenosine as substrate. Data represent the mean value  $\pm$  standard error. Bars represent mean S.E.M. (a,b) Indicates a significant  $P < 0.05$ , one way ANOVA by Kruskal- Wallis test and Post-Hoc Dunn's. Different letters represent statistical difference between the groups. Same letter do not differ statistically.

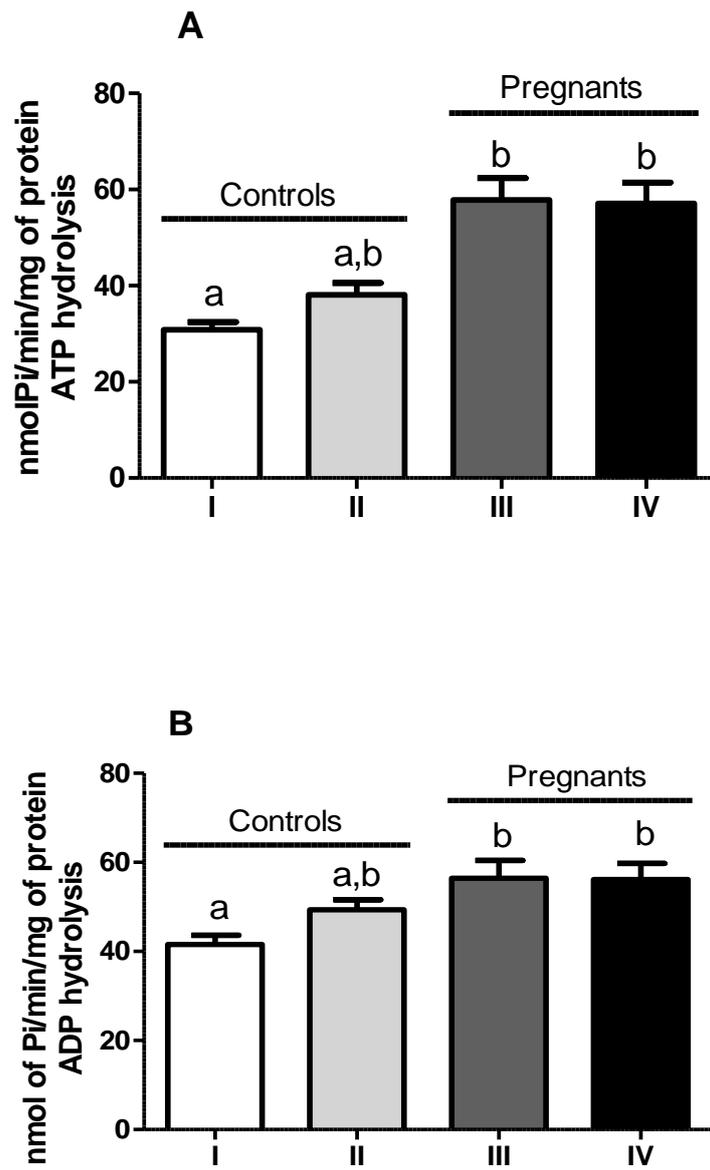


Figure 1

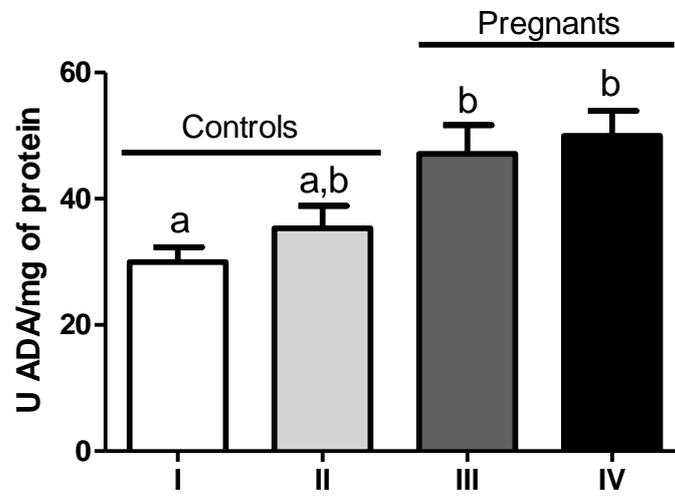


Figure 2

## CONCLUSÕES

- A atividade da E-NTPDase e da E-ADA não sofreu alteração nos grupos de não-gestantes com ou sem toxoplasmose, indicando que esta por si só não acarretou em alteração nas atividades das ectoenzimas em linfócitos, apesar da participação do sistema purinérgico nas respostas imunológicas desencadeadas pelo hospedeiro.
- A atividade da E-NTPDase e da E-ADA aumentou nos grupos de gestantes soronegativas e soropositivas para toxoplasmose quando comparados com o grupo de não-gestantes soronegativas para toxoplasmose. Estes resultados sugerem que a gestação, como um processo fisiológico, pode alterar a atividades das ectoenzimas, uma vez que o sistema purinérgico participa da resposta imunológica. Estas alterações podem estar relacionadas à manutenção de uma resposta imune adequada durante a gestação, que permite a tolerância à presença do feto.

## REFERÊNCIAS

ALUVIHARE, V. R.; BETZ, A. G. The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 330-43, 2006.

ALVES-FERREIRA, M.; et al. Magnesium-dependent ecto-ATP diphosphohydrolase activity in *Herpetomonas muscarum muscarum*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 265-271, 2003.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the cd-39/ntpdase family modulated platelet activation on thrombus formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 36, p. 217-22, 2006.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiol.**, v. 11, p. 426-30, 2003.

BECK, S. T. et al. Importância do rastreamento sorológico da toxoplasmose em gestantes atendidas em ambulatório de pré-natal de alto risco. **Revista Saúde: Santa Maria**, v. 36, n. 1, p. 29- 36, 2011.

BENREZZAK, O. et al. Identification and immunolocalization of two isoforms of ATP-diphosphohydrolase (ATPDase) in the pig immune system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 370, p. 314-322, 1999.

BERMUDES, D. et al. 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. et al. 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.

BOROWIEC, A. et al. 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. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BOUT, D.; ALINE, F.; DIMIER-POISSON, I. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2368-74, 2002.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacol. Rev.**, v. 58, p. 58–86, 2006.

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

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Trop.**, v. 81, p. 111-2, 2002.

CHAOUAT, G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? **Semin. Immunopathol.**, v. 29, n. 2, p. 95-113, 2007.

CHOUDHURY, S. R.; KNAPP, L. A. Human reproductive failure I: Immunological factors. **Hum. Reprod. Update**, v. 7, p. 135-60, 2001.

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

DE JESUS, J. B. et al. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. **Journal of Biosciences**, v. 57, p. 890-896, 2002.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 569-88, 1998.

DING, Y. et al. ATP, P2X receptors and pain pathways. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81, p. 289-294, 2000.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. **Press**, p. 41-60, 1988.

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

FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. S. **Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana**. São Paulo: Manole, 2003.

FIETTO, J. L. R. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 454-460, 2004.

FILIPPINI, A. et al. 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.

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

FRENKEL, J. K. Toxoplasmose. In: Focaccia R, Veronesi R: **Tratado de Infectologia**. Ed. 3. São Paulo: Atheneu, p. 1633- 52, 2005.

GALVÁN-RAMIREZ, M. L.; MONDRAGÓN-FLORES, R. **Toxoplasmosis Humana**. Guadalajara: Ediciones Cuellar; 2001.

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

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. Kuby Immunology. **W. H. Freeman**, 4 ed: New York, USA, 2000.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Ann. Ist. super Sanità**, v. 4, p. 65-70, 2004.

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

HUANG, S. F. L; KASPER, L. H. CD4+ T cells in the pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 4966- 72, 2004.

JENUM, P. A; STRAY-PEDERSEN B. Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, p. 2907-13, 1998.

JOBIM, E. M.; DA SILVA, J. E. P. Toxoplasmose, uma doença congênita. **Saúde**. v. 30, p. 50-56, 2004.

JOINER, K. A.; DUBREMETZ, J.F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 1169-72, 1993.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v.11, n.3, p.201-212, 2011.

KACSMARECK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33116-33122, 1996.

KAPPERUD, G. et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: results of a prospective case-control study in Norway. **Obstet Gynecol Surv**, v. 52, p. 158-9, 1997.

LYNFIELD, R.; GUERINA, N. G. Toxoplasmosis. **Pediatr. Ver.**, v. 18, n. 3, p. 75-83, 1997.

MALISZEWSKI, C.R. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. **Journal Immunology**, v. 153, p. 3574-3583, 1994.

MELCZER Z. et al. Influence of leptin and the TNF system on insulin resistance pregnancy and their effect on anthropometric parameters of newborns. **Acta Obstet., Gynecol.**, v. 82, p. 432- 438, 2003.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, v. 185 [Suppl 1], p. S73-82, 2002.

NETO, E. C. et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. **International Journal of Epidemiology**, v. 29, p. 941-47, 2000.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

OLLE, P. et al. The evolution of ocular toxoplasmosis in anti-interferon gamma treated mice. **Current Eye Research**, v. 15, p.701-07, 1996.

PEREIRA, C. A. et al. Immunity in the normal pregnancy and in the patient with systemic lupus erythematosus (SLE). **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 45, n. 3, may/june, 2005.

PICCINNI, M. P. et al. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. **J. Neuroimmunol.**, v.109, p.30-3, 2000.

PICCINNI, M. P. Role of T-cell cytokines in decidua and in cumulus oophorus during pregnancy. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 64, n. 3, p. 144-8, 2007.

POURSHARIFI, P. et al. Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 and ADA2 activities. **Clinical Biochemistry** (in press), 2008.

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, n. 3, p. 133-140, 2003.

REMYINGTON, J. S. et al. Toxoplasmosis. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, 6. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, p.947-1091, 2006.

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

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

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

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 1041-7, 2002.

SAEIJ, J. P.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 10, p. 476-81, oct., 2005.

SALAZAR-GONZALEZ, J. F. et al. Reduced ecto-5'-nucleotidase activity and enhanced OKT10 and HLA-DR expression on CD8 (T suppressor/cytotoxic) lymphocytes in the Acquired immune Deficiency Syndrome: evidence of CD8 cell immaturity. **Journal Immunology**, v. 135, p. 17778-17785, 1985.

SHAROYAN, S. et al. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 539- 546, 2006.

SITKOVSKY, M. V. Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. **Nippon Ika Daigaku Zasshi**, v. 65, p. 351-357, 1998.

SNEDDON, P. et al. Modulation of purinergic neurotransmission. **Progress in Brain Research**, v. 120, p. 11-20, 1999.

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.

SUBAUSTE, C. S.; REMINGTON, J. S. Immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, p. 532-37, 1993.

SZEKERES-BARTHO, J. et al. Progesterone as an immunomodulatory molecule. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, p. 1037-48, 2001.

SZEKERES-BARTHO, J. Immunological relationship between the mother and the fetus. **Int. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 471-95, 2002.

TABIASCO, J. et al. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties - a review. **Placenta**, v. 27, p. A:S34-9, 2006.

VARELLA I. S et al. Prevalence of acute toxoplasmosis infection among 41,122 pregnant women and the mother-to-child transmission rate in a public hospital in South Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 383-8, 2009.

VAZ, A. J. **Imunoensaios: Fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro. Ed: Guanabara koogan, 2007.

WEGMANN, T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? **Immunol. Today**, v. 14, p. 353-6, 1993.

WEINBERG, E. D. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. **Rev. Infect Dis**, v. 6, p. 814-31, 1984.

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

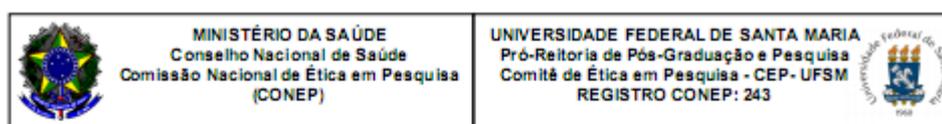
ZIMMERMAN, B. J.; BANDURA, A. Impact of self-regulatory influences on writing course attainment. **American Educational Research Journal**, v. 31, n. 4, 845-862, 1994.

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.

## ANEXOS

### Anexo A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



### 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 da Atividade de Enzimas que Degradam Nucleotídeos e Nucleosídeo da Adenina em Linfócitos e Plaquetas de Gestantes com Toxoplasmose  
**Número do processo:** 23081.017184/2011-51  
**CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética):** 0380.0.243.000-11  
**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:

Agosto/ 2012- Relatório final  
 Agosto/ 2013- Relatório final  
 Agosto/ 2014- Relatório final

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

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:** 13/01/2012

Santa Maria, 13 de Janeiro de 2012.



Félix A. Antunes Soares  
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM  
 Registro CONEP N. 243.

## Anexo B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título do projeto:

**“Avaliação da atividade de enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de gestantes soropositivas para Toxoplasmose”**

Pesquisadora responsável: **Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal**

Instituição/Departamento : **Departamento de Microbiologia e Parasitologia– UFSM**

Telefone para contato: (55) 3220-9581 ou (55) 9105-4701

Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Roraima,1000- Prédio da Reitoria-2º andar- sala Comitê de Ética -Campus Universitário- Bairro Camobi- 97105-900-UFSM-Santa Maria-RS

Tel: 0-xx-55 3220 9362

Local de coleta de dados: \_\_\_\_\_

Nome da paciente: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_ anos

Responsável legal: \_\_\_\_\_

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

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa, onde será colhido 15ml de sangue por punção venosa, a coleta será realizada no consultório de obstetrícia do HUSM, no momento da consulta. As amostras de sangue serão processadas e analisadas no laboratório do Departamento de Microbiologia e Parasitologia pela própria pesquisadora. A senhora, também, está sendo convidada 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 toxoplasmose, para melhor entendermos

sobre a toxoplasmose e gerarmos informações capazes de futuramente auxiliar no controle e novos tratamentos.

**Procedimento e riscos:** Na coleta de sangue haverá o risco de um pequeno desconforto devido à picada da agulha, e do local da coleta ficar dolorido ou arroxeadado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde. Ao responder ao questionário pode haver cansaço.

**Benefícios:** os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante. Com esse estudo, poderemos aprimorar nossos conhecimentos sobre a evolução e tratamento da doença. Ao participar desta pesquisa a senhora não terá gasto ou lucro financeiro. Não será feito pagamento pela sua participação na pesquisa.

**Confidencialidade:** as informações fornecidas no questionário serão de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Em nenhum momento será revelado ou utilizado seu nome. Os dados serão arquivados por um período de 5 anos, e depois destruídos.

Acredito ter sido suficientemente informada 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/representante legal /marca datiloscópica  
Nº identidade (para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

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: 55-3220-9581

Tatiana Montagner Dalcin Bertoldo: 55-9105-4701

Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Roraima,1000-Prédio da Reitoria-2º andar-sala comitê de ética-Campus Universitário-Bairro Camobi -97105-900- Santa Maria- RS- Telefone: 0-xx-55-3220-9362

## Anexo C – COLETA DE DADOS

**Título do projeto:** “Avaliação da atividade de enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de gestantes soropositivas para Toxoplasmose”.

**Pesquisadora responsável:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM.

**Telefone para contato:** (55) 3220-9581 ou (55) 9105-4701

Identificação número:.....

Data da coleta:.....

Responsável pela coleta:.....

1. Grupo em que pertence a paciente:

com toxoplasmose diagnosticada.

sem toxoplasmose diagnosticada.

2. Gestante com toxoplasmose faz uso de alguma medicação?

Não

Sim. Qual?.....

3. Gestante sem toxoplasmose faz uso de alguma medicação?

Não.

Sim. Qual?.....

4. Paciente é fumante?  Sim  Não

5. Paciente apresenta colesterol elevado?  Sim  Não

6. Possui uma das seguintes doenças? Quais?

Hipertensão  Diabetes  Artrite reumatóide

7. Onde mora? (rua, cidade, etc.)

.....

8. Como e há quanto tempo descobriu estar infectada?

.....  
.....

9. Semana gestacional:

- 1º trimestre
- 2º trimestre
- 3º trimestre

Outras informações relevantes:

.....  
.....

**Anexo D – Termo de Compromisso para Utilização de Dados  
(TERMO DE CONFIDENCIALIDADE)**

**Título do projeto:** “Avaliação da atividade de enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de gestantes com Toxoplasmose”.

**Pesquisador responsável:** Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal – UFSM.

**Instituição/Departamento:** Departamento de Microbiologia e Parasitologia.

**Telefone para contato:** (55) 3220 – 9581.

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade das pacientes cujos dados serão coletados do registro da paciente no arquivo do HUSM. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas na sala 4102 do prédio 20 do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (UFSM) por um período de dois anos, sob a responsabilidade da Pesquisadora responsável. Após este período, os dados serão destruídos.

Santa Maria, 01 de setembro de 2011.

---

Profª Drª **Daniela Bitencourt Rosa Leal**

(Nome e assinatura do pesquisador responsável)