

**ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE NO SORO E
NOS LINFÓCITOS DE RATOS INFECTADOS POR
*Sporothrix schenckii***

Verônica Souza Paiva Castro

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

Orientadora: Dr^a. Cinthia Melazzo Mazzanti

Santa Maria, RS, Brasil

2011

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

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

**ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE NO SORO E NOS
LINFÓCITOS DE RATOS INFECTADOS POR
*Sporothrix schenckii***

elaborada por
Verônica Souza Paiva Castro

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cinthia Melazzo Mazzanti, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Rosélia Maria Spanevello, Dr^a. (UFPel)

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 03 de outubro de 2011.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, Capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer é algo que só depende de nossa vontade e perseverança.”

(Albert Einstein)

Dedico este estudo ao meu esposo amado
Jorge Castro...por você, só por você...
TE AMO!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Todo-poderoso o qual tenho fé, agradeço pelo fortalecimento diário concedido pela leitura de sua Palavra, à Bíblia;

Ao meu melhor amigo, companheiro e esposo Jorge Luiz Costa Castro pela paciência, ensinamentos e por ser meu maior exemplo de dedicação e amor profissional;

Aos meus pais Ernesto Paiva Filho e Maria das Dores Souza Paiva pela educação e amor incondicional e aos meus irmãos amados Carolina e Rômulo, pelo apoio e incentivo;

Aos meus queridos e amados irmãos na fé que participaram de minhas angústias, medos e que sempre estiveram presente, me apoiando, encorajando, obrigada! Amo vocês;

À minha querida orientadora Cinthia Melazzo Mazzanti e co-orientadora professora Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, obrigada pela confiança, respeito e pelos ensinamentos durante todos os momentos deste estudo;

Ao meu querido amigo, irmão e sempre orientador Marconi Rodrigues de Farias, muito obrigada pelo incentivo e encorajamento;

A professora Dr^a. Dominguita Graça, muito obrigada pela ajuda importantíssima neste estudo, sua presença, orientação e dedicação jamais serão esquecidos!

Ao amigo e irmão Márcio Machado Costa, agradeço do fundo de meu coração a enorme ajuda e o carinho dispensados todos os dias. Muito obrigada garooooooto!!

A toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas Veterinária (LacVet-UFSM), em especial aos meus novos amigos Heloisa Palma, Marcos Matoso, Devani, Rosangela e Daniele Rodrigues, com vocês me sinto em casa. Muito obrigada pelo carinho!

Aos co-orientadores e colegas, Patrícia Wolkmer e Aleksandro da Silva que foram incansáveis revisores, críticos, companheiros em todas as etapas deste estudo;

As estagiárias, Diandra e Bianca obrigada pela ajuda em todas as etapas desta grande maratona que é a pesquisa experimental, sem a dedicação de vocês teria sido muito mais difícil, continuem com essa dedicação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM;

A CAPES, pela concessão da bolsa.

RESUMO

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

ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE NO SORO E NOS LINFÓCITOS DE RATOS INFECTADOS POR *Sporothrix schenckii*

AUTORA: VERÔNICA SOUZA PAIVA CASTRO
ORIENTADORA: CINTHIA MELAZZO MAZZANTI
Santa Maria, 03 de outubro de 2011

A esporotricose é uma infecção micótica subcutânea de evolução subaguda ou crônica, caracterizada por lesões inflamatórias de aspecto piogranulomatoso, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. A adenosina desaminase (ADA) é uma enzima “chave” no metabolismo das purinas, promovendo a desaminação da adenosina uma importante molécula anti-inflamatória. O aumento na atividade da ADA tem sido demonstrado em várias condições inflamatórias, porém, não existem dados na literatura associados com esta infecção micótica. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da ADA no soro (S-ADA) e nos linfócitos (L-ADA) de ratos infectados por *S. schenckii*. Foram utilizados setenta e oito ratos distribuídos em dois grupos. No experimento I, os ratos foram infectados por via subcutânea e no experimento II, infectados por via intraperitoneal. A coleta de sangue para a avaliação hematológica e atividades da S-ADA e L-ADA foram realizadas nos dias 15, 30 e 40 pós-infecção (PI), para avaliar a evolução da doença. No experimento II, foi observada na fase aguda uma diminuição na atividade da S-ADA e L-ADA ($p < 0.05$), sugerindo um mecanismo compensatório do organismo na tentativa de proteger o hospedeiro da lesão tecidual excessiva. Com a cronicidade da enfermidade os ratos do experimento I e II aos 30 dias PI, apresentaram um aumento na atividade da L-ADA ($p < 0.05$), promovendo uma resposta inflamatória na tentativa de combater a proliferação do agente. Assim, sugere-se que a infecção pelo *S. schenckii* altera as atividades da S-ADA e L-ADA de ratos infectados experimentalmente, demonstrando o envolvimento desta enzima na patogênese da esporotricose.

Palavras-chave: Esporotricose, adenosina desaminase, linfócitos, soro.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITY IN SERUM AND LYMPHOCYTES OF RATS INFECTED BY *Sporothrix schenckii*

AUTHOR: VERÔNICA SOUZA PAIVA CASTRO
ADVISER: CINTHIA MELAZZO MAZZANTI
Santa Maria, October 03th, 2011

Sporotrichosis is a subcutaneous fungal infection of evolution subacute or chronic, inflammatory lesions characterized by pyogranulomatous aspect, caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. Adenosine deaminase (ADA) is a “key” enzyme in the purine metabolism, promoting the deamination of adenosine, an important anti-inflammatory molecule. The increase in ADA activity has been demonstrated in several inflammatory conditions, however, no data in the literature associated with this fungal infection. The objective of this study was to evaluate the activity of serum ADA (S-ADA) and lymphocytes (L-ADA) of rats infected with *S. schenckii*. We used seventy-eight rats divided into two groups. In the first experiment, rats were infected subcutaneously and in the second experiment, infected intraperitoneally. Blood samples for hematologic evaluation and activities of S-ADA and ADA-L were performed on days 15, 30 and 40 post-infection (PI) to assess disease progression. In experiment II, was observed in an acute decrease in activity of S-ADA and L-ADA ($p < 0.05$), suggesting a compensatory mechanism in the body's attempt to protect the host from excessive tissue damage. Chronicity of the disease the rats in the experiment I and II at 30 days PI, showed an increased activity of L-ADA ($p < 0.05$), promoting an inflammatory response in an attempt to combat the spread of the agent. Thus, it is suggested that infection with *S. schenckii* alters the activities of S-ADA experimentally infected rats, demonstrating the involvement of this enzyme in the pathogenesis of sporotrichosis.

Keywords: Sporotrichosis, adenosine deaminase, lymphocytes, serum.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1: a- Presença de conidiófaros e conídios (fase micelial), b- presença de estruturas leveduriformes (fase parasitária).....	13
Figura 2: Lesão linfocutânea em um paciente humano adulto.....	14
Figura 3: Lesão ulcerada, de apresentação cutânea fixa, em face de uma criança.....	14
Figura 4: Lesões ulcero-gomosa com presença de crostas e nódulos, em um felino com esporotricose cutânea localizada em face.....	15
Figura 5: Processo inflamatório piogranulomatoso. Com presença de macrófagos (seta) e neutrófilos degenerados (cabeça de seta). Numerosas estruturas leveduriformes (*) de aspecto pleomórfico intra e extracelular sugestivo de infecção por <i>S. schenckii</i> . Lâmina confeccionada a partir de lesão exsudativa em um felino...../.....	16
Figura 6: Cascata purinérgica. Adenosina deaminase (ADA), enzima chave no metabolismo das purinas.....	19
Figura 7: Receptores para nucleotídeos (P2X e P2Y) e nucleosídeos.....	20

CAPITULO II

Figura 1- Lesões macroscópicas de ratos infectados experimentalmente com o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, infecção sistêmica (A, B, C3) infecção subcutânea (C2). (A) Testículo com aumento na cápsula e presença de numerosos nódulos de tamanhos variados, com 1 a 3 mm de diâmetro. Detalhe: seção transversal do testículo direito mostra que o parênquima testicular está preservado. (B) Na superfície natural do fígado são observadas numerosos nódulos de coloração branca, de aspecto brilhante e tamanhos variados. (C) Comparação dos metatarso, animal controle e ambos grupos infectados. (C1) controle com aspecto normal. (C2) Lesão dorsal irregular principalmente orientados longitudinalmente sobre o metatarso, a lesão consiste de uma área ulcerada alopecias. (C3). Aumento de volume (edema) em toda a circunferência do metatarso.....38

Figura 2- Médias e desvio-padrão do número de leucócitos totais (A e B), neutrophilis (C e D) e linfócitos (E e F) de ratos infectados com *Sporothrix scheinkii* quando comparado aos não-infectados (*p <0,05) no Experimento I e II. Experimento I: ratos infectados por via subcutânea; Experimento II: ratos infectados por via intraperitoneal.....39

Figura 3- Médias e desvio-padrão da atividade de adenosina desaminase em linfócitos de ratos infectados com *Sporothrix schenckii* por via subcutânea (A: Experimento I) e intraperitoneal (B: Experimento II) forma em relação ao não-infectado. Mesmas letras no mesmo gráfico não são estatisticamente diferentes entre si no teste t de Student (*p <0,05; ** p <0,01).....40

Figura 4- Médias e desvio padrão da atividade de adenosina desaminase em soro de ratos infectados com *Sporothrix schenckii* por via subcutânea (A: Experimento I) e intraperitoneal (B: Experimento II) forma em relação ao não-infectado. Mesmas letras no mesmo gráfico não são estatisticamente difere si no teste t de Student (* p <0,05).....41

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1 – INTRODUÇÃO	11
2 - REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Esporotricose	12
2.1.1. Histórico	12
2.1.2. <i>Sporothrix schenckii</i>	12
2.1.3. Epidemiologia.....	13
2.1.4- Esporotricose Humana	14
2.1.5- Esporotricose felina.....	15
2.1.6- Esporotricose e a resposta imune	16
2.2- Sistema purinérgico	17
2.2.1-Adenosina desaminase	17
2.2.2 Receptores purinérgicos	19
CAPÍTULO II	21
3 - ARTIGO CIENTÍFICO	21
1. Introduction	24
2. Material and methods	25
2.1. Animals	25
2.2. <i>Sporothrix schenckii</i> isolated and inoculum	25
2.2.1. <i>Sporothrix schenckii</i> isolated	25
2.2.2. Inoculum preparation.....	26
2.3. Experimental design	26
2.3.1. Experiment I	26
2.3.2. Experiment II.....	26
2.4. Collecting samples	27
2.5. Hematological parameters	27
2.6. Separation of lymphocytes and serum obtained	28
2.7. ADA activity in lymphocytes and serum	28
2.8. Statistical analysis	28
3. Results	29
3.1. Disease course	29
3.2. Hematological parameters	29
3.3. ADA activity in lymphocytes and serum	30
4. Discussion	30
References	33
4 - CONCLUSÃO	42
5 - REFERÊNCIAS	43

CAPÍTULO I

1 – INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção micótica subcutânea de evolução subaguda ou crônica causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, que apresenta uma distribuição mundial principalmente em regiões de clima tropicais e temperados (SCHUBACH, 2008). Por possuir caráter geofílico, o fungo pode ser encontrado em material orgânico em decomposição, nas plantas, entre outros. Acomete o homem e várias espécies de animais e sua transmissão ocorre pela inoculação traumática do agente no tecido subcutâneo, conferindo a esta micose uma lesão piogranulomatosa (SCHUBACH, 2004).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e no controle desta doença não são totalmente elucidadas, mas sabe-se que a resposta imune celular e humoral estão envolvidas. A imunidade adquirida contra o *S. schenckii* é expressa principalmente por macrófagos ativados por células T CD4 + e a resposta através do Th1 já é descrito como sendo de fundamental importância na patogênese da esporotricose (CARLOS et al., 1992; MAIA et al., 2006). Estudos demonstram que a resposta inflamatória pode ser modulada por vários sistemas incluindo o sistema purinérgico. A adenosina, uma importante molécula deste sistema, está presente em todos os tecidos, demonstrando importantes funções relacionadas com a sinalização celular, a neuroproteção, a trombaregulação e através dos linfócitos regula as respostas imunes e os processos inflamatórios (BURNSTOCK, 2006; DESROSIERS et al., 2007).

A concentração de adenosina extracelular é regulada pela atividade de algumas ectoenzimas, sendo a adenosina desaminase (ADA: EC 3.5.4.4) uma enzima chave do metabolismo das purinas, promovendo a desaminação irreversível de adenosina em inosina. A ADA possui um papel essencial no crescimento normal, diferenciação e proliferação de linfócitos T. Com isso, sua atividade é um sensível marcador em infecções e na avaliação de sua evolução, como já demonstrado em estudos com pacientes humanos portadores de tuberculose (SINGH & SHARMA, 2000).

Reconhecendo o importante papel da ADA em diversos mecanismos fisiológicos e patológicos, e sendo esta enzima responsável por modular células que estão diretamente envolvidas na patogênese da esporotricose, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da ADA em ratos infectados experimentalmente por *S. Schenckii*, com o intuito de investigar o papel desta enzima nesta micose zoonótica.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Esporotricose

2.1.1. Histórico

Benjamin Robinson Schenck em 1896 diagnosticou o primeiro caso de esporotricose em um paciente humano, no Johns Hopkins Hospital em Baltimore (USA), caso este publicado em 1898 (SCHENCK, 1898). No Brasil, a doença é conhecida desde 1907 quando Lutz e Splendore fizeram o relato da infecção em humanos e em ratos no Estado de São Paulo. Até a década de 90 a esporotricose foi considerada uma doença ocupacional, devido aos casos estarem relacionados a agricultores, jardineiros e floristas (DONADEL, 1993). Desde então, casos isolados da doença têm sido descritos em vários estados brasileiros e em outros países.

2.1.2. *Sporothrix schenckii*

Sporothrix schenckii é um fungo dimórfico, agente etiológico da doença esporotricose, pertencente ao Reino Fungi, divisão Eumyceta, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae, gênero *Sporothrix* e espécie *S. schenckii* (LACAZ et al. 1991). Estudos moleculares recentes demonstraram claramente que esta doença é causada não por apenas uma espécie do agente, mas por um complexo de pelo menos seis possíveis espécies filogenéticas: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix luriei* e *Sporothrix albicans* (MARIMON et al, 2006). Esses vários grupos são geneticamente diferentes e estão distribuídos em diferentes regiões geográficas.

O dimorfismo térmico do *S. schenckii* é caracterizado pela fase micelial (figura 1a) ou filamentosa, encontrada no ambiente em temperaturas variando de 22 a 28° C e sua fase leveduriforme (figura 1b) é encontrada em condições de crescimento entre 35 e 37° C *in vitro*, ou no hospedeiro, forma parasitária. Por já ter sido isolado do solo, plantas, espinhos de roseira, cascos de árvores, madeira é classificado como geofílico (RIPPON, 1988).

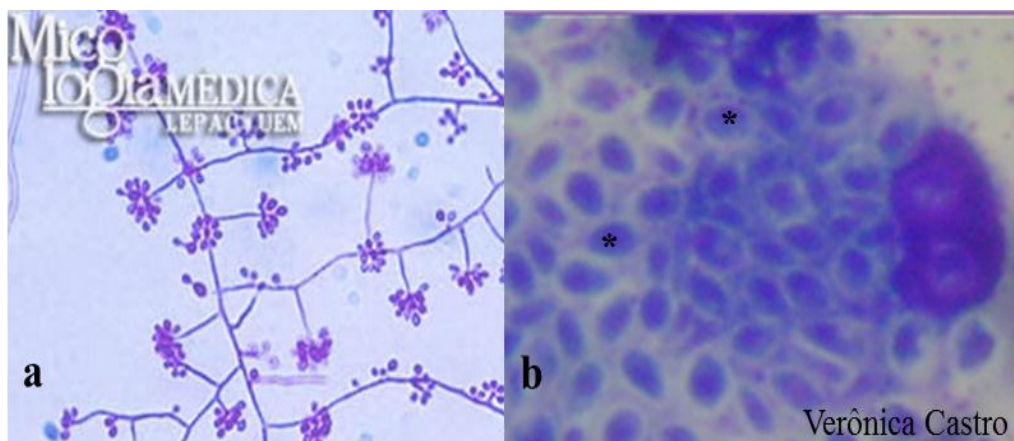


Figura 1: a- presença de conidiófaros e conídios - fase micelial. b- presença de estruturas leveduriformes (*) - fase parasitária.

2.1.3. Epidemiologia

A esporotricose apresenta distribuição mundial e sua ocorrência está principalmente relacionada com regiões de clima tropical e temperado (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2001). Sendo a micose subcutânea mais frequente em humanos com importância e prevalência variável entre as regiões e os países (DONADEL, 1993). Na América do Sul, os maiores relatos ocorrem no Brasil, com grande incidência no Estado do Rio de Janeiro, envolvendo o gato doméstico na transmissão desta doença (BARROS et al., 2010). Já na região central do Rio Grande do Sul e no Uruguai, pacientes humanos por décadas manifestam essa micose subcutânea pela transmissão do tatu, onde nestas regiões é comum a prática de caça desse animal e conseqüentemente infecção de seus caçadores (CONTI-DIAS, 1989, LOPES et al., 1999, ALVES et al., 2010).

A distribuição geográfica e a epidemiologia da doença sugerem que o clima, a temperatura e a umidade relativa influenciem no crescimento do fungo no seu estado saprofítico (RIPPON, 1988). Sua transmissão ocorre pela inoculação traumática, onde o fungo penetra no tecido subcutâneo do hospedeiro levando assim manifestações clínicas diferenciadas entre as espécies.

2.1.4. Esporotricose Humana

Geralmente após a inoculação do fungo no tecido subcutâneo por ocasião de um trauma quer seja farpas, espinhos, arranhadura ou mordedura esse agente se limitará aos linfonodos regionais à lesão. Habitualmente, os sítios de infecção são os membros inferiores e superiores. A apresentação clínica da esporotricose é muito variada, observando-se as seguintes formas clínicas: cutânea fixa, linfocutânea, cutânea disseminada e extracutânea (FARIAS et al., 1997; RAMOS-E-SILVA et al., 2007). A forma mais comumente observada é a linfocutânea (figura 2) que a partir de uma lesão inicial, segue-se um trajeto ascendente nos membros, formando cadeia de nódulos, ao longo dos vasos linfáticos, podendo ulcerar ou não. No adulto, essa forma é a mais observada nos membros e, na criança a forma relatada é a cutânea fixa, ocorrendo com maior frequência na face (figura 3) (LOPES-BEZERRA et al. 2006, SONG et al. 2011).

A forma cutânea disseminada e extracutânea são consideradas formas raras e incomuns e de difícil diagnóstico (RAMOS-E-SILVA et al., 2007). A esporotricose sistêmica resulta da disseminação hematogênica e/ou linfática após inalação ou ingestão de esporos, podendo haver o comprometimento de um ou mais órgãos (DONADELI, 1993). O desenvolvimento de lesões no sítio de inoculação do fungo está relacionado com o sistema imunológico do hospedeiro e com a quantidade e virulência do agente inoculado (DONADEL et al. 1993, LACAZ et al. 2002).



Figura 2: Lesão linfocutânea em um paciente humano adulto.



Figura 3: Lesão ulcerada, de apresentação cutânea fixa, em face de uma criança.

2.1.5. Esporotricose felina

O primeiro caso brasileiro de esporotricose felina naturalmente adquirida foi descrito em 1956, e em 1965 foi publicado a maior casuística internacional encontrada até então (FREITAS et al., 1956, FREITAS et al., 1965). A manifestação clínica na espécie felina é observada por lesões cutâneas constituídas por gomas que ulceram e drenam um exsudato purulento levando a formação de crostas. Os locais mais afetados são à região da cabeça (figura 4), a parte distal dos membros e a base da cauda (SCOTT et al., 1995).

Nos gatos as lesões apresentam um grande número de formas leveduriformes, visualizadas ao exame citopatológico (figura 5). Estas leveduras possuem características pleomórficas, variando de formas clássicas "charutos" há formas arredondadas e ovaladas e, devido à riqueza parasitária presente nestas lesões, confere ao gato um alto potencial zoonótico desta enfermidade (PEREIRA et al., 2011).



Figura 4: Lesões ulcero-gomosa com presença de crostas e nódulos, em um felino com esporotricose cutânea localizada em face.

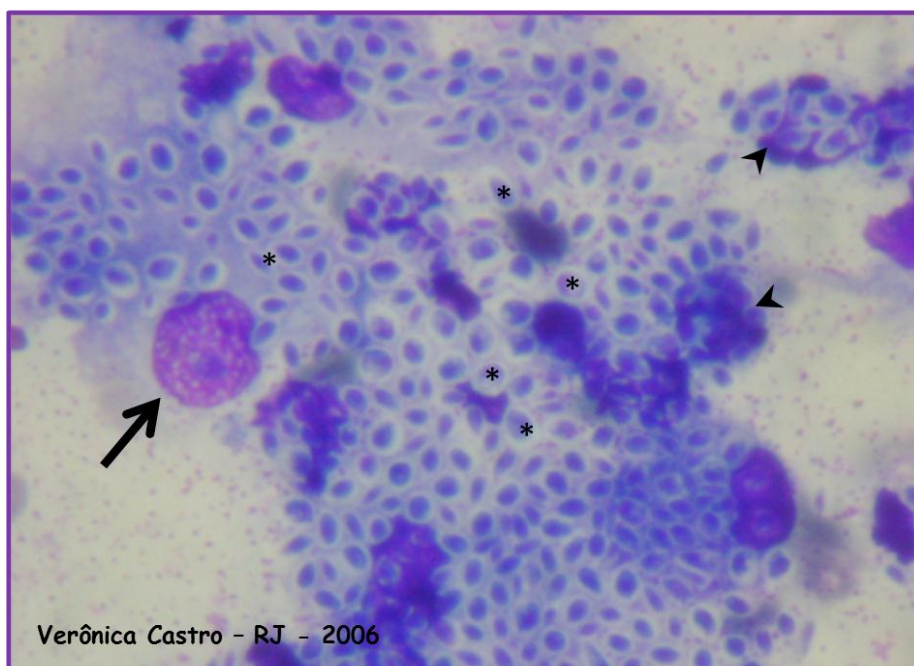


Figura 5: Processo inflamatório piogranulomatoso. Com presença de macrófagos (seta) e neutrófilos degenerados (cabeça de seta). Numerosas estruturas leveduriformes (asteriscos) de aspecto pleomórfico intra e extracelular sugestivo de infecção por *S. schenckii*. Lâmina confeccionada a partir de lesão exsudativa em um felino. (Panótico rápido, 100x).

2.1.6. Esporotricose e a resposta imune

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e no controle de infecções causadas por *S. schenckii* ainda não estão bem elucidadas, porém, a imunidade frente às infecções fúngicas é mediada principalmente por células. Neste contexto, possuem papel essencial os neutrófilos, os macrófagos e as células dendríticas, os quais desempenham funções de fagocitose, secreção de componentes microbianos frente a elementos fúngicos não englobados, ativação da imunidade adaptativa através da produção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, além do processo de apresentação de antígenos (HUFFNAGLE & DEEPE, 2003; ROMANI, 2004; SHOHAM & LEVITZ, 2005).

O fungo é reconhecido e internalizado pelas células apresentadoras de antígeno, as quais digerem o microrganismo em determinantes antigênicos, apresentando-os na fenda do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II. A ativação e o desenvolvimento de respostas especificadas por linfócitos CD4⁺ são essenciais para determinar a susceptibilidade ou a resistência do hospedeiro nas infecções fúngicas. Portanto, a resposta imune será

direcionada para a dicotomia Th1 ou Th2, através da liberação de citocinas específicas que irão atuar em determinadas células do sistema imune promovendo a ativação de linfócitos B ou o desenvolvimento de hipersensibilidade tardia (ROOK, 1994).

O principal mecanismo da imunidade contra o *S. schenckii* envolve macrófagos ativadas, principalmente, por IFN- γ produzido por linfócitos T CD4+ (TACHIBANA et al., 1999) Recentemente, foi demonstrado que isolados de *S. schenckii* de casos cutâneos e viscerais interagem com células dendríticas e estimulam citocinas de diferentes formas. Sendo a resposta Th1 de importância fundamental na patogênese da esporotricose e sua ativação diferencial é responsável por manifestações clínicas variadas (UENOTSUCHI et al., 2006).

2.2. Sistema purinérgico

Em adição, a adenosina produzida durante hipóxia ou em processos inflamatórios reduz a lesão tecidual promovendo assim uma reparação tecidual através de diversos mecanismos mediados por receptores de adenosina (CASTILLO et al., 2008). A remoção da adenosina extracelular ocorre em parte pela captação através de transportes bidirecionais, e outra parte é regulada pela desaminação da adenosina em inosina através da adenosina desaminase.

2.2.1. Adenosina desaminase

A adenosina desaminase (ADA, Adenosina aminohidrolase EC 3.5.4.4) é uma enzima chave no metabolismo das purinas (Figura 6), presente no citosol e na membrana celular. Possui altos níveis no sistema linfóide (timo, linfonodos e baço), podendo ser encontrado em níveis baixos nos eritrócitos (CRISTALLI et al., 2001; SABOURY et al., 2003) A ADA possui um papel essencial na proliferação e diferenciação de células linfóides em especial as células T (BOTA et al., 2001), conferindo a esta enzima uma importante função na regulação do sistema imunitário e nos processos inflamatórios (ANTONIOLI et al., 2008).

A ADA é uma aminohidrolase que pode ser encontrada tanto no espaço intra como extracelular. Esta enzima participa do metabolismo das purinas, desaminando a adenosina a inosina, contribuindo assim para a manutenção dos níveis deste nucleosídeo (RUÍZ et al., 2000). Quanto ao papel da ADA na inflamação, a possibilidade de que esta enzima possa interagir com outras proteínas de superfície celular, cria uma nova perspectiva na procura de

mecanismos imunregulatórios do processo inflamatório (FRODE & MEDEIROS, 2001). Assim, é provável que a ADA influencie nos níveis de adenosina promovendo proteção tecidual, através da regulação da resposta inflamatória e imune no tecido lesionado (ABBRACCHIO & CERUTI, 2007).

A ADA em humanos apresenta-se na forma de duas isoenzimas que são classificadas em ADA₁ e ADA₂ (SHAROYAN et. al., 2006). A isoforma ADA₁ é uma proteína monômera com massa molecular de aproximadamente 40 kDa. É principalmente localizada no citosol, sendo encontrada em todo organismo e também na superfície de macrófagos, linfócitos B e em alguns linfócitos T (TSUBOI et. al., 1995).

A isoforma ADA₂ diferentemente da ADA₁, apresenta diferenças tanto estruturais quanto cinéticas. Sua massa molecular é de aproximadamente 100 kDa e representa uma menor parte da atividade da ADA nos tecidos, sendo abundante no plasma (IWAKI-EGAWA et. al., 2006). Com relação à fonte celular e a função da ADA₂ plasmática ainda não estão bem elucidados (KOBAYASHI et. al., 1993). Mas estudos recentes sugerem que estas isoformas podem ser secretadas por monócitos ativados mediante processos inflamatórios (IWAKI-EGAWA et. al., 2006).

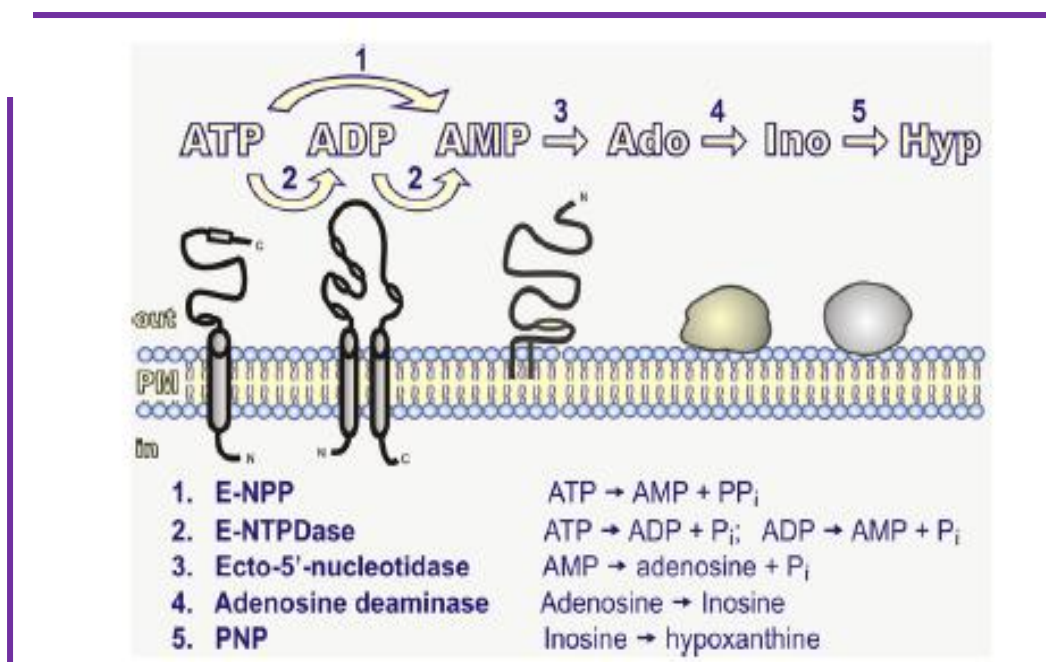


Figura 6: Cascata purinérgica enfatizando a desaminação da adenosina (Ado) em inosina (Ino) pela adenosina desaminase (4), enzima chave no metabolismo das purinas (Adaptado de YEGUTKIN, 2008).

2.2.2 Receptores purinérgicos

Os efeitos dos nucleotídeos extracelulares são mediados por receptores de superfície celular seletivo para nucleotídeos pertencentes a duas famílias distintas, estruturalmente de receptores P2: P2X e P2Y. Os receptores P2X são acoplados a canais de íons e compreendem sete subtipos (P2X₁₋₇). Os receptores P2Y são receptores acoplados a proteína-G e compreendem 14 subtipos (P2Y₁₋₁₄). Em adição, os receptores para adenosina compreendem 4 subtipos de receptores: A1, A2A, A2B e A3. Todos os receptores de adenosina são proteínas transmembrana acopladas à proteína-G. (figura 7) (YEGUTKIN, 2008).

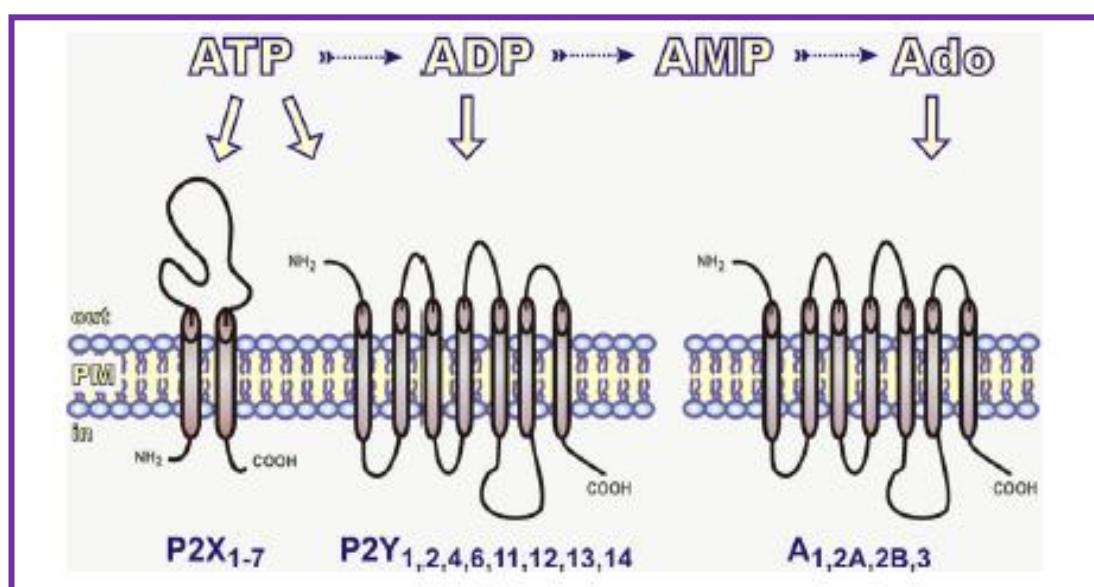


Figura 7: Receptores para nucleotídeos (P2X e P2Y) e nucleosídeos (A) (Adaptado de YEGUTKIN, 2008).

Por décadas, a determinação na atividade da ADA vem sendo descrita, como um sensível marcador em diversos processos inflamatórios e nas respostas imunes, como demonstraram estudos envolvendo pacientes humanos com artrite reumatóide (OCANA, et al. 1988), leishmaniose cutânea (ERELI, et al. 1998), tuberculose (MELO, et al. 2000), infecções fúngicas (YOSHINO, et al. 2009), doenças inflamatórias intestinais (BEYAZIT, et al. 2011; MAOR, et al. 2011) e nas infecções parasitárias (ISIK, et al. 2011). Em animais a atividade

desta enzima foi descrita na dermatofitose em bovinos e também em estudos experimentais tendo como modelo, ratos (ATAKISI, et al. 2006; PIMENTEL et al. 2009; DA SILVA, et al. 2011; TONIN, et al. 2011). Não foi encontrada na literatura científica até o momento a avaliação na atividade da ADA nas infecções micóticas envolvendo o agente *S. Schenckii*, assim o objetivo deste estudo foi determinar a atividade de ADA no soro (S-ADA) e nos linfócitos (L-ADA) de ratos infectados experimentalmente com *S. Schenckii*, com a hipótese do envolvimento desta enzima na patogênese da esporotricose.

CAPÍTULO II

3 - ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo científico, com sua formatação de acordo com as orientações da revista que será submetido:

Adenosine deaminase activity in serum and lymphocytes of rats infected with
Sporothrix schenckii

De acordo com normas para publicação em: Mycopathologia

Adenosine deaminase activity in serum and lymphocytes of rats infected with
Sporothrix schenckii

Verônica S.P. Castro^{a*}, Victor C. Pimentel^b, Aleksandro S. Da Silva^c, Gustavo R. Thomé^b,
Patrícia Wolkmer^a, Jorge L.C. Castro^a, Márcio M. Costa^a, Cássia B. da Silva^a, Daniele C.
Oliveira^c, Sydney H. Alves^c, Maria R.C. Schetinger^b, Sonia T.A. Lopes^a, Cinthia M.
Mazzanti^a

^aDepartment of Small Animals, Federal University of Santa Maria, Brazil

^b Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria,
Brazil

^cDepartment of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Brazil

*Corresponding author. Department of Small Animals, Federal University of Santa Maria,
Camobi – 9, Veterinary Hospital, room 109, 97105900, Santa Maria – RS, Brazil.

Tel. and Fax: + 55 55 32208814. E-mail: castrove@gmail.com

Adenosine deaminase activity in serum and lymphocytes of rats infected with
Sporothrix schenckii

Abstract

Sporotrichosis is a subcutaneous fungal infection of evolution subacute or chronic, inflammatory lesions characterized by pyogranulomatous aspect, caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. Adenosine deaminase (ADA) is a “key” enzyme in the purine metabolism, promoting the deamination of adenosine, an important anti-inflammatory molecule. The increase in ADA activity has been demonstrated in several inflammatory conditions, however, no data in the literature associated with this fungal infection. The objective of this study was to evaluate the activity of serum ADA (S-ADA) and lymphocytes (L-ADA) of rats infected with *S. schenckii*. We used seventy-eight rats divided into two groups. In the first experiment, rats were infected subcutaneously and in the second experiment, infected intraperitoneally. Blood samples for hematologic evaluation and activities of S-ADA and ADA-L were performed on days 15, 30 and 40 post-infection (PI) to assess disease progression. In experiment II, was observed in an acute decrease in activity of S-ADA and L-ADA ($p < 0.05$), suggesting a compensatory mechanism in the body's attempt to protect the host from excessive tissue damage. With chronicity of the disease the rats in the experiment I and II at 30 days PI, showed an increased activity of L-ADA ($p < 0.05$), promoting an inflammatory response in an attempt to combat the spread of the agent. Thus, it is suggested that infection with *S. schenckii* alters the activities of S-ADA experimentally infected rats, demonstrating the involvement of this enzyme in the pathogenesis of sporotrichosis.

Keywords: Sporotrichosis, adenosine deaminase, lymphocytes, serum.

1. Introduction

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*, widely distributed all over the world, especially in tropical and temperate climates [1]. Animals and humans can be infected by this agent through traumatic inoculation, where it is implanted in the subcutaneous tissue. Nowadays, the incidence of this disease in humans is related to the domestic cat, and the transmission occurs by scratching and biting [2]. Recent studies in southern Brazil have shown cases of sporotrichosis related to the armadillo hunting [3]. The clinical presentation in humans is mainly observed by lymphocutaneous lesions, but it may be systemic in immunocompromised patients. In cats, this disease is most commonly seen in the cutaneous tissue and it can also be disseminated through the skin and/ or mucosa [4].

The immunological mechanisms involved in preventing and controlling this disease are not totally clear, however, studies show that cellular and humoral immune responses may be involved [5,6]. Reports show that the inflammatory response can be modulated by other systems, including the purinergic system, that participates in neural and not neural mechanisms, including the immune response, inflammation, pain, platelet aggregation, among others. The adenosine is an important component of this immune system, found in all tissues, acting modulating many physiological processes [7,8]. The concentrations of extracellular adenosine in cells and tissues are controlled by adenosine deaminase (ADA: EC 3.5.4.4). ADA is an enzyme that participates in the catabolism of purines, present in the cytosol and cellular membranes, being responsible for promoting the hydrolytic deamination of adenosine to inosine [9].

ADA is present in all cell types, but high activity is present in the thymus, lymphoid tissues and peripheral lymphocytes. It has been demonstrated that this enzyme plays an important role in lymphocyte function and it is essential for the normal growth, differentiation and proliferation of T-lymphocytes [10,11]. The observation that ADA deficiency leads to

severe combined immunodeficiency syndrome points to the physiological importance of controlling extracellular adenosine levels in the immune system [12].

ADA activity may be a sensitive marker for infection severity. The activity of ADA was elevated in the serum of men with tuberculosis, cryptococcosis, cutaneous leishmaniasis [13-15] and dermatophytosis in the cattle [16]. Although major progress has been made in basic research on sporotrichosis, its pathogenesis remains to be elucidated. Thus, this study aimed to evaluate the ADA activity in serum and lymphocytes of rats infected with *S. schenckii*.

2. Material and methods

2.1. Animals

Seventy eight adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), average 60 days old and 250 ± 23 grams of weight, from the central vivarium of the Federal University of Santa Maria (UFSM). The animals were kept in an experimental room with controlled temperature and humidity (25°C; 70% RH). They were fed with commercial ration, water *ad libitum* and submitted to a period of 7 days of adaptation.

The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of Federal University of Santa Maria (UFSM), number 2011/002 in accordance with existing legislation and the Ethical Principles published by the Brazilian College of Animal Experiments (COBEA).

2.2. *Sporothrix schenckii* isolated and inoculum

2.2.1. *Sporothrix schenckii* isolated

S. schenckii strain (LAPEMI # 17) isolated from a feline presenting sporotrichosis was employed at this study. This strain previously identified as *S. schenckii* based on micromorphology, physiologic and molecular characteristics [17] was maintained in potato

dextrose agar (PDA) in the collection of the Microbiology and Parasitology Department of the Federal University of Santa Maria.

2.2.2. Inoculum preparation

The subculture of *S. schenckii* was on PDA and incubated at 25°C for ten days. Sterile physiologic solution was added to the colonies and a mixture was obtained by scraping the surface of the colonies. This mixture of conidia and hyphae fragments was withdrawn and transferred to a sterile tube. After, heavy particles were allowed to settle for 3 to 5 minutes, the upper homogeneous suspension was transferred to another sterile tube. This supernatant was used for count the conidia on hemocytometer and the inoculum were adjusted to 3×10^6 conidia/mL with sterile physiologic solution.

2.3. Experimental design

2.3.1. Experiment I

The animals were divided into two groups: C_{sc} - subcutaneous control (not-infected; n=18 healthy animals) and SC, subcutaneous infected whit *S. schenckii* (n=21). Animals were inoculated subcutaneously into the left hind footpad with a volume of 0.2 mL of inoculum and in the C_{sc} group was used saline. Inoculation was performed with animals anesthetized with isoflurane in an anesthetic chamber. Throughout the experiment, rats underwent daily clinical evaluation.

2.3.2. Experiment II

The animals were divided into two groups: C_{IP} - control intraperitoneally (not-infected) and IP, infected intraperitoneally whit *S. schenckii*. The C_{IP} group was composed of 18 healthy animals. Animals from infected group were inoculated intraperitoneally with a volume of 1.5 mL of inoculum and in the C_{IP} group was used saline. Inoculation was

performed with animals anesthetized with isoflurane in an anesthetic chamber. Throughout the experiment, rats underwent daily clinical evaluation.

2.4. Collecting samples

Samples were collected in both experiments at 15, 30 and 40 days post-infection. The groups of Experiment I and Experiment II were divided in subgroups, according to the period of infection: Experiment I (C_{sc15} and SC₁₅; C_{sc30} and SC₃₀; C_{sc40} and SC₄₀) and Experiment II (C_{IP15} and IP₁₅; C_{IP30} and IP₃₀; C_{IP40} and IP₄₀). The control subgroups contained six rats each, and the infected subgroups were composed of seven animals each. The animals were anesthetized in a chamber with isoflurane for collection of blood by cardiac puncture (6mL) and then euthanized. The storage of the samples was considered accordingly to the analysis. Thus, part of the material collected was allocated in tubes containing anticoagulant (ethylene-diaminetetraacetic acid - EDTA) for separation of lymphocytes (4mL) and performance of hemogram (1mL). The volume of 1mL was stored in a tube without anticoagulant to obtain serum.

2.5. Hematological parameters

Total leukocytes were performed using an automated cell counter (Vet Auto Hematology Analyzer[®], model BC 2800). The hematocrit was obtained by centrifugation using a microcentrifuge (Sigma) at 14.000 rpm/5 min. For morphological evaluation of the blood and differential count of white blood cell, the blood smears were first stained using a Romanowsky method and subsequently visualized under the optical microscope.

2.6. Separation of lymphocytes and serum obtained

Lymphocytes were obtained from whole blood collected with EDTA by gradient separation using Ficoll-Histopaque™ plus, according to the technique described by Böyum [18]. The ADA activity was measured immediately after obtaining lymphocytes. The samples were also stored in tubes without anticoagulant and centrifuged for 10 minutes to obtain the serum. The samples were placed in microtubes and stored refrigerated (- 20 °C) until analysis.

2.7. ADA activity in lymphocytes and serum

ADA activity was measured spectrophotometrically in serum and lymphocytes by the method of Giusti, [19]. The reaction was started by addition of the substrate (adenosine) to a final concentration of 21 mmol/l and incubations were carried out for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped by adding 106 mmol/l/0.16 mmol/l phenol-nitroprusside/ml solution. The reaction mixtures were immediately mixed to 125 mmol/l/11 mmol/l alkalinehypochlorite (sodium hypochlorite) and vortexed. Ammonium sulphate of 75 umol/l was used as ammonium standard. The ammonia concentration is directly proportional to the absorption of indophenol at 650 nm. The specific activity is reported as U/L in serum and lymphocytes.

2.8. Statistical analysis

The data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Students t-test ($P < 0.05$). The values were represented as mean \pm standard deviation. All samples were processed in triplicate.

3. Results

3.1. Disease course

Rats from SC group showed swelling and nodules at the inoculation site after 12 days PI. The ulcerated lesions at the inoculation point and back paws were viewed from 15 days PI (Fig. 1 C2). In rats of experiment a significant increase in the popliteal lymph node regional near to the inoculation site were observed. The animals from IP group (Experiment II) revealed increased testicular pronounced with 9 days post-infection. Necropsy findings observed the gross changes in liver, spleen and testes. The large increase in testicular evidenced from nine days remained throughout the experiment, but through longitudinal sections, it can be seen that the increase was due to thickening of the capsule. Nodules of varying sizes are present only in the capsule; the testis was normal appearance (Fig. 1 A). The natural surface of the liver was shown with numerous small dots of color shiny, white, having variable sizes. (Fig. 1 B). In experiment II, animals at 40 days PI, has visibly anasarca and edema in the joints (Fig. 1 C3).

3.2. Hematological parameters

Hematocrit did not change between not-infected and infected group on days 15 and 30 PI, different from day 40 PI, when there was a reduction in hematocrit in subgroup IP₄₀. The number of total leukocytes of infected rats increased significantly due to the neutrophilia (days 15, 30 and 40 PI - both experiment) and lymphocytosis (Day 40 PI - subgroup IP₄₀) compared to not-infected group (Fig. 2). The number of lymphocytes decreased on day 30 PI in subgroups SC₃₀ and IP₃₀ (Fig. 2).

3.3. ADA activity in lymphocytes and serum

The ADA activity in lymphocytes was significantly decreased ($P < 0.05$) in subgroup IP₁₅. A significantly increase ($P < 0.05$) of this enzyme activity was observed in infected subgroups at SC₃₀, IP₃₀ and IP₄₀ when compared not-infected subgroups (Fig. 3).

In subgroup IP₁₅ was observed a reduction in ADA activity. This decrease in enzymatic activity was also observed at day 30 PI in infected groups in subgroups SC₃₀ and SC₄₀, when compared with not-infected groups (Fig. 4). At day 40 PI, ADA activity was significantly increased ($P < 0.05$) in rats from subgroup IP₄₀ when compared with C_{IP40} (Fig. 4).

4. Discussion

In the experiments, the onset of clinical signs coincided with the transition of fungi (mycelia-yeast) which lasts about 13 days [20-23]. The lesions observed in this experiment by subcutaneous ulcerated lesions at the injection point and the presence of yeast was similar to that described by other investigators in rats, mice and hamsters [23-25]. A conspicuous clinical sign of systemic infection and visualized in this study is the increase in testicular [26]. And as shown by transverse sections of the organ, the macroscopic analysis revealed that the increase was due to thickened capsular the presence by multiple nodules of variable sizes; the testis presented with normal appearance.

With respect to laboratory tests, there was a slight decrease in red blood cell hematocrit only in the subgroup IP₄₀. Reports show that anemia may be present in patients with sporotrichosis [27]. The leukocytosis observed between experiments and times, corroborates with previous studies [26], this change is in response to the inflammatory process against the agent. Both experimental groups and subgroups showed neutrophilia, and the change is clearly understood by the migration of neutrophils into the inflamed tissue [28]. In an acute inflammatory process hoping to find a lymphopenia resulting from the migration

of lymphocytes to the inflammation site, this change was observed in both experiments in subgroups 30. In IP₄₀ was observed a lymphocytosis, possibly due to chronic inflammatory response. According to the literature, chronic lymphocytosis may result by lymphopoiesis, increase in response to chronic antigen stimulation or cytokine. [28].

For decades researchers around the world have studied the effect of infection caused by the dimorphic fungus *S. schenckii* in their hosts. There are several mechanisms involved in sporotrichosis, either by experimental or naturally acquired infections, but many gaps still exist. All these efforts take place in an attempt to elucidate the important role of the immune system and inflammatory mediators in this disease, seeking better treatment and prognosis of human and animals [5,29,30]. Studies with mice suggest that acquired immunity against *S. schenckii* is expressed by macrophages activated by CD4 + T cells [31].

The measurement of the activity of adenosine deaminase in serum and lymphocytes in our study was to elucidate the variation as marker inflammatory and immune disorders. Representing an important role in proliferation and differentiation of lymphoid cells, particularly T lymphocytes and maturation of monocytes, the ADA has an important role in immune and inflammatory processes [32,33]. The activity of this enzyme in lymphocytes was reduced at 15 days PI in both experiments, compared to controls. The evaluation of this enzyme in serum was inhibited in the subgroups IP₁₅, IP₃₀ and SC₃₀ when compared with non-infected groups. The reduction of ADA activity would have caused an increase in extracellular adenosine, which would then be converted to inosine. Hence, adenosine acts as a sensor and provides information to immune system about the tissue damage or acute inflammatory changes occurring in the vicinity of the immune system [34,35]. It is worth remembering that the number of lymphocytes did not change on day 15 PI, however, the ADA activity was inhibited. The reduction of ADA activity in lymphocytes leads to interaction of adenosine with adenosine receptors that exist in many cell types, with possible

anti-inflammatory effects, including inhibition of Th1 immune response likely. In infections caused by *S. schenckii* previously reported by other authors, there is a predominance of Th1 response and cell phones with production of interferon- γ [36]. Thus, inhibition of response by the action of adenosine in extracellular purinergic receptors could be a compensatory effect, attenuating inflammation and tissue damage. The reduction of ADA activity in serum and lymphocytes were also described in diseases such as trypanosomiasis [37], and leptospirosis [38].

With chronicity of disease, the rats of this study demonstrated an increased ADA activity in lymphocytes and serum as shown in Figures 2 and 3. The increase of ADA activity in lymphocytes and serum reduces the concentration of extracellular adenosine, promoting an inflammatory response that would be sufficient to contain the spread of the fungus, without significant tissue damage [7,8,10]. The increase of ADA activity in serum and in the lymphocytes suggest an involvement of this enzyme in the pathogenesis of sporotrichosis, as occurs in Parkinson's disease and cutaneous leishmaniasis [39,40]. In this study we evaluated only the activity of the enzyme ADA, but recognizing their essential role in the proliferation of lymphoid cells and particularly their differentiation into CD4 T cells, modulating the immune response in both healthy subjects and in immunologically [41]. It is believed by previous scientific background, the remarkable presence of lymphocytosis found in our study in experiment II - PI₄₀ subgroup, is related to a stimulation of lymphopoiesis, modulation probable by the ADA (10,11, 32).

Based on these results, we conclude that infection by *S. schenckii* alters the activity of ADA in the serum and lymphocytes of experimentally infected rats. It is believed that the ADA in the acute phase has anti-inflammatory action due to its inhibition, but with chronicity of disease, the enzyme was activated by promoting inflammation and hence tissue damage. In both experiments there were changes in ADA activity, but the experiment II showed greater

activity compared to experiment I. Other studies should be performed to verify the expression of ectoenzyme on the surface of lymphocytes in sporotrichosis in order to improve knowledge about the involvement of purinergic signaling in the immune response that occurs during infection by this fungus.

References

- 1- Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;1:129-33.
- 2- Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. *Clin Dermatol.* 2007; 25:181-87.
- 3- Alves SH, Boettcher CS, Oliveira DC, Tronco-Alves GR, Sgaria MA, Thadeu P, Oliveira LT, Santurio JM. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in southern Brazil: Epidemiological and antifungal susceptibility. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43:523-25.
- 4- Schubach TM, Schubach A, Okamoto T. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med. Assoc.* 2004;224:1623-29.
- 5- Carlos IZ, Sgarbi DB, Angkuster J, Alvirio CS, Silva CL. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathol.* 1992;117:139-44.
- 6- Maia DC, Sassa, MF, Placeres, MC, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathol.* 2006;161:11-19.
- 7- Burnstock G. Purinergic signalling-An overview. *Nov Found Symp.* 2006;276:26-48.

- 8- Desrosiers MD, Cembrola KM, Fakir MJ, Stephens LA, Jama FM, Shameli A, Mehal WZ, Shi Y. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *J Immunol.* 2007;179:1884-92.
- 9- Singh LS, Sharma R. Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. *Mol Cell Biochem.* 2000; 204:127-34.
- 10- Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallo J, Canela EI and Llouis C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog. Neurobiol.* 1997;52:283-94.
- 11- Codero O, Salgado F, Fernández-Alonso C, Herrera C, Luis C, Franco R, Nogueira M. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2001;70: 920-30.
- 12- Aldrich MB, Blackburn MR, Kellems RE. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. *Biochem. Biophys Res Commun.* 2000;272:311-15.
- 13- Melo FAF, Afiune JB, Santos ML, Castelo Filho A. Diagnóstico da tuberculose pleural pela ADA, isolada ou combinada a outras variáveis, inclusive em HIV-positivos. *Folha Méd.* 2000;119: 9-21.
- 14- Yoshino Y, Kitazawa T, Tatsuno K, Ota Y, Koike K. Cryptococcal Pleuritis Containing a High Level of Adenosine Deaminase in a Patient with AIDS: A Case Report. *Respiration.* 2009;79:153-56.
- 15- Erel O, Kocyigit A, Gurel MS, Bulut V, Seyrek A, Ozdemir Y. Adenosine Deaminase Activities in Sera, Lymphocytes and Granulocytes in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:491-94.
- 16- Atakisi E, Karapehliyan M, Atakisi O, Kontas T, Marasli S. Adenosine deaminase and biochemical liver function tests in the dermatophytic cattle. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2006;50:481-83.

- 17- Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. J Clin Microbiol. 2007;45:3198-06.
- 18- Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. J Clin Lab Invest. 1968;97:77-89.
- 19- Giusti G, Gakis C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. Enzyme. 1971;12:417-25.
- 20- Correa B, Gambale W, Paula CR, Palazzo S. Morphogenesis of *Sporothrix schenckii* “in vitro” and “in vivo” through the method of viability by fluorescence. Appl Fluoresc Technol. 1991;3:1-8.
- 21- Paes RA. 2007. Antígenos e anticorpos na esporotricose: caracterização e aplicações diagnóstico. Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 86pp.
- 22- Fabrim JJC, Rocha MFG. Micologia Medica: a luz para autores contemporâneos. 1rd ed. Guanabara Koogan;2004.
- 23- Madrid IM, Xavier MO, Mattei AS, Fernandes CG, Guim TN, Santin R, Schuch LFD, Nobre MDO, Araújo Meireles MC. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. Microbes Infect. 2009;12:162-65.
- 24- Yoshiike T, Lei PC, Komatsuzaki H, Ogawa H. Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* in *S. schenckii* inoculated hairless mice. Mycopathol. 1993;123:69-73.
- 25- González de Polanía LA, Alzate A, Saravia N. Comportamiento experimental del *Sporothrix schenckii* y la *Leishmania mexicana* en el hamster. Rev Inst Med Trop. 1990; 32:319-24.

- 26- Meinerz ARM, Antunes TA, Silva FV, Xavier MO, Cleff MB, Meireles MCA. Esporotricose experimental sistêmica em ratos Wistar:avaliação hematológica e perfil hepático. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008; 4:1026-28.
- 27- Caballero ABA, Martínez JC, Rivelli V, Aparicio R, Mendoza G. Esporotricosis en niños: Comunicación de tres casos com localización facial. *Pediatr.* 2000;27:32-36.
- 28- Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology.* Ames, Iowa. Blackwell Publishing Company. 2002.
- 29- Carlos IZ, Sassá MF, Da Graça Sgarbi DB, Placeres MCP, Maia DCG. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathol.* 2009; 168:1-10.
- 30- Bustamante B, Campos PE. Sporotrichosis treatment: Overview and update. *Current Fungal Infection Reports* 2011; 5: 42-48.
- 31- Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Mycol.* 1999;37:397-04.
- 32- Bota A, Gella FJ, Profilis C, Ferard G, Hadjivassiliou AG, Horder M, Schiele F, Canalias F. Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BCR647) *Clin Chim Acta.* 2001;306:79-89.
- 33- Conlon BA, Law WR. Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clin Exp Immunol.* 2004;138:14-20.
- 34- 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 Bow Dis.* 2008, 14:566-74.
- 35- Kumar V, Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Europ J Pharmacol.* 2009;616:7-15.

- 36- Uenotsuchi T, Takeuchi S, Matsuda T, Urabe K, Koga T, Uchi H, Nakahara T, Fukagawa S, Kawasaki M, Kajiwara H, Yoshida S, Moroi Y, Furue M. Differential induction of T_H1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int Immunol.* 2006;18:1637-46.
- 37- Da Silva AS, Bellé LP, Bitencourt PER, Souza VCG, Costa MM, Oliveira CB, Jaques JA, Leal DBR, Moretto MB, Mazzanti, CM, Lopes STA, Monteiro SG. Activity of the enzyme adenosine deaminase in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with *Trypanosoma evansi*. *Parasitol.* 2011;138:201-08.
- 38- Tonin AA, Pimental VC, Da Silva AS, Azevedo MI, Souza VCG, Wolkmer P, Rezer JFP, Badke MRT, Leal DBR, Schetinger MRC, Monteiro SG, Lopes STA. Adenosine deaminase activity in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Res Vet Sci.* 2011; doi:10.1016/j.rvsc.2011.01.013
- 39- Chiba S, Matsumoto H, Saitoh M, Kasahara M, Matsuya M, Kashiwagi M. A correlation study between serum adenosine deaminase activities and peripheral lymphocyte subsets in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 1995;132:170-73.
- 40- Ozcan E, Abdurrahim K, Salih GM, Vedat B, Adnan S, Yuksel O. Adenosine deaminase activities in sera, lymphocytes and granulocytes in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:491-94.
- 41- Martinez-Navio JM, Casanova V, Pacheco R, Naval-Macabuhay I, Climent N, Garcia F, Gatell JM, Mallol J, Gallart T, Lluís C, Franco R. Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol.* 2001;89:127-36

FIGURAS

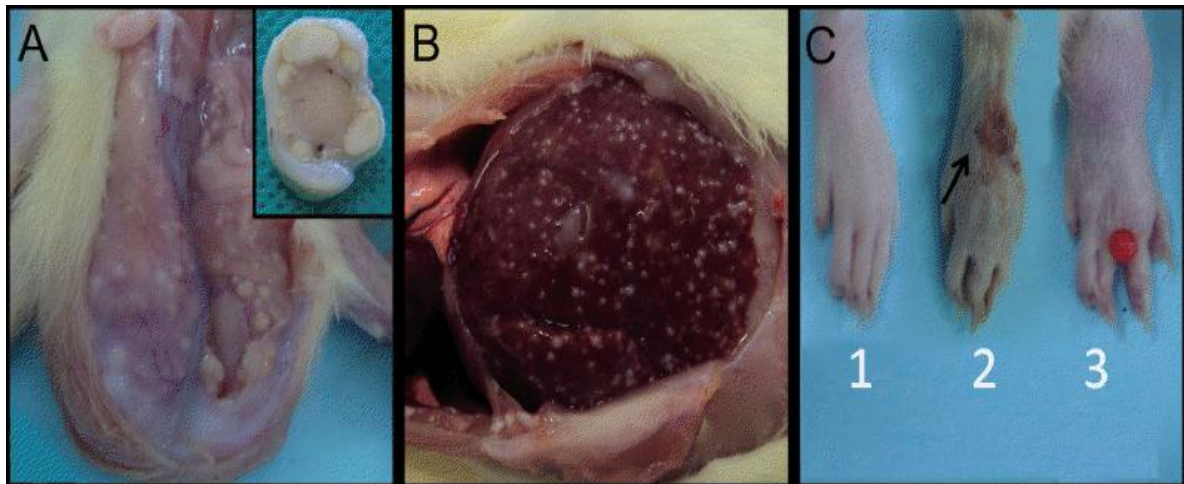


Figura 1. Gross lesions of rats experimentally infected with the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* through either a systemic pathway (A, B, C3) or the subcutaneous pathway (C2).

- A. Testis with a very thickened capsule within which several nodules 1-3 mm of diameter are detected.
Inset: cross section of the right testis shows that the testis parenchyma is spared.
- B. The liver capsule shows several white shining round to irregular areas of varied sizes.
- C. Comparison between normal and injected hind limb. C1. Normal foot. C2. Dorsal irregular lesion mostly longitudinally oriented over the metatarsus; the lesion consists of an alopecic ulcerated and crusty area. C3. Circumferential volume increase of the metatarsus.

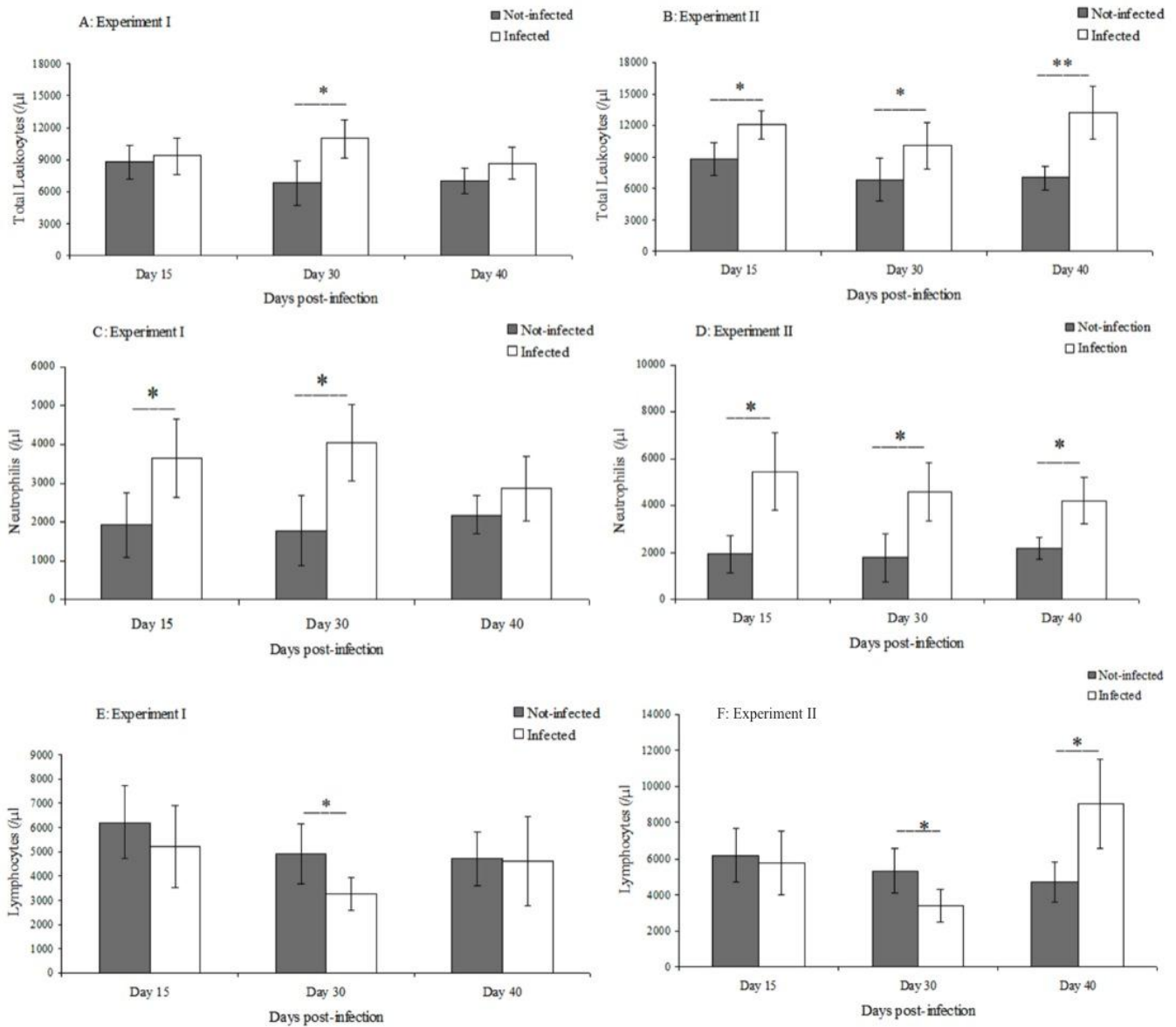


Fig. 2: Means and standard deviation of number of total leukocytes (A and B), neutrophils (C and D) and lymphocytes (E and F) from rats infected with *Sporothrix schenckii* when compared not-infected (* $p < 0.05$) at Experiment I and II. # Experiment I: rats infected subcutaneously; Experiment II: rats infected intraperitoneally.

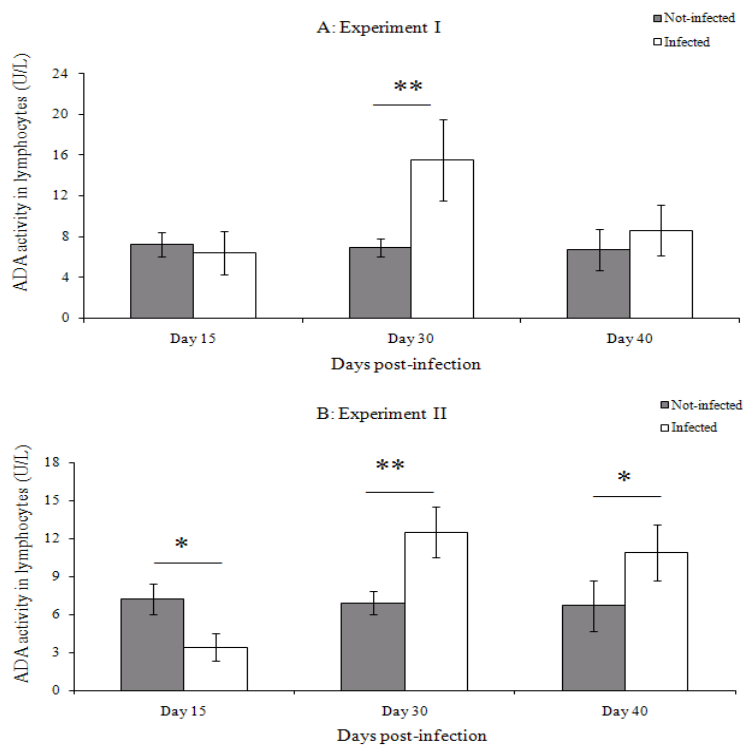


Fig. 3: Means and standard deviation of the adenosine deaminase activity in lymphocytes from rats infected with *Sporothrix schenckii* by subcutaneously (A: Experiment I) and intraperitoneally (B: Experiment II) way compared to not-infected. Same letters in the same graph are not statistically different among themselves in the Student t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

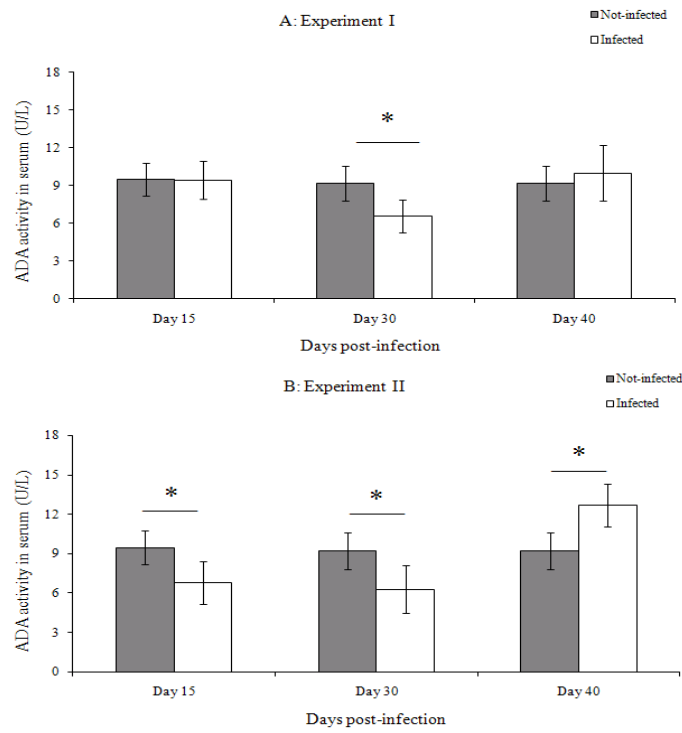


Fig. 4: Means and standard deviation of the adenosine deaminase activity in serum from rats infected with *Sporothrix schenckii* by subcutaneously (A: Experiment I) and intraperitoneally (B: Experiment II) way compared to not-infected. Same letters in the same graph are not statistically different among themselves in the Student t-test (* $p < 0.05$).

4 - CONCLUSÃO

- Pode-se concluir que a infecção pelo *S. schenckii* altera a atividade da ADA no soro e nos linfócitos:
 - A diminuição na atividade ADA nos linfócitos e no soro na infecção intraperitoneal na fase aguda, sugere-se altos níveis de adenosina extracelular promovendo uma ação antiinflamatória, na tentativa de diminuir a inflamação e a resposta imune nesta doença.
 - Com a cronicidade da doença houve um aumento na atividade da ADA nos linfócitos e no soro em ambos os experimentos, com uma consequente diminuição dos níveis de adenosina extracelular, levando a uma resposta inflamatória, ou seja, o organismo não consegue controlar a inflamação, sugerindo o envolvimento desta enzima na patogênese da esporotricose.

5 - REFERÊNCIAS

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

ALVES, S. H. et al. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p.523-525, 2010.

ANTONIOLI, L. Pharmacological modulation of adenosine system: Novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 14, p.566-74, 2008.

ATAKISI, E. et al. Adenosine deaminase and biochemical liver function tests in the dermatophytic cattle. **Bull Vet Inst Pulawy**, v. 50, p. 481-483, 2006.

BARROS, M.B.L. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.27, n.6, p.455-60, 2010.

BEYAZIT, Y. Serum adenosine deaminase activity as a predictor of disease severity in ulcerative colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, 2011. Doi:10.1016/j.crohns.2011.07.010.

BOTA, A. et al. Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BCR647) **Clinica Chimica Acta** , v. 306, p.79-89, 2001.

BOUMA, M. G. et al. Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. **Journal of Immunology**, v.153, n.9, p. 4159-68, 1994.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling-An overview. **Novartis Foundation Symposium**, v. 276, p.26-48, 2006.

BUSTAMANTE B & CAMPOS PE. Endemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.14, p.145-9, 2001.

CARLOS, I. Z. et al. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. **Mycopathologia**, v. 117, p. 139-144, 1992.

CASTILLO, C. A. et al. Modulation of A1 and A2a receptors in C6 glioma cells during hypoxia: Involvement of endogenous adenosine. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, 2315-29, 2008.

CONTI-DIAS, I.A. Epidemiology of sporotrichosis in latin america. **Mycopathologia**, v. 108, p. 113-116, 1989.

CRISTALLI, G. et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, p. 105-28, 2001.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulaor and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v.38, p. 107-125, 2001.

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

DESROSIERS, M.D. et al. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *J Immunol*, v. 179, p. 1884-1892, 2007.

DI VIRGILIO, F. Purinergic p2x7receptor: a pivotal role in inflammation and immunomodulation. **Drug Development Research**, v.45, p. 207-13, 1998.

DONADEL, K.W. et al. Esporotricose: revisão. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 68, n. 1, p. 45-51, 1993.

EREL, O. et al. Adenosine Deaminase Activities in Sera, Lymphocytes and Granulocytes in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 93, p.491-494, 1998.

FARIAS, M.R, et al. Esporotricose canina e felina. **Cães & Gatos**, v.66, p.30-38, 1997.

FREITAS, D.C; MIGLIANO, M.F; ZANI NETO. L. Esporotricose: observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. Catus*). **Revista de medicina veterinária**, v.5, p.601-604, 1956.

FREITAS, D.C. et al. Esporotricose em cães e Gatos. **Revista da faculdade de medicina veterinária de São Paulo**, v.7, p.381-387,1965.

FRÖDE T.S; MEDEIROS Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenam in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**, v. 10, p. 223-227,2001.

HASKO, G. et al. Adenosine Receptor Agonists Differentially Regulate IL-10, TNF- α , and Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Macrophages and in Endotoxemic Mice **Journal of Immunology**, v.157, n.10, p. 4634-4640, 1996.

HUFFNAGLE, G. B.; DEEP, G.S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Current Opinion in Microbiology.**, v. 6, p. 344-350, 2003.

ILLES, P.; RIBEIRO, A. Molecular physiology of p2 receptors in the central nervous System. **European Journal of Pharmacology**, v.483, p.5-17, 2004.

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

ISIK S. et al. Serum adenosine deaminase (ADA) levels in surgically treated hydatid cyst patients. **Scientific Research and Essays**. v. 6, n.14, p. 3101-3102, 2011.

KOBAYASHI, F. et al. Adenosine deaminase isoenzymes in liver disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 88, p. 266-271, 1993.

LACAZ, C.S. et al. Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. **Tratado de Micologia Médica** Sarvier, São Paulo, 1991.

LACAZ, C.S. et al. **Tratado de Micologia Médica**, Ed: Savier, São Paulo, 9ª ed., 2002, p.479-497.

LOPES, J.O. et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do rio grande do sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, V. 32, N. 5, P.541-545, 1999.

LOPES-BEZERRA, L. et al. Sporothrix schenckii and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, June, 2006.

DI VIRGILIO, F. Purinergic p2x7receptor: a pivotal role in inflammation and immunomodulation. **Drug Development Research**, v.45, p. 207–13, 1998.

LUTTIKHUIZEN, D.T. et al. Expression of p2 receptors at sites of chronic inflammation. **Cell and Tissue Research**, v. 317, p. 289–298, 2004.

MAIA, D.C. et al. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v.161, p. 11-19, 2006.

MAOR I. Adenosine deaminase activity in patients with Crohn's disease: Distinction between active and nonactive disease. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n.7, p. 598-602, 2011.

MARIMON, R.J. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3251-3256, 2006.

MELO FAF. Et al Diagnóstico da tuberculose pleural pela ADA, isolada ou combinada a outras variáveis, inclusive em HIV-positivos. **Folha Médica**. v.119, p. 9-21, 2000.

MILLS, J.H. et al. CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the center nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 9325-9330, 2008.

OCANA, I. et al. Adenosine deaminase activity in rheumatoid pleural effusion. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.47, n.5, p. 394-397, 1988.

PIMENTEL, VC. Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after neonatal hypoxia ischemia. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 8, p. 857-862, 2009.

PEREIRA, S.A. et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of feline medicine and surgery**, v.13, n.4, p. 220-223, 2011.

RAMOS-E-SILVA, M. Sporotrichosis. **Clinics Dermatology**, v. 25, p. 181-187, 2007.

RIPPON, J. SPOROTRICHOSIS,. IN: RIPONN, J. **Medical Mycology**. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia: w. B. Saunders company, p. 325-352, 1988.

ROMANI L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p. 1-23, 2004.

ROOK, G. Imunidade a vírus, bactérias e fungus. In: ROITT, I; BROSTOFF, J; MALE, D. **Imunologia**. 3^a ed. Editora manole ltda. Sao Paulo, p.15.1-15.2, 1994.

RUIZ, M.A. et al. Adenosine A (1) reseptor in cultures neurons from rat cerebral córtex: colocalization with adenosina deaminase. **Journal of Neurochemistry**. v. 75, p. 656-664, 2000.

SAJJADI, F.G. et al. Inhibition of TNF-ALPHA expression by adenosine:role of A3 adenosine receptors. **Journal of Immunology**, v.156, p. 3435-3442,1996.

SBOURY, A.A et al. Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration calorimetry. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p. 849-855,2003.

SCHENK, B.R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possible related to the sporotricha. **Bull Johns Hopkins Hospital**, p. 286-290, 1898.

SCHUBACH, A.; BARROS, M.B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 1, p. 129-133, 2008.

SCHUBACH, T.M. et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med. Assoc*, v. 224, p. 1623-1629, 2004.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. Jr.; GRIFFIN, C.E. *Muller & Kirk,s: Small Animal Dermatology*. 5. Ed. Philadelphia : W.B.Saunders, 1995. 1213p.

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

SHOHAM, S.; LEVITZ, S.M.. The immune response to fungal infections. **British Journal of Hematology**, n. 129, p. 569-582, 2005.

SINGH, L.S.; SHARMA, R. Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.204, p. 127-34, 2000.

SONG, Y. et al. Infant sporotrichosis in northeast china: a report of 15 cases. **International journal of dermatology**, v. 50, n. 5, p. 522-529, 2011.

TACHIBANA, T; MATSUYAMA, T; MITSUYAMA, M. Involvement of cd4+ t cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Medical mycology**, v.37, p.397-404, 1999.

TONIN, AA et al. Adenosine deaminase activity in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Research in Veterinary Science**, 2011. Doi:10.1016/j.rvsc.2011.01.013.

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

UENOTSUCHI, T. et al. Differential induction of th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. **International Immunology**, v.18, p. 1637–1646, 2006.

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

YOSHINO Y. et al. Cryptococcal Pleuritis Containing a High Level of Adenosine Deaminase in a Patient with AIDS: A Case Report. **Respiration**. v.79, p.153-156, 2009.

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