

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

**DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS E ATIVIDADE DAS
ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E
NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM CÃES INFECTADOS
COM *Rangelia vitalii***

TESE DOUTORADO

CARLOS BRENO VIANA PAIM

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS E ATIVIDADE DAS ENZIMAS QUE
HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM
CÃES INFECTADOS COM *Rangelia vitalii***

Carlos Breno Viana Paim

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

Orientadora: Prof.^a Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Paim, Carlos Breno Viana

Distúrbios hemostáticos e atividade das enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina em cães infectados com *Rangelia vitalii* / Carlos Breno Viana Paim.-2012.

64 p.; 30cm

Orientadora: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Coorientadora: Cinthia Melazzo Andrade Mazzanti

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2012

1. Rangeliose 2. megacariócitos 3. trombocitopenia 4. coagulação 5. ectonucleotidases I. Lopes, Sonia Terezinha dos Anjos II. Mazzanti, Cinthia Melazzo Andrade III. Título.

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

A Comissão examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Tese de Doutorado

**DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS E ATIVIDADE DAS ENZIMAS QUE
HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM
CÃES INFECTADOS COM *Rangelia vitalii***

elaborada por
Carlos Breno Viana Paim

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

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

Silvia Gonzalez Monteiro, Dr^a. (UFSM)

Alexandre Krause, Dr. (UFSM)

Marta Frescura Duarte, Dr^a. (ULBRA)

Angela Patrícia Medeiros Veiga, Dr^a(IFC)

Santa Maria, 17 de agosto de 2012

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha gratidão às pessoas que de alguma forma deram sua colaboração, estímulo e empenho para que esta tese se tornar-se uma realidade, sem correr algum risco do merecido reconhecimento, torna-se um desafio, pois foi uma obra construída por um conjunto de pessoas. Desta forma, dedico algumas palavras de agradecimento àqueles que contribuíram de forma direta ou indireta na sua elaboração.

À Deus por ter me dado a vida e por permitir que sinta sua presença através das pessoas, que me amparam nos momentos difíceis, me dão força para superar as dificuldades e me mostram o caminho a ser seguido.

A Universidade Federal de Santa Maria, de forma especial ao Programa de Pós-Graduação pelo incentivo institucional que possibilitou a realização de mais uma etapa em minha vida profissional.

A professora Sonia Lopes um misto de orientadora e amiga, um exemplo de profissionalismo, por compartilhar o seu conhecimento científico, acreditar e incentivar o meu crescimento profissional.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa do LACVET/UFSM, pela convivência, acolhimento, troca de experiências e participação, tão fundamental para realização deste trabalho.

Agradeço a minha família e a família de minha esposa por estarem sempre presentes fazendo parte de minhas conquistas.

Por fim, agradeço a minha esposa Cristina e minha filha Francine pelo estímulo, apoio, paciência, compreensão e presenças constantes, durante o desenvolvimento desta obra.

“... E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse Amor, nada seria... Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três; mas o maior destes é o Amor”.

São Paulo, Coríntios I, capítulo 13.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS E ATIVIDADE DAS ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM CÃES INFECTADOS COM *Rangelia vitalii*

AUTOR: Carlos Breno Viana Paim

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de agosto de 2012

O parasito *Rangelia vitalii* é o agente etiológico da rangelirose, uma enfermidade que cursa com uma grande variedade de sinais clínicos, incluindo desordens hemostáticas caracterizadas por sangramentos. Entretanto, as causas das alterações no processo hemostático nessa doença ainda não foram esclarecidas. O objetivo deste estudo foi avaliar os distúrbios hemostáticos através da produção de megacariócitos e contagem de plaquetas, a coagulação sanguínea, a atividade plaquetária e determinar a atividade das enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina em plaquetas de cães infectados experimentalmente com *R. vitalii*. Para este estudo, 12 cães foram separados em dois grupos: Grupo A foi composto por cinco cães saudáveis, e grupo B com sete cães infectados experimentalmente com *R. vitalii*. Após inoculação, os animais foram monitorados quanto à parasitemia por esfregaço sanguíneo. O parasito foi encontrado no interior de hemácias, neutrófilos e monócitos cinco dias pós-inoculação (PI). As coletas de sangue para a realização da contagem plaquetária, testes de coagulação e mensuração da agregação plaquetária foram realizadas nos dias 0, 10 e 20 PI. Nos dias 10 e 20 PI, após esse procedimento, os cães foram anestesiados para coleta do aspirado de medula óssea com a finalidade de avaliar a produção de megacariócitos. Para avaliar a atividade das ectonucleotidases e adenosina desaminase, as coletas de sangue foram realizadas nos dias 12 e 21 PI. Este estudo demonstrou redução ($P < 0,01$) no número de plaquetas entre o grupo infectado em relação ao controle. Os tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativado não apresentaram diferença significativa entre animais infectados e controles. Ocorreu aumento ($P < 0,01$) do número de megacariócitos no grupo infectado quando comparado com o controle. Foi observado uma diminuição ($P < 0,01$) na agregação plaquetária em cães infectados por *R. vitalii*. A hidrólise de ATP, ADP, AMP e desaminação da adenosina foram reduzidas ($P < 0,01$) no dia 12 PI quando comparadas com o grupo controle. No dia 21 PI, a atividade da adenosina desaminase manteve-se reduzida ($P < 0,01$), enquanto que ocorreu aumento ($P < 0,05$) na atividade da ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (NTPDase). A partir dos resultados, pode-se concluir que a rangelirose é responsável por grave trombocitopenia na fase aguda da infecção, a qual pode estar associada ao sequestro e/ou destruição imunomediada e, que alterações no sistema purinérgico contribuem para a ocorrência das desordens hemostáticas observadas na infecção pelo parasito *R. vitalii*.

Palavras – chave: rangelirose, megacariócitos, trombocitopenia, coagulação, adenosina, ectonucleotidases, adenosina desaminase.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Postgraduate Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS E ATIVIDADE DAS ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM CÃES INFECTADOS COM *Rangelia vitalii*

AUTHOR: Carlos Breno Viana Paim
ADVISER: Prof^a. Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes
Place and Date of Defense: Santa Maria, August 17th, 2012

The parasite *Rangelia vitalii* is the etiologic agent of rangellosis, a disease that leads to a wide variety of clinical signs, including hemostatic disorders characterized by bleeding. However, the causes of this process have not been established. The aim of this study was to evaluate the production of megakaryocytes, platelet count, clotting time, platelet activity and to determine the activity of enzymes that hydrolyze nucleotides and adenine nucleosides in platelets of dogs experimentally infected with *R. vitalii*. For this study, 12 dogs were separated in two groups: Group A was composed by five healthy dogs, and group B composed by seven dogs experimentally infected with *R. vitalii*. After inoculation, the animals were monitored by blood smears. The parasite was found within erythrocytes, neutrophils and monocytes five days post-inoculation (PI). Blood collection to perform platelet count, coagulation tests and measurement of platelet aggregation was performed on days 0, 10 and 20 PI. On days 10 and 20 PI, after this procedure, the dogs were anesthetized for collecting bone marrow samples to evaluate the production of megakaryocytes. To measure the activity of ectonucleotidases and adenosine deaminase, blood samples were collected on days 12 and 21 PI. Blood samples were stored in tubes containing EDTA to quantification of platelets, evaluation of platelet aggregation and measurement of enzymatic activity. The blood was stored in tubes containing citrate for realization of the clotting time. This study revealed a reduction ($P < 0.01$) of platelet numbers in the infected group when compared to control group. Prothrombin time and active partial thromboplastin time showed no significant difference between infected and control animals. There was an increase ($P < 0.01$) in the number of megakaryocytes in infected group when compared with control group. A reduction ($P < 0.01$) of platelet aggregation was observed in dogs infected with *R. vitalii*. The hydrolysis of ATP, ADP, AMP and deamination of adenosine decreased ($P < 0.01$) on day 12 PI. On day 21 PI, the activity of adenosine deaminase remained reduced ($P < 0.01$), whereas it was observed an increase ($P < 0.05$) in NTPDase levels. From these results, we can conclude that rangellosis is responsible for severe thrombocytopenia during the acute phase of infection, and this can be due to splenic sequestration and/or immune-mediated thrombocytopenia. Also, alterations in purinergic system contribute to the occurrence of hemostatic disorders observed in this disease.

Keywords: rangellosis, megakaryocytes, thrombocytopenia, coagulation, adenosine.

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Anatomia das plaquetas	18
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cão com presença de hemorragia na orelha, esfregaço de sangue periférico com a presença de <i>R. vitalii</i> em leucócitos.....	13
Figura 2 - Fluxo de cisalhamento gerando plaquetas nos sinusóides da medula óssea .	16
Figura 3 - Ligantes e receptores envolvidos na adesão plaquetária.....	19
Figura 4 - Cascata de coagulação. Via intrínseca e extrínseca.....	22
Figura 5 - Intestinos. Presença de hemorragia na mucosa e sangue digerido no colo. ..	24
Figura 6 - Via da sinalização purinérgica.....	25
Figura 7 - Principais enzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos.	27

LISTA DE REDUÇÕES

ADA – Adenosina desaminase
ADP – Difosfato de adenosina
AMP – Monofosfato de adenosina
ATP – Trifosfato de adenosina
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético dissódico
FvW – Fator de Von Willebrand
GP – Glicoproteínas
NTPDase – Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PI – Pós-infecção
R. vitalii – *Rangelia vitalii*
TP – Tempo de protrobina
TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativado
TXA₂ – Tromboxano A₂

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	Artigos	31
3.1	Artigos 1: Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with <i>Rangelia vitalii</i>	31
3.2	Artigo 2: Activities of ectonucleotidases and adenosine deaminase in platelets of dogs experimentally infected with <i>Rangelia vitalii</i>	39
4	DISCUSSÃO	46
5	CONCLUSÕES	50
5.1	Artigo 1	50
5.2	Artigo 2	50
6	IMPORTÂNCIA DO TRABALHO	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

“Nambiuvú”, “peste do sangue”, “febre amarela dos cães” são alguns dos nomes dados à rangelirose, uma doença causada pelo protozoário *Rangelia vitalii*, pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmorida. Esta enfermidade é exclusiva de cães e pouco descrita na literatura (PESTANA, 1910; CARINE & MACIEL, 1914; LORETTI & BARROS, 2005).

Um dos primeiros relatos dessa afecção ocorreu ainda no início do século passado, em 1908, e foi denominada “nambiuvú” ou febre amarela dos cães, sendo descritos os sinais clínicos de apatia, temperatura elevada, icterícia e hemorragias da pele e narinas nos animais infectados (CARINI, 1908). Em 1910, foi realizada a taxonomia do parasito, nomeando o agente causador como *Piroplasma vitalii* (PESTANA, 1910). Quatro anos mais tarde, ocorreu nova publicação sobre a doença, propondo que o piroplasma causador da doença passasse a ser chamado de *Rangelia vitalii* (CARINI & MACIEL, 1914).

Não existe consenso sobre o ciclo de vida e a taxonomia desse organismo até o momento. É descrito que seu ciclo de vida consiste de uma fase de desenvolvimento intraeritrocitária e outra extraeritrocitária, ocorrendo no citoplasma de células endoteliais (LORETTI & BARROS, 2005). Uma hipótese é de que o protozoário seja transmitido pelos carrapatos ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus* e/ou *Amblyomma aureolatum*, tendo como base infestações concomitantes encontradas em cães afetados e, especialmente, na estação do ano em que ocorre a patologia (LORETTI & BARROS, 2004). Porém, até o momento nada foi comprovado.

A filogenética da *R. vitalii* através da análise molecular, tendo como referência fragmentos 18S rRNA e da proteína de choque térmico 70 (hsp70), ampliada por PCR (reação em cadeia da polimerase), foi recentemente realizada em estudo de amostras de sangue provenientes de cinco cães suspeitos de infecção pelo parasito. A análise inferida resultou na descrição de uma nova sequência genética classificada dentro do gênero Babesia, e concluiu que o *R. vitalii* agente etiológico da rangelirose é uma espécie válida de piroplasma. Entretanto, ratifica a necessidade de novos estudos do gênero *Rangelia* (SOARES et al., 2011).

A rangelirose possui três formas clínicas: aguda, subaguda e crônica. A primeira manifesta sinais clínicos de apatia, anorexia, febre, fraqueza e mucosas pálidas que rapidamente se tornam ictéricas. Nesse caso, a morte ocorre entre três a cinco dias. A forma subaguda caracteriza-se por sinais semelhantes, associados a hemorragias pela boca, nariz e pele (Figura 1A); daí a denominação “nambiuvú”, palavra indígena que significa “orelha que sangra”. Já na forma crônica o animal apresenta apenas picos febris (KRAUSPENHAR et al., 2003; FIGHERA et al., 2010).

Os achados hematológicos incluem evidência de anemia hemolítica imunomediada, caracterizada por anemia regenerativa com esferocitose e eritrofagocitose (KRAUSPENHAR et al., 2003). Os animais infectados naturalmente apresentam anemia macrocítica hipocrômica, anisocitose e policromasia, leucócitos dentro dos limites fisiológicos e trombocitopenia (FRANÇA et al., 2010).

Tentativas de diagnóstico clínico da infecção pela *R. vitalii* têm sido fundamentadas no histórico, sinais clínicos, hemograma e resposta favorável à terapia (LORRETI & BARROS, 2004). O diagnóstico definitivo está firmado no esfregaço de sangue periférico onde o protozoário é observado nos macrófagos, neutrófilos (Figura 1B) e eritrócitos (FRANÇA et al., 2010) e na avaliação histopatológica, após a necropsia, onde o protozoário é encontrado nas células endoteliais dos capilares sanguíneos, linfonodos e medula óssea (KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010).

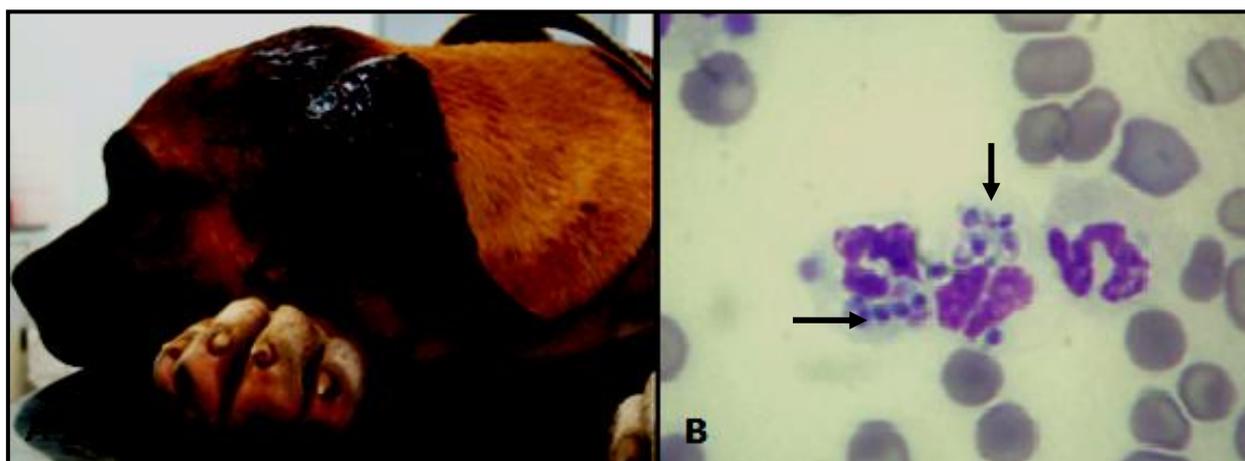


Figura 1 – Cão com presença de hemorragia na orelha (A), Esfregaço de sangue periférico com a presença de *R. vitalii* em leucócitos (seta)(B).

Na necropsia, os achados incluem mucosas pálidas a ictéricas, esplenomegalia, linfadenopatia, medula óssea vermelha preenchendo todo o canal medular. Nos pulmões observa-se acúmulo de líquido. Nos casos mais graves, ocorre presença de espuma amarela na traqueia e grandes brônquios. Todos os cães apresentam algum grau de hemorragia nas vísceras, mucosas e pele (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010).

Quando ocorre dano a um vaso sanguíneo, os componentes de sua matriz subendotelial são expostos ao sangue (GALE, 2011). A interação dos elementos sanguíneos com a parede vascular que sofre injúria media o processo hemostático (RUMBAUT & THIAGARAJAN, 2010). A hemostasia é o processo fisiológico que interrompe o sangramento no sítio do tecido danificado, enquanto mantém o fluxo sanguíneo normal em outros locais do sistema circulatório. Esse processo é ativado em segundos após a violação da integridade vascular e se mantém localizado. Inicialmente o coágulo sanguíneo é composto por plaquetas e fibrina (GALE, 2011). O dano causado à parede vascular leva à interação complexa de quatro componentes chaves: endotélio vascular, plaquetas, via de coagulação e, finalmente, a fibrinólise (EYRE & GAMLIN, 2010).

O Vaso sanguíneo é composto por três camadas: a camada mais interna composta por células endoteliais, uma membrana basal interna, o músculo liso e a membrana adventícia externamente (Van HINSBERGH, 2001). Somente uma única camada de células endoteliais cobre todo o sistema vascular. A estrutura dessas células e a sua integridade funcional são importantes na manutenção da parede do vaso e na função circulatória, entretanto o endotélio não é inerte. As células endoteliais são dinâmicas e desempenham função metabólica e sintética. Exercem significativas atividades autócrinas, parácrinas e endócrinas, influenciando as células musculares lisas, plaquetas e leucócitos periféricos (GALLEY & WEBSTER, 2004).

Esse endotélio vascular encontra-se estrategicamente localizado na interface entre o tecido e o sangue e, como tal, está em uma posição ideal para modular a função de vários órgãos. Em condições normais, proporciona uma superfície não trombogênica, impedindo que as plaquetas ou outras células sanguíneas se juntem, não ativando a coagulação sanguínea. Uma variedade de fatores anticoagulantes, fibrinolíticos e antiplaquetários são considerados como sendo responsáveis por essa condição (WU & THIAGARAJAN, 1996).

As células endoteliais vivas são necessárias para evitar a formação de trombos, mantendo, assim, a fluidez sanguínea. Isso só é possível porque o endotélio controla o extravasamento de líquidos, solutos, hormônios e macromoléculas, bem como plaquetas e células sanguíneas (Van HINSBERGH, 2011).

Quando o tecido subendotelial torna-se exposto em decorrência de uma perda na continuidade do endotélio, ou quando ocorre a expressão do fator tecidual por macrófagos ativados, a cascata de coagulação é desencadeada, ocorrendo também à ativação plaquetária. Em decorrência do início do processo de coagulação, a fibrina é formada, a qual em conjunto com as plaquetas ativadas forma o tampão plaquetário (Van HINSBERGH, 2011).

Plaquetas que participam ativamente do processo hemostático são fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariócitos, com um tempo de maturação de quatro a cinco dias (GEORGE, 2000). Os megacariócitos têm origem de células-tronco comprometidas na proliferação de linhagem de progenitores de megacariócitos localizados dentro da medula óssea (NUTT et al., 2005). Esses progenitores passam por um processo de proliferação e maturação, que finaliza com a liberação de partículas de seu citoplasma na corrente sanguínea. Tais partículas possuem características citoplasmáticas, estruturais e funcionais necessárias para realizar suas funções (PATEL et al., 2005). Um megacariócito pode ser classificado basicamente em três estágios de desenvolvimento: megacarioblasto, pró-megacariócito e megacariócito maduro. O megacarioblasto possui uma elevada proporção núcleo/citoplasma. Nessa fase o núcleo é compacto, lobulado, em forma de rim, o citoplasma é basofílico e seu diâmetro pode atingir o tamanho de 20µm. Na fase seguinte, pró-megacariócitos, grânulos azurófilos começam a ser observados e o núcleo adquire a forma de ferradura. A etapa final de seu desenvolvimento é a de um megacariócito granular (STIFF, 1990).

No megacariócito, a massa citoplasmática forma longas projeções para dentro da microcirculação da medula óssea. Isto, deve-se a essas células estarem localizadas próximas das paredes sinusoidais, o que facilita a saída de segmentos citoplasmáticos para a circulação (BEHNER & FORER, 1998). As projeções são chamadas de pró-plaquetas (ITALIANO & SHIVDSANI, 2003). A força de cisalhamento do sangue circulante irá causar a sua fragmentação (BEHNER & FORER, 1998). O megacariócito normal pode ser facilmente reconhecido ao ser aspirado da medula óssea devido às suas características morfológicas: tamanho grande, citoplasma abundante e núcleo grande (ZUCKER-FRANKLIN & PHILIPP, 2000). São as maiores células

hematopoiéticas que residem na medula óssea, o seu tamanho pode variar entre 20 e 100 μ m (LEVINE et al., 1982). Os megacariócitos constituem menos de 0,1% da população das células da medula óssea (STIFF, 1990).

A trombopoietina, uma citocina produzida predominantemente no fígado, é o principal hormônio envolvido no controle da diferenciação dos megacariócitos (KAUSHANSKY, 2005). O estágio final de seu desenvolvimento é caracterizado pela liberação de plaquetas para os espaços sinusoidais (Figura 2). Cada megacariócito pode produzir entre 1000 e 1500 plaquetas (STIFF, 1990).

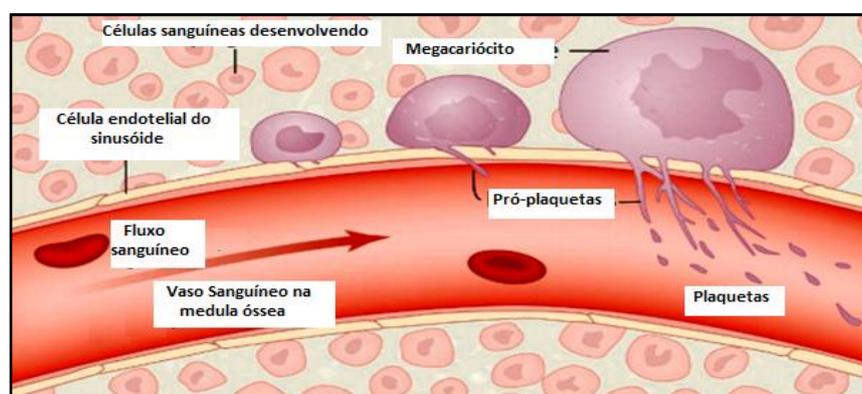


Figura 2 - Fluxo de cisalhamento gerando plaquetas nos sinusóides da medula óssea (adaptado de Geddis e Kaushansky, 2007)

A megacariopoiese e os megacariócitos podem ser afetados por inúmeras patologias, as quais podem causar disparidade de diferenciação, proliferação e maturação dessas células na medula óssea (SUN et al., 2000). Infecções por vírus, micoplasma, rickettsias e protozoários podem levar a lesão de medula com consequente redução na produção de megacariócitos e trombocitopenia (BAHNER et al., 1997).

As plaquetas foram descritas pela primeira vez por observações de Bizzozero no final de 1800. Esse pesquisador não só identificou as plaquetas como corpúsculos distintos dentro do sangue, mas também demonstrou que as plaquetas são responsáveis pela formação de trombos dentro de áreas danificadas do endotélio vascular (HARRISON, 2004). São as plaquetas os menores componentes do sangue, seu tamanho pode variar de 2 a 4 μ m e são consideradas fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, com um tempo de maturação de quatro a cinco dias. Seu período de

vida é de aproximadamente 10 dias na circulação periférica (JOHNS, 2004). Após esse tempo serão eliminadas por fagocitose mediada por macrófagos (KAUSHANSKY, 2008).

Com base em observação através de microscopia eletrônica, a plaqueta pode ser dividida em três zonas anatomicamente distintas: membrana, citoesqueleto e organelas (Quadro 1) (JOHNS, 2004). A membrana consiste de uma bicamada de fosfolípidos típica que contém glicoproteínas de membranas (WHITE & CLAWSON, 1980). Possui um sistema de canais abertos e invaginações, fazendo com que a superfície de contato com o ambiente plasmático seja igual ou superior ao de células com dimensões maiores (POLASEK, 2006). Também é na membrana que estão presentes receptores de glicoproteínas tais como, GPIb, GPIIb, GPIIIa, GPIX (JOHNS, 2004). O citoesqueleto é composto por microtúbulos e microfilamentos. Esses servem para manter a forma discoide deste fragmento celular e fornecer capacidade contrátil. Finalmente a terceira região anatômica, a das organelas, está constituída basicamente por grânulos (JOHNS, 2004).

Após ocorrer um dano à parede vascular, as plaquetas são submetidas a uma resposta em série, altamente regulada e funcional que inclui: adesão, ativação, reação de liberação e agregação decorrente da exposição à superfície pró-coagulante. O objetivo é a rápida formação de um tampão hemostático que obstrui o local do dano, prevenindo a perda de sangue (HARRISON, 2004).

As Plaquetas não interagem com a parede vascular intacta em circunstâncias fisiológicas. Entretanto, quando a parede vascular sofre injúria e o endotélio é rompido, ocorre uma rápida e complexa interação entre plaquetas circulantes e estrutura subendotelial exposta. Essa interação é mediada por vários receptores celulares posicionados sobre a superfície das plaquetas ou células endoteliais e proteínas adesivas como o fator de von Willebrand (FvW) e o fibrinogênio, resultando, finalmente, na adesão das plaquetas à parede vascular (LÖWENBERG et al, 2010).

O FvW é uma glicoproteína adesiva sintetizada pelos megacariócitos e células endoteliais, sendo continuamente secretada ou destinada para estocagem em organelas no endotélio, denominadas de corpos Weibel-Palade ou α -grânulos dos megacariócitos e plaquetas (RUGGERY, 1999). É por meio da ligação de colágeno, plaquetas e FvW, que este irá servir como uma molécula ponte entre as plaquetas e a matriz subendotelial, mediando a adesão de plaquetas à parede do vaso (WARE & HEISTAD, 1993). O FvW é o principal determinante proteico de adesão plaquetária, que inicialmente ocorre em forma de uma camada simples (GENTRY, 2000).

Quadro 1 – Anatomia das plaquetas

Zona	Estrutura primária	Componentes	Função
Membrana	Membrana plasmática	Mucopolissacarídeos para absorção de proteínas pró-coagulantes do plasma	Adesão e agregação plaquetária
	Membrana plaqueta	Microtúbulos e microfilamentos para estrutura e suporte	
	Submembrana	Receptor de glicoproteínas (GP)	
Citoesqueleto	Microfilamentos		Manter a forma e promover contração
Organelas	Alfa grânulos	Albumina Alfa-2 antiplasmina C1 inibidor de esterase Fator plaquetário 4 (PF4) PF4 baixa afinidade Beta tromboglobulina Fator de crescimento Fibrinogênio Fator V Fibronectina VWF antígeno	Adesão primária e secundária e agregação de plaquetas
	Corpos densos	ATP ADP Serotonina Cálcio	Fonte promotora de energia, adesão de plaquetas

(Adaptado de Johns, 2004).

O FvW facilita a adesão inicial através da ligação de glicoproteínas do complexo GPIb, GPIX e GPV (Figura 3), especialmente em condições elevadas de cisalhamento. Essas interações permitem que as plaquetas desacelerem o suficiente possibilitando que outras ligações possam ocorrer, resultando em uma aderência estática (BOLTON-MAGGS et al., 2006).

Após a adesão, as plaquetas são ativadas por inúmeros agonistas como difosfato de adenosina (ADP) e colágeno presente no local da injúria. Esses ativam as plaquetas, através da ligação com receptores específicos localizados sobre a sua membrana. A ocupação dos receptores leva a um aumento na concentração de cálcio intracelular (VARGA-SZABO et al., 2009). O aumento do cálcio livre leva a uma mudança na conformação desses fragmentos celulares (GRYGLEWSKI, 2008). A mudança na conformação faz com que as plaquetas passem de uma forma discóide para esférica

(GENTRY, 2000). Na fase inicial, são emitidos pseudópodes, logo em seguida, há um rearranjo das proteínas do seu citoesqueleto (actina e miosina), transformando esses fragmentos celulares normalmente discóides em esferas espiculadas e compactas com longas extensões dendríticas que facilitam sua adesão (GEORGE, 1990).

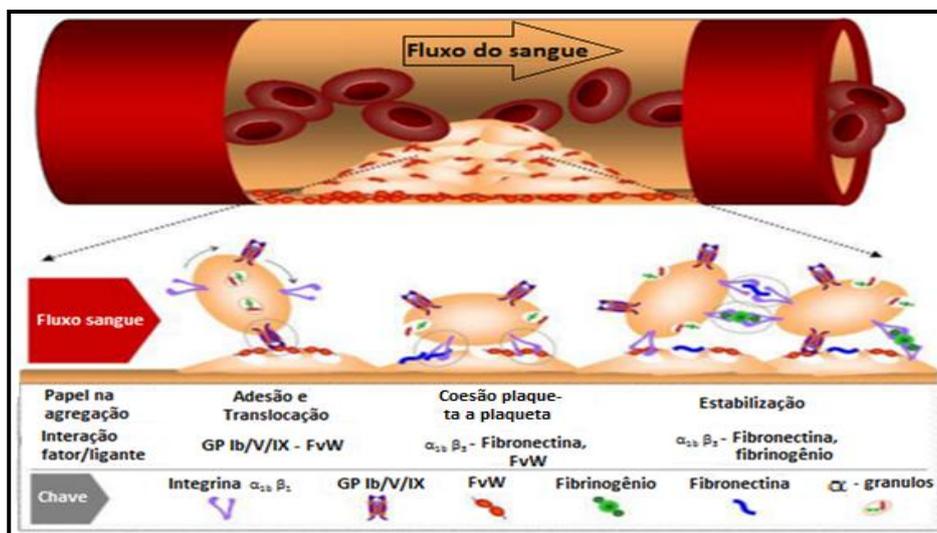


Figura 3 - Ligantes e receptores envolvidos na adesão plaquetária (adaptado de Jackson, 2007).

A ligação do FvW subendotelial ao complexo GPIb-V-IX localizado na membrana da plaqueta é insuficiente para mediar adesão estável. Entretanto, é fundamental para manter as plaquetas em contato íntimo com a superfície vascular danificada na fase inicial do processo hemostático. A adesão da plaqueta leva a sua ativação através de uma cascata metabólica interna (FURIE & FURIE, 2007).

Sinais intracelulares são desencadeados com objetivo de deslocar integrinas das plaquetas para um estado de alta afinidade e induzir a liberação de mediadores secundários como ADP e tromboxano A_2 (TXA_2). Esses agonistas em conjunto com a trombina contribuem para a ativação celular, estimulando receptores que juntamente com a proteína G, ocasionam eventos sinalizadores para induzir a ativação total (FURIE & FURIE, 2007). O ADP tem papel fundamental no processo de ativação, agindo sobre os receptores purinérgicos $P2X_1$, $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$, localizados na superfície das plaquetas, que agem sinergicamente na mudança da conformação, prolongando a ativação e tornando-a irreversível (GACHET, 2008).

O TXA_2 é produzido a partir do ácido araquidônico oriundo dos fosfolípídeos localizados na membrana plaquetária, através da fosfolipase A_2 citoplasmática. O ácido

araquidônico é metabolizado pela ciclo-oxigenase-1 (COX-1) daí para prostaglandina e TXA₂. Essa molécula atua sobre a ativação plaquetária, agindo sobre receptores de superfície específicos (PAPATHANASIOU et al, 2009). A fosfolipase A₂ é estimulada pelo aumento do cálcio intracelular (GRYGLEWSKI, 2008).

Durante a mudança de forma das plaquetas, os grânulos contidos em seu citoplasma são centralizados e seus conteúdos são liberados no lúmen do sistema de canais abertos, e posteriormente são liberados para o exterior, em um processo chamado de reação de secreção (GRYGLEWSKI, 2008). As plaquetas ativadas aumentam a secreção de substâncias biologicamente ativas armazenadas ou recém sintetizadas dentro dos seus grânulos (JENNINGS, 2009). Duas principais populações de grânulos estão evidentes em plaquetas não ativadas; eles diferem em estrutura, conteúdo, cinética de exocitose e função. Esses grânulos servem como vesículas secretórias, liberando seus componentes para o fluido extracelular. Eles também possuem a função de liberar moléculas para a membrana plasmática das plaquetas (RUMBAUT & THIAGARAJAN, 2010).

Os alfa-grânulos contêm a maioria dos fatores plaquetários envolvidos na hemostasia, incluindo grandes peptídeos, como trombosponina; p-selectina; fator plaquetário 4 e beta-tromboglobulina e fatores envolvidos na coagulação (Fator V, XI, XIII, fibrinogênio, FvW e cininogênios). Além disso, possuem moléculas de adesão que atuam na interação plaquetária com a parede vascular, tais como fibronectina e vitronectina. A membrana dos alfa-grânulos contém glicoproteínas como a GPIb, GPVI, GPIIb/IIIa e P-selectina que, durante a ativação, serão expressas sobre a membrana das plaquetas (MAYNARD et al., 2007).

Os grânulos densos possuem elevada concentração de cálcio, fosfato, nucleotídeos de adenina (trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP)) e serotonina. Também contêm moléculas de adesão: GPIb, GPIIb/IIIa e P-selectina. Durante a ativação plaquetária, as proteínas de membrana dos grânulos densos são incorporadas à membrana plasmática das plaquetas e o seu conteúdo é liberado para o meio extracelular. O ADP e o ATP contidos nos grânulos densos estão envolvidos primariamente no processo hemostático (CLEN et al., 2000).

A ativação plaquetária é um fator crítico para que ocorra a agregação das plaquetas, pois ADP, TXA₂ e fibras colágenas são mediadores potentes nesse processo. O TXA₂ promove agregação de plaquetas através da estimulação de proteínas-G acopladas aos receptores na membrana das plaquetas. A ligação TXA₂ aos seus

receptores leva a ativação da fosfolipase C que induz a expressão do complexo-G responsável por mediar agregação plaquetária (ARMSTRONG & GOLAN, 2007).

As plaquetas não devem somente ser hábeis para desenvolver contato adesivo, mas também sustentar esse contato com o local da injúria, o que ocorre através da formação de agregados (BRASS et al., 2005). A agregação envolve a interação plaqueta a plaqueta e é necessária para que ocorra uma hemostasia efetiva após a adesão inicial de plaquetas ao local da injúria (VARGA-SZABO et al., 2009). A principal molécula envolvida na agregação é a proteína de membrana do complexo GPIIb-IIIa. Essa é uma integrina presente em grande quantidade nas plaquetas, tanto sobre sua membrana plasmática como nos alfa-grânulos (NIIYA et al., 1987). A ativação plaquetária através de seus agonistas induz mudança na conformação do complexo GPIIb-IIIa, o qual torna-se competente para ligar-se ao fibrinogênio (MA et al., 2007). Assim, a agregação de uma plaqueta a outra ocorre através de uma ponte da molécula de fibrinogênio com o complexo GPIIb-IIIa funcional (ARMSTRONG & GOLAN, 2001). Finalmente, a membrana da plaqueta transforma-se em uma superfície rica em fosfolípidos sobre ativação. Essa superfície carregada negativamente é necessária para montagem da ativação dos fatores de coagulação que, por sua vez, é requerida para geração de trombina. As plaquetas formam uma forte ligação entre o processo de hemostasia primária e secundária (LÖWENBERG & MEIJERS, 2010).

A hemostasia primária refere-se à agregação e formação do tampão plaquetário. As plaquetas são ativadas e, como resultado, elas se aderem ao local da injúria vascular, e também uma a outra tamponando a área com dano, como descrito anteriormente. Já a hemostasia secundária refere-se à deposição de fibrina insolúvel, a qual é gerada através da cascata proteolítica da coagulação (Figura 4). A fibrina insolúvel forma uma malha que é incorporada em torno do tampão de plaquetas. Esta malha serve para fortalecer e estabilizar o coágulo sanguíneo. Esses dois processos ocorrem simultaneamente e estão mecanicamente interligados (GALE, 2011).

O objetivo da hemostasia secundária (cascata de coagulação) é a formação de um coágulo de fibrina estável no local da injúria vascular. Essa cascata de coagulação é uma sequência de eventos enzimáticos. A maioria dos fatores que participam dessa cascata é sintetizada no fígado e circula como pró-enzimas que são proteoliticamente clivadas, tornando-se ativadas por fatores ativados que as precedem na cascata de coagulação. Essa reação de ativação é catalítica, ampliando o processo rapidamente e

gerando grande quantidade de fibrina no local da lesão (ARMSTRONG & GOLAN, 2001).

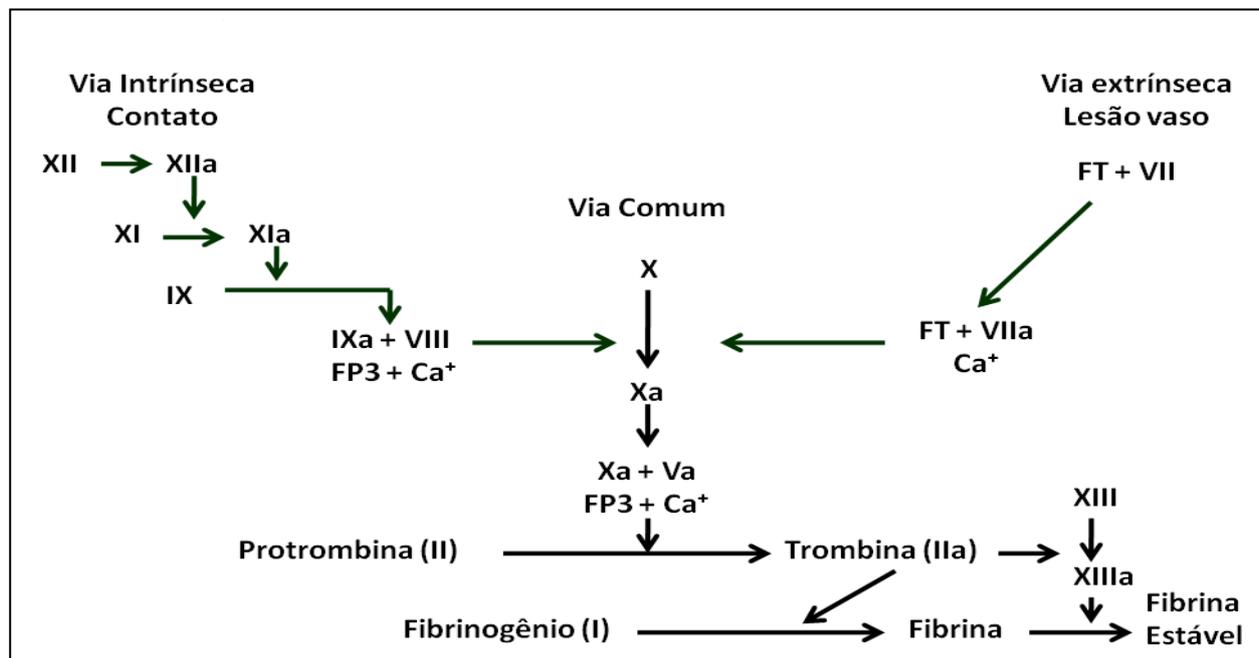


Figura 4 - Cascata de coagulação. Via intrínseca e extrínseca (adaptado de Adams e Bird, 2009).

O objetivo da hemostasia secundária (cascata de coagulação) é a formação de um coágulo de fibrina estável no local da injúria vascular. Essa cascata de coagulação é uma sequência de eventos enzimáticos. A maioria dos fatores que participam dessa cascata é sintetizada no fígado e circula como pró-enzimas que são proteoliticamente clivadas, tornando-se ativadas por fatores ativados que as precedem na cascata de coagulação. Essa reação de ativação é catalítica, ampliando o processo rapidamente e gerando grande quantidade de fibrina no local da lesão (ARMSTRONG & GOLAN, 2001).

A cascata de coagulação tem sido dividida tradicionalmente em via extrínseca e intrínseca, tal divisão é resultado de testes “*in vitro*” (ARMSTRONG & GOLAN, 2001). Entretanto, essa descrição clássica tem sido largamente ignorada, já que não está relacionada com o processo que ocorre “*in vivo*”. Contudo, esse conceito permanece ainda útil para o entendimento da ação de anticoagulantes e dos estudos da cascata da coagulação (CURRY & PIERCE, 2007).

A via intrínseca é ativada “*in vitro*” pelo fator XII (fator de Hageman), enquanto que a via extrínseca é iniciada “*in vivo*” pelo fator tecidual, uma lipoproteína expressa por leucócitos ativados, células endoteliais ativadas, células musculares lisas subendoteliais e fibroblastos subendoteliais no local da injúria vascular (ARMSTRONG & GOLAN, 2001).

A hemostasia é um processo dividido em: (a) hemostasia primária que começa imediatamente após a lesão endotelial e é caracterizada por vasoconstrição, adesão e agregação plaquetária, resultando na formação de um tampão de plaquetas, (b) hemostasia secundária ou coagulação e (c) fibrinólise (KRIZ et al., 2009). Esse processo é mantido através do equilíbrio entre coagulação e fibrinólise (HUANG et al., 2001). Cães infectados pela *R. vitalii* apresentam alterações no seu processo hemostático, podendo desenvolver doença hemorrágica, semelhante à observada em casos de coagulação intravascular disseminada (FIGHERA, 2007).

Em estudo de 10 casos de infecção por *R. vitalii* no período de 2000 a 2003, foi observada presença de petéquias generalizadas nas mucosas oral e vaginal, sangramento nasal e cavidade oral, hematêmese, melena, diarreia com sangue. Sangramento persistente ou intermitente a partir da pele das pontas e margens das orelhas e sangramento profuso após venopunção (LORETI & BARROS, 2005).

Estudo retrospectivo realizado em 35 cães submetidos à necropsia no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria demonstrou que todos os animais apresentaram algum grau de hemorragia, vista com maior frequência nas vísceras do que na mucosa e pele. Hemorragia intestinal foi um achado frequente, sendo em forma de petéquias e sufusões (Figura 5). Em muitos casos o conteúdo intestinal estava tingido de sangue. Estrias de sangue foram observadas nas fezes ou estas eram pastosas ou negras. Hemorragias foram observadas no pulmão, coração, mucosas, tegumento, pâncreas, omento, bexiga, cavidade nasal, estômago, rim, vesícula biliar e adrenal (FIGHERA et al., 2010).

Em cães infectados naturalmente com *R. vitalii* foi observada diminuição acentuada no número de plaquetas em todos os animais (FRANÇA, 2010). Afecção na medula óssea, trombocitopenia imunomediada, coagulopatia de consumo e sequestro esplênico são algumas das alterações responsáveis pela redução do número de plaquetas circulantes (WONG & THOMAS, 1998). Portanto, justifica-se a contagem de megacariócitos para descartar lesão de medula óssea, como causa de redução no número de plaquetas observada no sangue periférico de cães com rangeliose. Assim

como, a realização de provas de coagulação, mensurando de TP e TTPa para indicar a presença de coagulopatia de consumo.



Figura 5 - Intestinos. Presença de hemorragia na mucosa e sangue digerido no colo (fonte Fighera et al., 2010).

As plaquetas com seus agentes autócrinos ATP e ADP liberados de seus grânulos desempenham importante papel na hemostasia. Vários receptores e agonistas de plaquetas são reconhecidos por induzir ativação plaquetária, incluindo a ligação de nucleotídeos extracelulares aos receptores purinérgicos de superfície celular do tipo P2 de duas famílias distintas estruturalmente, P2X e P2Y (YEGUTKIN, 2008). P2X é ativado por ATP, enquanto P2Y pode ser ativado por ATP e ADP (GACHET, 2008). Assim, a hidrólise de nucleotídeos é fator importante no processo hemostático.

Drury e Györgi, em 1929, descreveram as potentes ações de nucleotídeos, nucleosídeos e adenosina sobre o coração e vasos sanguíneos. Em 1970, foi apresentada evidência do ATP como um neurotransmissor em nervos que inervam o intestino e, em 1972, o termo purinérgico foi descrito e a hipótese de neurotransmissão purinérgica foi proposta por Burnstock. A partir daí, trabalhos apresentaram os nucleotídeos extracelulares como moduladores do sistema endócrino, exócrino, dos mecanismos vasculares e hemostáticos, músculos esqueléticos e das células imunes e inflamatórias (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004).

Nucleosídeos são glicosilaminas provenientes da ligação de um núcleo base a um açúcar. Como exemplos dessas moléculas pode-se citar: a citidina, uridina, adenosina, guanosina, timidina e inosina. Os nucleosídeos quando fosforilados por quinases

específicas originam nucleotídeos (ATKINSON et al., 2006). Os nucleotídeos extracelulares de adenina e seu nucleosídeo derivado, adenosina, são importantes moléculas sinalizadoras que possuem a capacidade de influenciar a reatividade plaquetária (BURNSTOCK, 2002).

A exposição de plaquetas à baixa concentração de ADP resulta em uma agregação inicial reversível sem liberação dos produtos dos grânulos. Concentrações elevadas de ADP induzem liberação dos constituintes dos grânulos e síntese de prostaglandinas, originando uma resposta bifásica característica, com agregação irreversível (RUMBAUT & THIAGARAJAN, 2010). O ATP em baixa concentração aumenta a produção de colágeno, TxA2 e trombina, induzindo agregação plaquetária (SOSLAU YOUNGPRAPAKORN, 1997). Entretanto, quando em alta concentração é inibidor da agregação promovida pelo ADP, provavelmente pelo ATP ser hidrolisado a adenosina (BIRK et al., 2002). A Adenosina, produto da degradação de nucleotídeo da adenina, desempenha funções dependentes do tipo de receptor em cada tecido (BOROWIEC et al., 2006).

A sinalização purinérgica é dependente das interações entre nucleotídeos extracelulares e receptores de superfície celular (Figura 6) que pertencem a duas famílias estruturalmente distintas: os receptores acoplados a proteína G (P2Y) e os receptores ligados a canais de cálcio (P2X) (FREDHOLM et al., 1994).

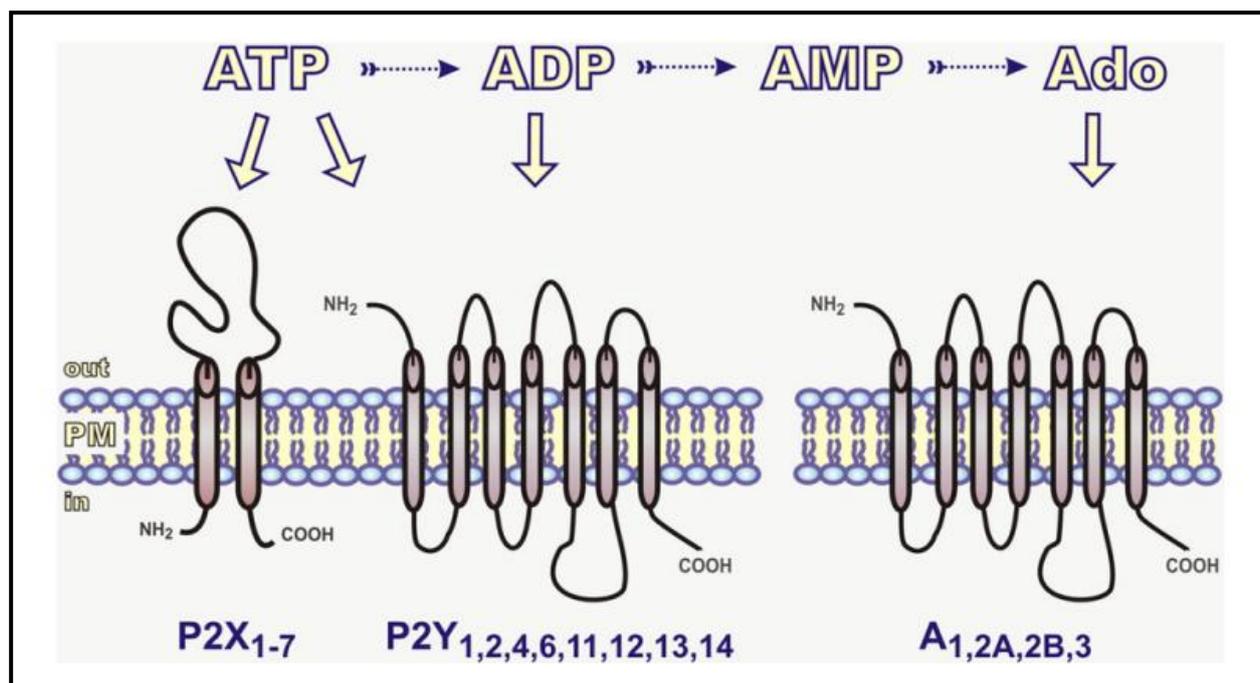


Figura 6 - Via da sinalização purinérgica (adaptado de Yegutkin, 2008).

Os receptores P2X compreendem sete subtipos de receptores (P2X₁ até P2X₇). Já os P2Y são classificados em uma subfamília de receptores que estão predominantemente ligados à proteína Gq (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁) e, por consequência, são ativados pela fosfolipase C e, em outra subfamília, acoplados a nGi (P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄), que inibem a adenil ciclase (YEGUTKIN, 2008).

Quatro subtipos de receptores P1 foram clonados, chamados A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Todos receptores P1 de adenosina são proteínas transmembranas, acopladas à proteína G (BURNSTOCK, 2006).

A sinalização purinérgica envolve três componentes essenciais: uma fonte de nucleotídeos de adenina, receptores específicos, através dos quais os nucleotídeos exercem seus efeitos, e as enzimas ectonucleotidases, responsáveis pelo controle dos níveis dessas moléculas no meio extracelular (ROBSON et al., 2001). Nucleotídeos extracelulares modulam uma multiplicidade de funções teciduais incluindo: desenvolvimento, fluxo sanguíneo, inflamação e resposta imune. Esta sinalização via nucleotídeos extracelulares tem sido reconhecida por muitas décadas como um mecanismo de sinalização entre células (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004).

A concentração desses nucleotídeos extracelulares, e as respostas celulares a essas moléculas, devem ser reguladas após exercerem seus efeitos, com a finalidade de manter níveis fisiológicos. Isso é realizado por um complexo multienzimático chamado de “ectonucleotidases” (Figura 7) (ZIMMERMANN, 2001). No esquema principal de hidrólise de nucleotídeos estão incluídos papéis para as enzimas, E-NTPDase (ecto-nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase), 5'-ecto-nucleotidase e adenosina desaminase (ADA) (YEGUTKIN, 2008).

O “pool” de nucleotídeos na corrente circulatória é gerado a partir de diferentes fontes, incluindo exocitose de plaquetas, cisalhamento de hemácias, ativação das células (plaquetas e células endoteliais) e lise celular (MORRELL et al., 2005). Como um aspecto comum as ectonucleotidases, é sua capacidade de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfato, com exceção do monofosfato, requerendo concentração milimolar de Ca²⁺ e Mg²⁺ para atividade máxima (PEARSON & CARLETON, 1980).

No sangue, a hidrólise desses nucleotídeos é regulada pela cascata das ectonucleotidases, que é iniciada pela NTPDase e finalizada pela 5'-nucleotidase. Os produtos da hidrólise dessas enzimas (ATP e ADP) irão ativar seletivamente receptores P1 e P2 (COLGAN, et al., 2006). A família da NTPDase é composta de oito tipos de enzimas, NTPDase 1, 2, 3 e 8 que estão tipicamente localizadas na superfície celular,

com sua face catalítica expressa extracelularmente. Já as NTPDase 5 e 6 exibem localização intracelular, enquanto que as NTPDase 4 e 7 estão situadas intracelularmente (MALISZEWSKI et al., 1994).

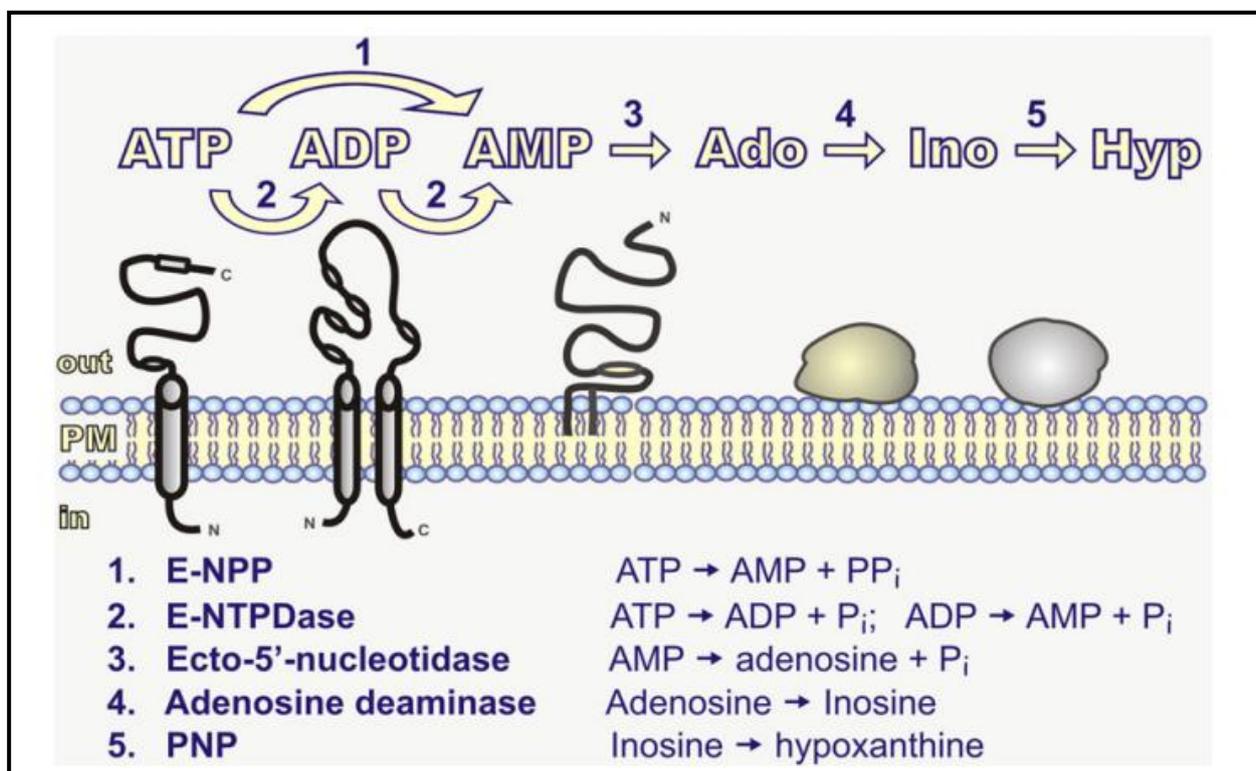


Figura 7 - Principais enzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos (adaptado de Yegutkin, 2008).

No sangue, a hidrólise desses nucleotídeos é regulada pela cascata das ectonucleotidases, que é iniciada pela NTPDase e finalizada pela 5'-nucleotidase. Os produtos da hidrólise dessas enzimas (ATP e ADP) irão ativar seletivamente receptores P1 e P2 (COLGAN, et al., 2006). A família da NTPDase é composta de oito tipos de enzimas, NTPDase 1, 2, 3 e 8 que estão tipicamente localizadas na superfície celular, com sua face catalítica expressa extracelularmente. Já as NTPDase 5 e 6 exibem localização intracelular, enquanto que as NTPDase 4 e 7 estão situadas intracelularmente (MALISZEWSKI et al., 1994).

A NTPDase 1 é a principal ectonucleotidase na superfície vascular (ENJYOJI, et al., 1999). A NTPDase 2 está associada à vasculatura (ZIMMERMANN, 1999). A reação

fosfohidrolítica da NTPDase 1 está limitada à resposta de ativação plaquetária, que é dependente da liberação parácrina de ADP e ativação de receptor purinérgico específico (ROBSON, et al, 2000).

A cascata das ectonucleotidases que é iniciada pelas NTPDase é finalizada pela 5'-ectonucleotidase, que hidrolisa nucleotídeos monofosfato (AMP), em adenosina (ZIMMERMANN, 1992). Tem sido demonstrado que a adenosina inibe a agregação plaquetária através do estímulo da geração de AMPc (HILLARY et al., 2011).

A 5'-nucleotidase é uma enzima glicosil fosfatidilinositol (PGI) que está fixada na superfície da membrana celular. É a principal responsável pela formação de adenosina extracelular e a subsequente ativação de receptores de adenosina (P1)(ZIMMERMANN, 1999). Está presente nos rins, fígado, encéfalo, pulmão, endotélio vascular, plaquetas e células do sistema imune (COLGAN, 2006).

A adenosina desaminase, referida como ADA, é uma importante enzima desaminante, pertencente ao metabolismo purinérgico, que converte de forma irreversível adenosina em inosina. Essa enzima tem sido encontrada em uma grande variedade de tecidos de mamíferos, como intestino, timo, tecidos linfóides e não linfóides (CRISTALLI et al., 2001).

A adenosina media uma grande variedade de funções fisiológicas através da ativação de pelo menos quatro receptores de superfície celular denominados A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Cada subtipo de receptor apresenta uma propriedade ligante única e um modelo distinto de expressão tecidual (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Esse composto é altamente ativo possuindo uma variedade de efeitos sobre os tecidos, incluindo músculo cardíaco, artérias coronárias, células musculares lisas, plaquetas, estando também envolvido em reações imunes e inflamatórias. Através da interação com os receptores A_{2A} , a adenosina tem função de inibir a agregação plaquetária (MACKENZIE et al., 1994).

Estudos com as enzimas NTPDase, 5'-ectonucleotidase e ADA demonstraram que essas enzimas estão envolvidas no mecanismo de trombo-regulação em várias patologias (SCHETINGER et al., 2007). Na esclerose múltipla (SPANVELLO et al., 2010) e tripanossomíase (OLIVEIRA et al., 2011), alterações nessas enzimas contribuem para a ocorrência de diáteses hemorrágicas.

Portanto, justifica-se a contagem de megacariócitos para descartar lesão de medula óssea, como causa de redução no número de plaquetas observada no sangue periférico de cães com rangeliose e a realização de provas de coagulação, mensurando

de TP e TTPa para indicar a presença de coagulopatia de consumo. Assim como, mensurar a atividade das enzimas que participam da sinalização purinérgica, que são responsáveis por modular os efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeo é importante para determinar a agregação das plaquetas em animais infectados por *R. vitalii*. Tal avaliação não está ainda descrita na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os distúrbios de hemostasia em cães infectados experimentalmente com *Rangelia vitalii*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Artigo 1:

- Quantificar o número de plaquetas circulantes em cães infectados com *R. vitalii*;
- Realizar a contagem de megacariócitos da medula óssea em cães infectados com *R. vitalii*;
- Avaliar a agregação plaquetária em cães infectados com *R. vitalii*;
- Avaliar parâmetros de coagulação sanguínea tais como tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) em cães infectados com *R. vitalii*;

2.2.2 Artigo 2:

- Verificar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-ectonucleotidase e adenosina desaminase nas plaquetas em cães infectados com *R. vitalii*.

3 ARTIGOS

Os resultados desta tese estão sob a forma de dois artigos científicos. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se nos artigos científicos.

3.1 Artigos 1:

**Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with
*Rangelia vitalii***

Carlos Breno V. Paim, Francine C. Paim, Aleksandro S. Da Silva, Raqueli T. França, Marcio M. Costa, Claudio A. M. Leal, João F. Soares, Marcelo R. C. Schetinger, Alexandre Mazzanti, Cinthia M. Mazzanti, Silvia G. Monteiro, Sonia T. A. Lopes.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*

Carlos Breno Paim^{a,*}, Francine C. Paim^a, Aleksandro S. Da Silva^b, Raqueli T. França^a, Marcio M. Costa^a, Claudio A.M. Leal^c, João F. Soares^d, Marcelo B. Labruna^d, Maria R.C. Schetinger^c, Alexandre Mazzanti^a, Cinthia M. Mazzanti^a, Silvia G. Monteiro^b, Sonia T.A. Lopes^c

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

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

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

^d Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, Universidade de São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2011

Received in revised form

26 September 2011

Accepted 28 September 2011

Keywords:

Rangeliosis

Thrombocytopenia

Coagulation time

Megakaryocytes

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the platelet count, coagulation time and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii* during the acute phase of the disease. For this study, 12 young dogs (females) were used, separated in two groups. Group A (uninfected control) was composed by healthy dogs ($n=5$), and group B consisted of *R. vitalii*-infected animals ($n=7$). After being inoculated with *R. vitalii*-infected blood, animals were monitored by blood smear examinations, which showed intra-erythrocytic forms of the parasite five days post-inoculation (PI). Blood samples were collected on days 0, 10, 20 and 30 PI. The material collected was placed in tubes containing EDTA for quantification of platelets, citrate anticoagulant platelet aggregation, and measuring the clotting time. Right after blood collection on days 10 and 20 PI, dogs were anesthetized for collecting bone marrow samples. A significant reduction ($P<0.01$) of the number of platelets was observed in *R. vitalii*-infected blood, when compared with uninfected dogs on days 10 and 20 PI. Additionally, macro-platelets were observed only in infected dogs. Prothrombin time and activated partial thromboplastin time did not differ between infected and uninfected dogs. The megakaryocyte count increased ($P<0.01$) significantly in infected dogs when compared with uninfected ones on days 10 and 20 PI. Platelet aggregation decreased ($P<0.01$) significantly in infected dogs in comparison to the control on days 10 and 20 PI. Therefore, rangeliosis in dogs causes a severe thrombocytopenia during the acute phase of infection. This platelets reduction probably occurred due to splenic sequestration and/or immune-mediated thrombocytopenia.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In Brazil, “nambiuvú” (bloody ears), “peste do sangue” (bleeding plague) or “febre amarela dos cães” (yellow fever of dogs) are some of the local names of rangeliosis, a

disease caused by the protozoan *Rangelia vitalii*, an Apicomplexan of the order Piroplasmorida (Pestana, 1910; Carini and Maciel, 1914; Carini, 1948; Loretto and Barros, 2005). Tentative clinical diagnosis of the infection by *R. vitalii* has relied on clinical history, clinical signs, hemogram, and favorable response to therapy (Loretto and Barros, 2004), followed by definitive diagnosis based on peripheral blood smears (França et al., 2010) and post-mortem histopathology (Figuera et al., 2010). More recently, molecular diagnostic of rangeliosis was successfully achieved on naturally infected dogs (Soares et al., 2011). These authors

* Corresponding author at: Departamento de Pequenos Animais da UFSM, Faixa de Camobi, Km 9, Campus Universitário, Hospital Veterinário, Sala 103, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8814.

E-mail address: brenopaim@ufsm.br (C.B. Paim).

showed that *R. vitalii* is phylogenetically close-related to species of the *Babesia* spp. sensu stricto group of piroplasmas (Soares et al., 2011).

Rangeliosis commonly affects dogs from rural and suburban areas in southern Brazil, where it is suspected to be transmitted by the ticks *Rhipicephalus sanguineus* or/and *Amblyomma aureolatum* (Loretti and Barros, 2004). The disease is characterized by anemia, jaundice, fever, splenomegaly, lymphadenopathy, hemorrhages along the gastrointestinal tract, and persistent bleeding through the tips of the pinnae, external surface of the ears, nose, and oral cavity (Pestana, 1910; Loretti and Barros, 2005).

In dogs infected by *R. vitalii* the hemorrhage disorder may occur as part of an acute gastroenteritis, also in the form of petechiae and mucosal suffusion, and less often as localized cutaneous or ear/nasal bleeding (Loretti and Barros, 2004; Figuera et al., 2010). In such cases, the only common finding has been a decrease in the amount of circulating platelets (França et al., 2010). Because of the severity of bleeding observed in some dogs with rangeliosis, it is possible that thrombocytopenia plus other mechanisms are involved in this process that leads to hemorrhagic diathesis. However, currently there are no laboratory data that could validate or even contradict these hypotheses (Figuera et al., 2010). Information related to coagulopathies resulting from *R. vitalii* infection is not fully understood. In this sense, the aim of this study was to evaluate the platelet count, coagulation time and platelet activity in dogs experimentally infected with *R. vitalii*, during the acute phase of the disease.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

Twelve female mongrel dogs (6–12 months old) were used in this study as previously described (Da Silva et al., 2011). The animals, previously determined by molecular tests to be free of *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., and *Ehrlichia* spp. infection (Da Silva et al., 2011), were inoculated with *R. vitalii* ($n=7$) or served as uninfected controls ($n=5$). The *R. vitalii* strain used in this study was obtained from a naturally infected dog in Santa Maria, state of Rio Grande do Sul, Brazil (Soares et al., 2011). A fresh blood sample of the infected animal was inoculated (2 mL through the jugular vein) in another dog (Dog 13: male, five months old) for maintenance of the isolate in the laboratory.

The present study was approved by the Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), protocol number 15/2010.

2.2. Estimation of parasitemia

After inoculation, blood smears were prepared every two days from day 1 to day 30 post-inoculation (PI). Peripheral blood smears were prepared with blood obtained from the tip of the ear of each dog, through the use of hypodermic needle. Smears were Romanovsky stained and examined

under 1000 \times magnification by optical microscopy, as previously described (Da Silva et al., 2011).

2.3. Sample collection

Dogs were contained manually for blood collection via the jugular vein (7 mL) on days 0, 10, 20 and 30 PI. The material collected was placed into tubes containing citrate anticoagulant (EDTA) for quantification of platelets, sodium citrate for platelet aggregation, and measuring of the clotting time. On days 10 and 20 PI, dogs were anesthetized [ketamine (0.08 mL kg⁻¹) and xylazine (0.05 mL kg⁻¹)] for collecting bone marrow samples from the right humerus. The material was distributed on slides, and stained by Romanovsky for megakaryocyte count.

2.4. Platelets, coagulation time, and count of megakaryocytes

Platelet counts were performed using a Neubauer chamber filled with total blood diluted in ammonium oxalate (1%). Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were determined by commercial kits (Labtest). Megakaryocytes were evaluated accordingly to the methodology described by Harvey (2001) at 100 \times magnification. All techniques were performed in duplicate.

2.5. Platelet aggregation

Platelet aggregation was assessed by the method of Born and Cross (1963) using turbidimetric measurement with a Chrono-log optical aggregometer, with AGGRO/LINK® Model 810-CA software for Windows version 5.1. Preparation of platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of blood during 20 min at 1700 \times g; preparation of platelet poor plasma (PPP) was performed by centrifugation at 6500 \times g for 30 min. After calibration of the aggregometer, the data of the animals, concerning the assays and reagents, were entered into a computer coupled to the equipment. Aggregation was measured at 37 °C and expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline at 5 min after the addition of the agonist ADP at concentrations of 5 and 10 μ M, with PPP as a reference. Results were expressed as percentage of aggregation.

2.6. Treatment

On day 21 PI, the remaining *R. vitalii*-infected dogs received a single intramuscular dose of diminazene aceturate (Da Silva et al., 2011). On day 30 PI, PCR was performed to prove the efficacy of treatment. The experiment was concluded 30 days PI, since this was the experimental period previously approved by the committee of ethics and animal welfare for the present study.

2.7. Statistical analysis

The results were subjected to analysis of variance (ANOVA), the means compared by Student's *t*-test. Values

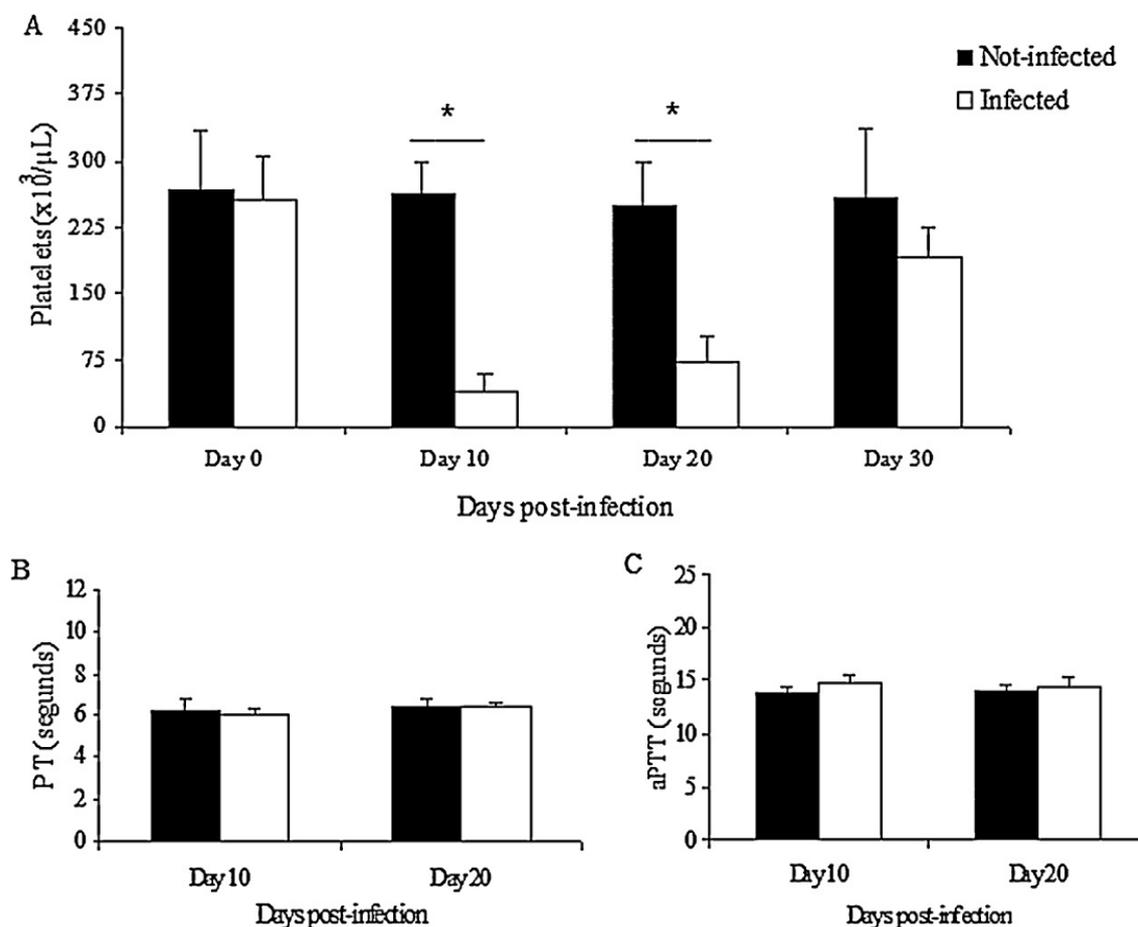


Fig. 1. Platelet count in dogs infected by *Rangelia vitalii*, and in uninfected dogs on days 0, 10, 20 and 30 post-inoculation (A). Prothrombin time (PT—B) and activated partial thromboplastin time (aPTT—C) on days 10 and 20 in *R. vitalii*-infected dogs. *Significant difference between groups ($P < 0.01$). The columns are represented as mean \pm standard deviation (t -test).

with probability (P) less than 5% were considered statistically different.

3. Results

3.1. Parasitemia and clinical signs

Blood smears showing intracellular forms of *R. vitalii* were first observed at 5 days PI. The parasitemia increased progressively until the 10th day PI, when a peak of parasitemia occurred; then the number of parasites significantly decreased, as previously detailed by Da Silva et al. (2011). The parasite was found within erythrocytes, leukocytes and the extracellular milieu. During the peak of parasitaemia, it was observed appetite loss, hyperthermia, and increased cardiac frequency in all infected animals. Apathy ($n = 7$ dogs), anorexia ($n = 5$), weight loss ($n = 3$), and diarrhea ($n = 2$) were observed in infected animals since day 17 PI. All infected dogs showed severe anemia at days 10 and 20 PI, as previously described (Da Silva et al., 2011).

3.2. Platelet count and coagulation time

A significant ($P < 0.01$) reduction in the number of platelets was observed in *R. vitalii*-infected dogs, when compared with uninfected dogs on days 10 and 20 PI (Fig. 1A). The presence of macro-platelets was observed in infected dogs. On the other hand, when clotting time was compared between infected and uninfected groups, PT and aPTT did not differ ($P > 0.05$) significantly (Fig. 1B and C).

3.3. Megakaryocyte count

The megakaryocyte count increased ($P < 0.01$) significantly in infected dogs when compared to uninfected dogs at days 10 and 20 PI (Fig. 2). At day 20 PI, infected dogs showed a 55% increase in the megakaryocyte count, when compared to 10 days PI. This increase may be associated with the small increase of platelets at 20 days PI, compared with 10 days PI in infected animals (Fig. 1).

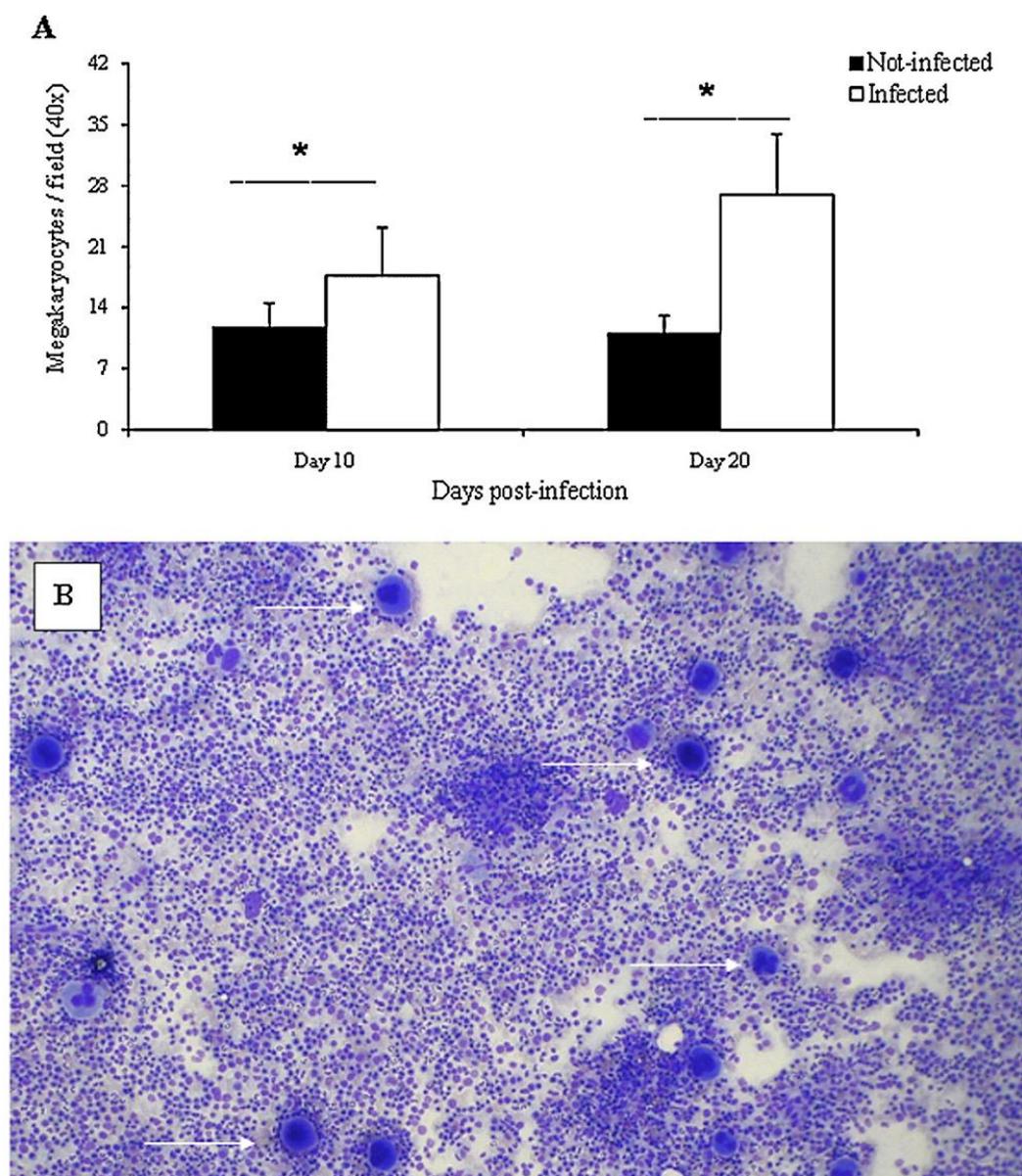


Fig. 2. Megakaryocyte count in dogs infected by *R. vitalii* when compared to uninfected dogs on days 10 and 20 post-inoculation (A). Illustration of megakaryocytes stained with Romanovsky, 400 \times magnification of one *R. vitalii*-infected dog (B). *Significant difference between groups ($P < 0.01$). The columns are represented as mean \pm standard deviation (t -test).

3.4. Platelet aggregation

Platelet aggregation decreased ($P < 0.01$) significantly in infected dogs, in comparison to the uninfected dogs on days 10 and 20 PI (Fig. 3). When we used the concentration of 5 μ M, a 70% and 79.4% reduction in platelet activity was observed at days 10 and 20 PI, respectively. A similar result was observed using concentrations of 10 μ M, because the reduction of platelet activity was 69.3% (day 10 PI) and 81.5% (day 20 PI) in *R. vitalii*-infected dogs.

3.5. Treatment

Treatment with diminazene aceturate resulted in clearing of the parasite from the canine blood, as shown by negative results by both PCR and examination of blood smears; additionally, clinical signs resolved (Da Silva et al., 2011). There was no significant ($P > 0.05$) difference in the platelet count between groups at day 30 PI (Fig. 1A), which corresponded to nine days post treatment.

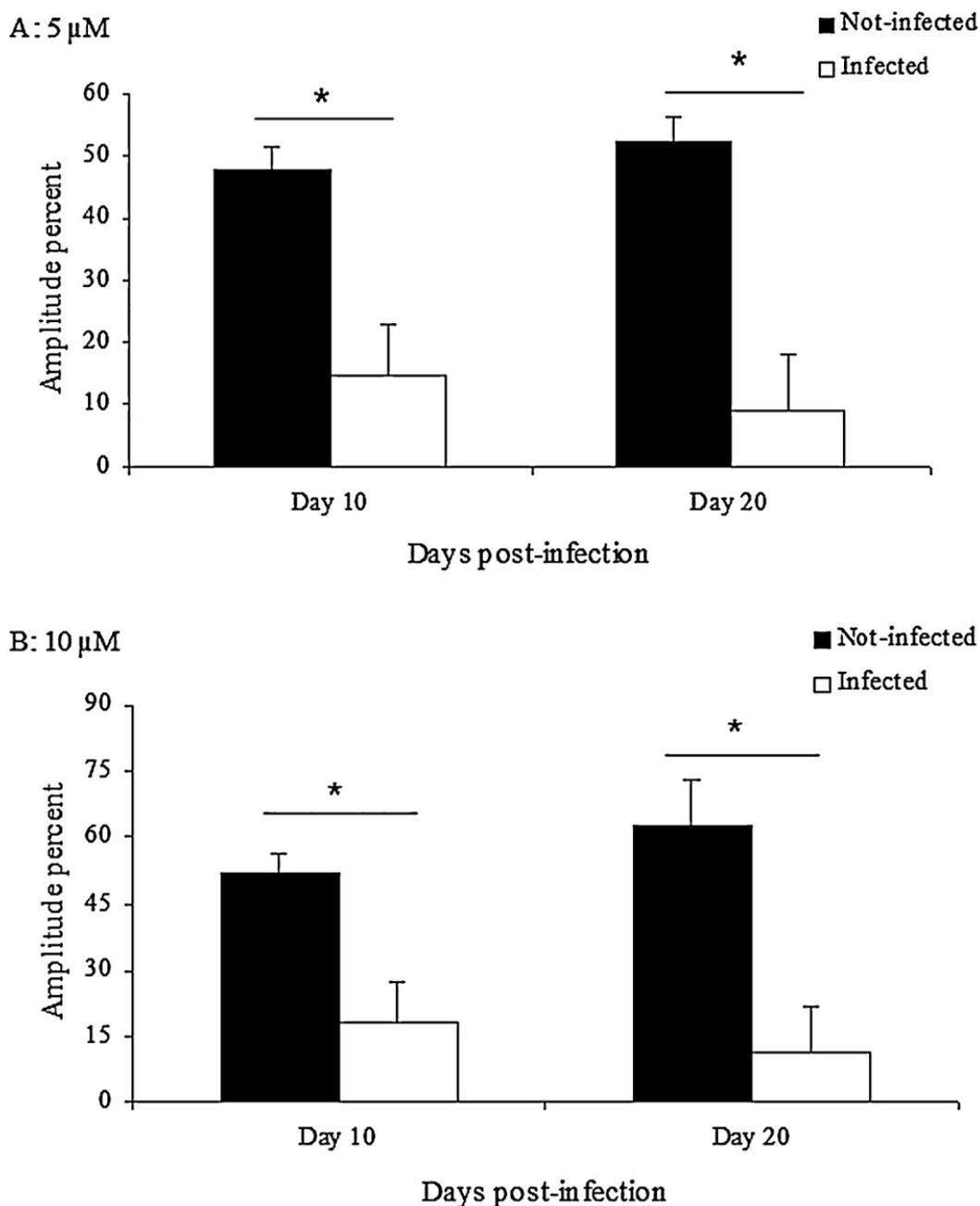


Fig. 3. Platelet aggregation on days 10 and 20 post-inoculation in dogs infected with *R. vitalii* compared to uninfected dogs, using adenosine diphosphate (ADP) as an agonist at concentration of 5 and 10 μM. The results are expressed as percentage of aggregation. The columns are represented as mean ± standard deviation (* $P < 0.01$; t -test).

4. Discussion

In this study, thrombocytopenia and reduction in platelet activity were observed in dogs experimentally infected with *R. vitalii*, similarly to what has been reported in natural infections by this agent (Krauspenhar et al., 2003; França et al., 2010). Changes in coagulation have been

commonly observed in infection by hemoparasites, such as in canine babesiosis (Gopegui et al., 2007; Schettters et al., 2009), ehrlichiosis (Smith et al., 1975; Borjesson et al., 2001) and trypanosomosis (De La Rue et al., 1997). Bone marrow damage, reduced platelet survival, immunomediated thrombocytopenia, disseminated intravascular coagulation (DIC), and splenic sequestration are some of

these alterations responsible for the reduction of circulating platelets (Smith et al., 1975; Jenkins and Facer, 1985; Stephen, 1986; Wong and Thomas, 1998; Bommer et al., 2008).

Dogs naturally infected by *R. vitalii* have presented with mild to severe thrombocytopenia (Krauspenhar et al., 2003; Figuera et al., 2010; França et al., 2010). In the present study, thrombocytopenia was severe on days 10 ($39,000 \mu\text{L}^{-1}$) and 20 PI ($71,000 \mu\text{L}^{-1}$), since the physiological limits of platelets in dogs may vary between 200,000 and $500,000 \mu\text{L}^{-1}$ (Feldman et al., 2000). An adequate number of platelets are necessary to repair minimum vascular lesions and initiate the formation of thrombus (Daly, 2011). According to Vanderschueren et al. (2000), when the number of platelets is below $100,000 \mu\text{L}^{-1}$, the risk of bleeding (a clinical feature common in rangelirosis) is increased (Figuera et al., 2010; França et al., 2010).

During *R. vitalii* infection, hemorrhagic processes have been observed in the form of mucosal petechiae and suffusion, and also as bleeding from the ears and/or nose (Pestana, 1910; Loretti and Barros, 2005; França et al., 2010; Figuera et al., 2010), as well as in the viscera and mucous (Figuera et al., 2010). In this study we observed that besides reducing the number of platelets, the *R. vitalii* infection also reduced platelet aggregation, which may further contribute to the bleeding. Probably, the reduction of platelet activity occurred as a result of decreased release of adenosine diphosphate (ADP) for platelets (Oliveira et al., 2011), an essential nucleotide in the coagulation cascade.

One of the causes of decreases in platelet count is the immune-mediated thrombocytopenia, which is mediated by antibodies that accelerate the destruction of these cells (Figuera et al., 2010), although the lysis of platelets is particularly splenic through the reticulum-endothelial system (Taghizadeh, 2008). The immune-mediated thrombocytopenia is one of the most important immune disorders in dogs infected by hemoparasites (Feldman et al., 2000; Provan et al., 2010). The occurrence of splenomegaly in dogs infected with *R. vitalii* has been frequently observed at necropsy (Figuera et al., 2010; Da Silva et al., 2011). It is known that approximately 1/3 of the circulating platelets of healthy dogs are sequestered at the spleen (Karparkin, 1983), therefore the occurrence of splenomegaly leads to an increase in the number of hematopoietic cells sequestered in this organ, resulting in anemia, neutropenia and thrombocytopenia (Jacobs et al., 1998), a common finding in rangelirosis. For this reason, we believe that splenomegaly is a supporting factor that contributed to the drastic decrease in platelet count observed in dogs infected with *R. vitalii*.

The megakaryocytes are specialized hematopoietic cells that reside in bone marrow and are precursors of platelets, which play a crucial role in hemostasis. Megakaryocytes can be affected by a number of diseases that can cause disparity in its proliferation, differentiation and maturation (Sun et al., 2006). In the present study, the possibility of trouble in the production of platelets by bone marrow damage as consequence of rangelirosis was discarded, since the number of megakaryocytes in infected dogs with severe thrombocytopenia was significantly increased. The presence of macro-platelets also confirms the bone marrow

response in the face of thrombocytopenia. Then, bone marrow increased production to compensate the reduction of circulating platelets, as a result of parasitism.

In this study we found severe thrombocytopenia, but no significant changes in PT and aPTT. In infections by *Babesia canis*, reduction of aPTT associated with thrombocytopenia in dogs were observed (Rafaj et al., 2009), and in another study conducted in Spain, PT and aPTT were prolonged in 9 of 45 dogs with babesiosis (Gopegui et al., 2007). In dogs and cats infected with *Trypanosoma evansi*, prolonged PT and aPTT were observed (De La Rue et al., 1997; Da Silva et al., 2010). When clotting time is prolonged, DIC may occur (Levi et al., 2009), a condition not observed during the acute phase of infection by *R. vitalii*.

Based on the present results, we can conclude that severe thrombocytopenia occurs in dogs acutely infected by *R. vitalii*. Clotting time was not influenced by the disease. We discarded damage at bone marrow as a cause of thrombocytopenia, since we observed the increase in the number of megakaryocytes. Platelets reduction during rangelirosis is probably related to splenic sequestration and/or immune-mediated thrombocytopenia.

References

- Bommer, N.X., Shaw, D.J., Milne, E.M., Ridyard, A.E., 2008. Platelet distribution width and mean platelet volume in the interpretation of thrombocytopenia in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 49, 518–524.
- Borjesson, D.L., Simon, S.L., Tablin, F., Barthold, S.W., 2001. Thrombocytopenia in a mouse model of human granulocytic ehrlichiosis. *J. Infect. Dis.* 184, 1475–1479.
- Born, G.V.R., Cross, M.J., 1963. The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 95, 168–178.
- Carini, A., Maciel, J., 1914. Sobre a molestia dos cães, chamada nambiuvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalii*). *An. Paulo Med. Cir.* 3, 65–71.
- Carini, A., 1948. Sobre o ciclo de desenvolvimento exo-eritrocitário de um piroplasma do cão. *Arq. Biol.* 285, 49–52.
- Daly, M.E., 2011. Determinants of platelet count in humans. *Haematologica* 96, 10–13.
- Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Costa, M.M., Zanette, R.A., Oliveira, C.B., Gressler, L.T., Otto, M.A., Santurio, J.M., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2010. Clotting disturbances in *Trypanosoma evansi*-infected cats. *Comp. Clin. Pathol.* 19, 207–210.
- Da Silva, A.S., França, R.T., Costa, M.M., Paim, C.B., Paim, F.C., Dornelles, G.L., Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Exp. Parasitol.* 128, 347–352.
- De La Rue, M., Silva, R.A.M.S., Carli, G.A., 1997. Coagulopathy in dogs infected with *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. *Parasitol. Dia* 21, 92–96.
- Feldman, B.V., Zinkl, J.G., Jain, N.C., 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1344 pp.
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.G., Irogoyen, L.F., Barros, C.S.C., 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológico da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985–2009). *Pesq. Vet. Bras.* 30, 974–987.
- França, R.T., Silva, A.S., Paim, F.C., Costa, M.M., Soares, J.F., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T.A., 2010. *Rangelia vitalii* in dog in southern Brazil. *Comp. Clin. Pathol.* 19, 383–387.
- Gopegui, R.R., Peñanba, B., Goicoa, A., Espada, Y., Fidalgo, L.E., Espino, L., 2007. Clinical-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. *Vet. J.* 174, 129–132.
- Harvey, J.W., 2001. *Atlas of Veterinary Hematology Blood and Bone Marrow of Domestic Animals*. Saunders, Florida.
- Jacobs, G., Calvert, C., Kaufman, A., 1998. Neutropenia and thrombocytopenia in three dogs treated with anticonvulsants. *J. Am. Vet. Assoc.* 212, 681–684.
- Jenkins, G.C., Facer, C.A., 1985. Hematology of African Trypanosomiasis. In: Tizardi, I. (Ed.), *Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 13–44.

Author's personal copy

C.B. Paim et al. / *Veterinary Parasitology* 185 (2012) 131–137

137

- Karpatkin, S., 1983. The spleen and thrombocytopenia. *Clin. Hematol.* 12, 591–604.
- Krauspenhar, C., Figuera, R.A., Graça, D.L., 2003. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. *Medvop – Rev. Cien. Med. Vet. Peq. An. Estim.* 1, 273–281.
- Levi, M., Toh, C.H., Thachil, J., 2009. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. *Br. J. Haematol.* 145, 24–33.
- Loretti, A.P., Barros, S.S., 2004. Parasitismo por *Rangelia vitali* em cães (nambiuú, peste de sangue) – uma revisão crítica sobre o assunto. *Arq. Inst. Biol.* 71, 101–131.
- Loretti, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 193–213.
- Oliveira, C.B., Da Silva, A.S., Vargasa, L.B., Bitencourt, P.E.R., Souza, V.C.G., Costa, M.M., Leal, C.A.M., Moretto, M.B., Leal, D.B.R., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2011. Activities of adenine nucleotide and nucleoside degradation enzymes in platelets of rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* 178, 9–14.
- Pestana, B.R., 1910. O Nambiuú (nota preliminar). *Rev. Soc. Cient. São Paulo* 5, 14–17.
- Provan, D., Stasi, R., Newland, A.C., Blanchette, V.S., Bolton-Maggs, P., Bussel, J.B., Chong, B.H., Cines, D.B., Gernsheimer, T.B., Godeau, B., Grainger, J., Hunt, L.B.J., Imbach, P.A., Lyons, G., McMillian, R., Rodeghiero, F., Sanz, M.A., Tarantino, M., Watson, S., Young, J., Kuter, D.J., 2010. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 115, 168–186.
- Rafaj, R.B., Matijatko, V., Kis, I., Kučer, N., Živičnjak, T., Lemo, N., Žvorc, Z., Brkljačić, M., Mrijak, V., 2009. Alterations in some blood coagulation parameters in naturally occurring cases of canine babesiosis. *Acta Vet. Hung.* 57, 295–304.
- Schettlers, T.P.M., Kleuskens, J.A.G.M., Van De Crommert, J., De Leeuw, P.W.J., Finizio, A.L., Gorenflot, A., 2009. Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.* 162, 7–15.
- Smith, R.D., Ristic, M., Huxsoll, D.L., Baylor, R.A., 1975. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. *Infect. Immunol.* 11, 1216–1221.
- Soares, J.F., Giroto, A., Brandão, P.E., França, R.T., Da Silva, A.S., Lopes, S.T.A., Labruna, M.B., 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet. Parasitol.* 180, 203–208.
- Stephen, L.E., 1986. *Trypanosomiasis: A Veterinary Perspective*. Pergamon Press, New York, 533 pp.
- Sun, L., Hwang, W.Y.K., Awa, S.E., 2006. Biological characteristics of megakaryocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1821–1826.
- Taghizadeh, M., 2008. An update on immune-mediated thrombocytopenia. *Labmedicine* 39, 51–54.
- Vanderschueren, S., De Weerd, A., Malbrain, M., Vankersschaever, D., Frans, E., Wilmer, A., Bobbaers, H., 2000. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit. Care Med.* 28, 1871–1876.
- Wong, S.J., Thomas, J.A., 1998. Cytoplasmic, nuclear and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1959–1963.

3.2 Artigo 2

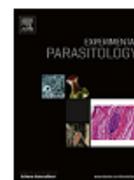
Activities of ectonucleotidases and adenosine deaminase in platelets of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*

Carlos Breno V. Paim, Aleksandro S. Da Silva, Francine C. Paim, Raqueli T. França, Marcio M. Costa, Viviane C. G. Souza, Victor C. Pimentel, Jeandre A. Jaques, Cinthia M. Mazzanti, Daniela B. R. Leal, Silvia G. Monteiro, Maria Rosa C. Schetinger, Sonia T. A. Lopes.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Research Brief

Activities of ectonucleotidases and adenosine deaminase in platelets of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*

Carlos Breno V. Paim^{a,*}, Aleksandro S. Da Silva^b, Francine C. Paim^a, Raqueli T. França^a, Marcio M. Costa^a, Viviane C.G. Souza^c, Victor C. Pimentel^c, Jeandre A. Jaques^b, Cinthia M. Mazzanti^a, Daniela B.R. Leal^b, Silvia G. Monteiro^b, Maria Rosa C. Schetinger^c, Sonia T.A. Lopes^c

^a Department of Small Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil^b Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil^c Department of Clinical Analysis and Toxicology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2012

Received in revised form 8 March 2012

Accepted 12 March 2012

Available online 27 March 2012

Keywords:

Rangeliosis

ATP

ADP

AMP

Adenosine

ABSTRACT

Rangeliosis is a disease which affects dogs in Brazil, caused by a piroplasm known as *Rangelia vitalii*. This disease causes a lot of clinico-pathological features, including the coagulation disorders associated with bleeding. The cause of these changes has not yet been determined. Considering the association of purinergic system and hemostasis this study aimed to evaluate the activity of enzymes that hydrolyze ATP, ADP and AMP; and deamination of adenosine in platelets from dogs experimentally infected with *R. vitalii*. For this study, 12 healthy young dogs (females) were used, separated in two groups. Group A ($n = 5$) were uninfected controls, and group B were experimentally infected with *R. vitalii* ($n = 7$). After being inoculated with *R. vitalii*-infected blood, animals were monitored by blood smear examinations, which showed intra-erythrocytic forms of the parasite after five days post-inoculation (PI). Blood samples were collected to quantitate and separate platelets (Day 0, 12 and 21 PI) and to measure the enzymatic activities (Day 12 and 21 PI). The activity of NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) was measured in platelets. A reduction ($P < 0.01$) in the number of platelets was observed in *R. vitalii*-infected blood at Days 12 and 21 PI. At Day 12 PI, a reduction ($P < 0.01$) in the hydrolysis of ATP, ADP and AMP, and deamination of adenosine was observed in dogs infected with *R. vitalii*. At Day 21 PI the ADA activity remained decreased, unlike the activity of NTPDase which increased ($P < 0.05$). Based on these results we can conclude that ATP, ADP and AMP hydrolysis and adenosine deamination were altered in platelets of *R. vitalii*-infected dogs. Considering the importance of the purinergic system in hemostasis, it is believed that those changes contribute to the coagulation disorders and bleeding observed in *R. vitalii*-infected dogs and discussed in this manuscript.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

"Nambiuvú" (bloody ears) is a disease that commonly affects dogs from rural and suburban areas in Brazil and is believed to be transmitted by ticks. It is found in animals infected with an organism described originally in 1910 as a piroplasm, and known as *Rangelia vitalii* (Pestana, 1910; Loretti and Barros, 2005). In areas where this disease is common, such as in the State of Rio Grande do Sul (RS), southern Brazil, infected dogs have high fever, anaemia, jaundice and hemorrhages (França et al., 2010; Figuera et al., 2010). A recent genetic study showed that *R. vitalii* is phylogenet-

ically closely related to species of the *Babesia* spp. sensu stricto group of piroplasms (Soares et al., 2011).

Bleeding is a common clinicopathologic finding in dogs infected by the protozoan *R. vitalii* (Pestana, 1910; Loretti and Barros, 2005; Figuera et al., 2010; França et al., 2010; Paim et al., 2012). The morphology of the hemorrhages denotes a deficit in primary hemostasis, and the two possible mechanisms responsible for bleeding disorders are thrombocytopeny and/or vasculopathy (Figuera et al., 2010). A decrease in the number and platelet aggregation was observed in animals experimentally infected with *R. vitalii* (Paim et al., 2012). Coagulation disorders are alterations related to the number of platelets or to the coagulation cascade that consequently interfere in the coagulation process (Jain, 1993). Platelets have important homeostatic functions, through the mechanisms of adhesion, aggregation and subsequent formation of clots at sites of vascular damage (Harker, 1997; Marcus et al., 2003; Wagner and Burger, 2003).

* Corresponding author. Address: Hospital de Clínicas Veterinárias da UFSM, Faixa de Camobi, Km 9, Campus Universitário, Hospital Veterinário, Sala 103, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8814.

E-mail address: brenopaim@ufsm.br (C.B.V. Paim).

The involvement of the purinergic system in coagulopathies is well documented (Schetinger et al., 2007; Gödecke, 2008). This system consists of enzymes, receptors, nucleotides and nucleosides (Gödecke, 2008; Yegutkin, 2008). The adenine nucleotides ATP, ADP and AMP, and the nucleoside adenosine are reported to regulate and modulate many cellular functions, including platelet aggregation (Gödecke, 2008). ADP is primarily responsible for promoting this aggregation (Woulfe et al., 2001), while adenosine is a potent inhibitor (Anfossi et al., 2002). The role of ATP in coagulation disorders is unclear. However, it is known that hydrolysis of ATP and ADP to AMP and/or adenosine inhibits platelet aggregation, as a consequence of increased extracellular adenosine concentration (Birk et al., 2002).

The concentration of extracellular nucleotides and nucleosides are strictly regulated by the action of enzymes such as ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase (E-NPPs), 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) (Yegutkin, 2008). E-NTPDases are responsible for the hydrolysis of ATP and ADP into AMP; and the nucleotide AMP is hydrolyzed by 5'-nucleotidase into adenosine. Subsequently, adenosine undergoes deamination into inosine by ADA activity (Yegutkin, 2008). These enzymes play an important role in maintaining proper vascular hemostasis and thrombogenesis (Atkinson et al., 2006).

The hemorrhagic diathesis in rangeliosis is commonly described in cases of natural and experimental infection (Loretti and Barros, 2005; França et al., 2010; Figuera et al., 2010; Paim et al., 2012), but its causes are not fully understood. Since adenine nucleotides are important regulators of platelet aggregation, responsible for trombo-regulation and homeostasis, the aim of this study was to evaluate experimentally infected dogs the activity of enzymes that modulate ATP, ADP, AMP and adenosine concentration in platelets and its extracellular environment.

2. Material and methods

2.1. Animals

Twelve female mongrel dogs (6–12 months old) were used in this study as previously described (Da Silva et al., 2011; Paim et al., 2012). Before starting the experiment, all animals were shown to be free of *Babesia* spp., *R. vitalii*, *Hepatozoon* spp. and *Ehrlichia* spp. infection by testing their blood in a battery of PCR protocols as described elsewhere (Criado-Fornelio et al., 2006; Labruna et al., 2007; Spolidorio et al., 2009; Soares et al., 2011). The study was approved by the Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), protocol number 15/2010.

2.2. *R. vitalii* isolate

The *R. vitalii* strain used in this study was originally obtained from a naturally infected dog in Santa Maria, state of Rio Grande do Sul (Soares et al., 2011). The maintenance of the isolate was carried out in a canine (Dog 13) as previously described by Da Silva et al. (2011).

2.3. Experimental design and estimation of parasitemia

The animals were divided into two groups: group A consisted of five healthy animals (not infected), used as a control group; group B consisted of seven dogs that were experimentally infected with *R. vitalii*. They were infected by intravenous inoculation of 2 mL of fresh blood collected from Dog 13, which had been kept infected in the laboratory (Da Silva et al., 2011). After inoculation, blood smears were performed at two day-intervals, starting at Day 1

post-inoculation (PI). Peripheral blood smears were performed with blood obtained from the tip of the ear, using a hypodermic needle. The smears were Romanovsky stained, and examined under 1000× magnification by optical microscopy (Da Silva et al., 2011).

2.4. Samples collection and platelet counts

The animals were manually restrained and blood samples collected by jugular venipuncture at Days 0, 12 and 21 post-infection (PI) for quantification of circulating platelets (0.5 mL of blood in tubes containing EDTA 10%). The enzymatic activity in platelets was evaluated at Days 12 and 21 PI, and the blood collected (4 mL) was allocated in tubes containing citrate for separation of platelets.

2.5. Platelet preparation and protein determination

Platelets were prepared as previously described by Pilla et al. (1996) and modified by Lunkes et al. (2003). Briefly, blood was collected into 0.129 M citrate and centrifuged at 160g for 15 min. The platelet-rich plasma was centrifuged at 1400g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES to determine enzymatic activities. Cell viability was estimated by lactate dehydrogenase activity in intact and disrupted platelets. Values of the sample were compared to the enzymatic activity obtained from cells lysed with 0.1% Triton X-100, as described by Bergmeyer (1983). Protein determination in platelets was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard, as described by Bradford (1976).

2.6. NTPDase and 5'-nucleotidase activity determination

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 50 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 µL as described by Lunkes et al. (2004). The protein content of platelets suspension was adjusted to 0.4–0.6 mg/mL (enzyme preparation). Twenty microliters of the enzyme preparation were added to the reaction mixture and pre-incubated for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM, and incubated for 60 min.

5'-Nucleotidase activity was determined essentially as described by Heymann et al. (1984) in a reaction medium containing 10 mM MgSO₄ and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 at a final volume of 200 µL. The protein content of platelets suspension was adjusted to 0.4–0.6 mg/mL (enzyme preparation). Twenty microliters of enzyme preparation was added to the reaction mixture and pre-incubated for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of AMP at a final concentration of 2.0 mM. The time of incubation was 60 min.

Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1986) using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolysis of nucleotides by adding platelets after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are reported as nmol of Pi released/min/mg of protein.

2.7. ADA activity assay

ADA was determined as previously described (Guisti and Galanti, 1984). Briefly, 50 µL of platelets suspension reacted with 21 mM 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 ADA acts in excess of adenosine. The protein content platelets suspension was adjusted to 0.7–0.9 mg/mL for ADA activity assay. Results were expressed in units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mM of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

2.8. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Student's *t* test. The effect of NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA in the number of platelets was analyzed by correlation. The analyses were performed using SAS statistical package (SAS Institute, Cary, NC, USA) and a value of $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference among the analyses used. All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Platelet count

At the Day 0 of experiment no difference between groups was observed (infected: $267 \pm 66 \times 10^3/\mu\text{L}$ and uninfected:

$254 \pm 49 \times 10^3/\mu\text{L}$). In dogs infected with *R. vitalii*, a reduction was observed ($P < 0.01$) in the number of platelets when compared with uninfected animals at the Day 12 PI ($27 \pm 11 \times 10^3/\mu\text{L}$ and $256 \pm 46 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectively) and Day 21 PI ($69 \pm 26 \times 10^3/\mu\text{L}$ and $268 \pm 37 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectively). The platelet count was more evidently decreased at Day 12 PI compared to Day 10 PI in infected dogs (Paim et al., 2012).

3.2. Enzymatic evaluation in platelets

The results of the activities of NTPDase are shown in Fig. 1. Both the hydrolysis of ATP and ADP decreased (59% and 60.7%, respectively; $P < 0.01$) at Day 12 PI in animals infected with *R. vitalii*. However, at Day 21 PI there was no difference ($P > 0.05$) in ATP hydrolysis between groups, while in the infected group ADP hydrolysis was increased (50.4%; $P < 0.01$).

Activity of the enzyme 5'-nucleotidase is shown in Fig. 2. In the infected group, a decreased (61.1%; $P < 0.01$) AMP hydrolysis at Day 12 PI was observed. At Day 21 PI there was no difference ($P > 0.05$) between groups.

ADA activity in platelets was reduced ($P < 0.01$) in infected animals at Days 12 PI and 21 PI (Fig. 3). The reduction of ADA activity was 71.7% and 78.2% at Days 12 and 21 PI, respectively.

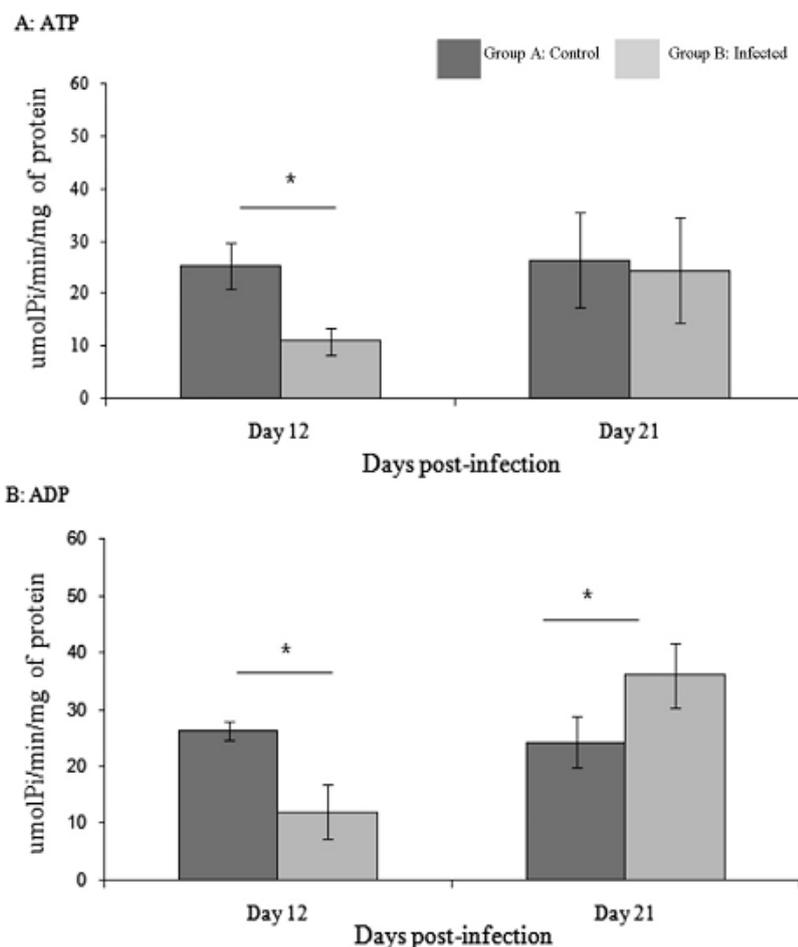


Fig. 1. NTPDase activity using ATP (A) and ADP (B) as substrates in platelets from dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii* (Group B) at Days 12 and 21 post-infection when compared to the not-infected animals (Group A). *Represents significant difference between groups ($p < 0.01$). The columns are represented as mean \pm standard deviation (*t* test).

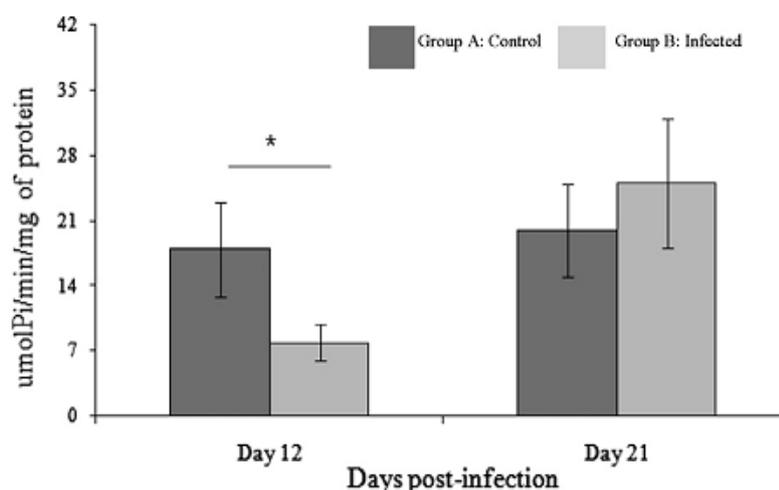


Fig. 2. 5'-nucleotidase activity in platelets from dogs experimentally infected with *Rangella vitalii* (Group B) at days 12 and 21 post-infection when compared to the not-infected animals (Group A). *Represents significant difference between groups ($p < 0.01$). The columns are represented as mean \pm standard deviation (t test).

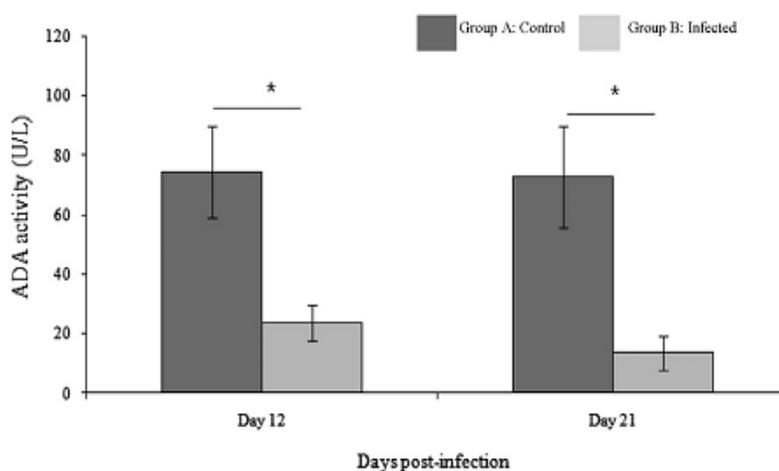


Fig. 3. Adenosine deaminase (ADA) activity in platelets from dogs experimentally infected with *Rangella vitalii* (Group B) on 12 and 21 post-infection when compared to the not-infected animals (Group A). *Represents significant difference between groups ($p < 0.01$). The columns are represented as mean \pm standard deviation (t test).

3.3. Correlation between the number of platelets and enzymatic activity

Positive and significant correlations ($P < 0.05$) between platelet count and ATP ($r = 0.87$), ADP ($r = 0.91$) and AMP ($r = 0.83$) hydrolysis, and adenosine ($r = 0.93$) deamination were observed in dogs with rangelioidosis at Day 12 PI. Platelet count was negatively correlated ($P < 0.001$) with ADP hydrolysis ($R = -0.76$) and positively correlated ($P < 0.001$) with the adenosine deamination ($R = 0.89$) in dogs infected with *R. vitalii* at Day 21 PI. No significant correlations ($P > 0.05$) were observed between platelets count and ATP or AMP hydrolysis at Day 21 PI.

4. Discussion

Studies with NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA have demonstrated the involvement of these enzymes in the thromboregulation mechanisms, and altered enzymatic activities have been reported in many diseases (Schetinger et al., 2007). In this study changes were found in the activity of enzymes involved in the control of extracellular adenine nucleotides and nucleoside levels.

These are known to regulate vascular response to endothelial injury (Birk et al., 2002). In rangelioidosis, thrombocytopenia and bleeding are commonly reported in naturally infected dogs (Loretti and Barros, 2005; França et al., 2010). Similarly, in an experimental study previously described by Paim et al. (2012) an increased number of megakaryocytes were observed in response to a reduction of circulating platelets in dogs at Days 10 and 20 PI; however the cause of thrombocytopenia remained unclear, and they suggested splenic sequestration, endothelial destruction and changes in the purinergic system as possible causes. In this study the status of purinergic system at Days 12 and 21 PI in these dogs was investigated because nucleotides/nucleosides have a key role in modulating diverse effects on the vascular system through the interaction with platelet specific receptors (Di Virgilio et al., 2001). In trypanosomiasis by *Trypanosoma evansi* (a protozoan blood-mammals) in rats changes were observed in the activities of ectonucleotidases and ADA associated with severe thrombocytopenia (Oliveira et al., 2011), being similar to the results of this study in dogs.

Dogs infected with *R. vitalii* had a reduction in the hydrolysis of ATP and ADP in platelets at Day 12 PI. This may be associated with a reduced expression of NTPDase. The reduction in the hydrolysis

of nucleotides may be a compensatory effect in order to increase the concentrations of ATP and ADP in the bloodstream. However, according to their extracellular concentrations, they exert different functions in platelets. *In vitro*, high concentrations of ATP have been shown to inhibit ADP-induced platelet aggregation (Park and Hourani, 1999; Soslau and Youngprapakorn, 1997). In contrast, low concentrations of ATP can significantly enhance collagen-, thromboxane A₂- and thrombin-induced platelet aggregation (Soslau and Youngprapakorn, 1997). Also at Day 12 PI, the decreased 5'-nucleotidase activity may have increased the extracellular concentrations of AMP, and the reduction in ADA activity may be a physiological response to increase concentrations of extracellular adenosine, an important nucleoside for different cellular functions. In this period it was found that thrombocytopenia is positively correlated with the reduction of NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activity in platelets, thus contributing to worsening the course of disease. So, this increase in ATP blocks the effect of ADP, which acts as an agonist of aggregation. Adenosine, as an anti-aggregator, may have contributed to the reduction of platelet aggregation in these animals (Paim et al., 2012) and consequently contribute to the bleeding observed in naturally infected dogs (Loretti and Barros, 2005; França et al., 2010).

Due the chronicity of this disease, at Day 21 PI it was observed that a reversal in ADP hydrolysis in platelets from dogs infected with *R. vitalii* occurred compared to Day 12 PI. At Day 21 PI it was also observed that a small increase in the number of platelets occurred in the infected animals compared to Day 12 PI, a fact that could also cause increased hydrolysis of ADP, despite the great difference in the number of platelets between the groups. However, the product of NTPDase and 5'-nucleotidase, adenosine, is an important modulator of vascular tone, and it is a well-known inhibitor of platelet aggregation (Kitakaze et al., 1991; Kawashima et al., 2000). In this study, a reduction in ADA activity in platelets was verified, which can be interpreted as an increased content of extracellular adenosine, an inhibitor of platelet aggregation as confirmed by Paim et al. (2012), reinforcing the hypothesis that bleeding occurs as a result of thrombocytopenia associated with an imbalance in the enzymatic activities. According with the literature, increased NTPDase activity (CD39) inhibits platelet aggregation by blocking the binding of fibrinogen or the von Willebrand factor to platelets by inhibiting the activation of platelet glycoprotein (GP) IIB/IIIA adhesion receptors (Makita et al., 1998), which could contribute to bleeding detected in dogs naturally infected with *R. vitalii*.

Based on the results it is concluded that ATP, ADP and AMP hydrolysis and adenosine deamination were altered in platelets of *R. vitalii*-infected dogs. During the infection period, the decrease in enzymatic activities may be related to thrombocytopenia, whereas at Day 21 PI the increase in the activity may be attributed to a compensatory mechanism. Alterations in the activities of these enzymes may be implicated in the pathophysiology of rangeliellosis as thrombocytopenia and consequently bleeding. Probably, infection with *R. vitalii* in dogs causes an increase in the concentration of extracellular adenosine, which acts as inhibitor of platelet aggregation and causes the bleeding observed in naturally infected dogs (França et al., 2010; Figuera et al., 2010) and also observed in a canine necropsy in this experimental protocol (Da Silva et al., 2011).

References

- Anfossi, G., Russo, I., Massucco, P., Mattiello, L., Cavalot, F., Balbo, A., Trovati, M., 2002. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. *Thrombosis Research* 105, 71–78.
- Atkinson, B., Dwyer, K., Enjyoji, K., Robson, R., 2006. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells Molecular Disease* 36, 217–222.
- Bergmeyer, J., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. VCH Publishers, Weinheim, 4181–424.
- Birk, A.V., Broekman, M.J., Gladek, E.M., Robertson, H.D., Drosopoulos, J.H., Marcus, A.J., Szeto, H.H., 2002. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *The Journal Laboratory and Clinical Medicine* 140, 166–175.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for the Ca²⁺ ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157, 375–380.
- Criado-Fornelio, A., Ruas, J.L., Casadom, N., Fariasm, N.A., Soares, M.P., Müller, G., Brum, J.G., Berne, M.E., Buling-Saraná, A., Barba-Carretero, J.C., 2006. New molecular data on mammalian Hepatozoon species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *The Journal of Parasitology* 92, 93–99.
- Da Silva, A.S., França, R.T., Costa, M.M., Paim, C.B., Paim, F.C., Domelles, G.L., Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Experimental Parasitology* 128, 347–352.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, M.J., Morelli, A., Torboli, M., Balignesi, G., Baricordi, R., 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97, 587–600.
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.G., Irogoyen, L.F., Barros, C.S.C., 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológico da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985–2009). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30, 974–987.
- França, R.T., Da Silva, A.S., Paim, F.C., Costa, M.M., Soares, J.F., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T.A., 2010. *Rangelia vitalii* in dog in southern Brazil. *Comparative Clinical Pathology* 19, 383–387.
- Gödecke, A., 2008. CAMP: fuel for extracellular adenosine formation? *British Journal of Pharmacology* 153, 1087–1089.
- Guisti, G., Galanti, B., 1984. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag-Chemie, Weinheim, 315–323.
- Harker, L., 1997. The role of platelets in the early and the late vascular responses initiated by mechanical vascular injury. *Fibrinol Proteol* 11, 97–103.
- Heymann, D., Reddington, M., Kreuzberg, G.W., 1984. Subcellular localization of 50-nucleotidase in rat brain. *Journal of Neurochemistry* 43, 971–978.
- Jain, N.C., 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Kawashima, Y., Nagasawa, T., Ninomiya, H., 2000. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96, 2157–2162.
- Kitakaze, M., Hori, M., Sato, H., Takashima, S., Inoue, M., Kitabatake, A., Kamada, T., 1991. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. *Circulation Research* 69, 1402–1408.
- Labruna, M.B., McBride, J.W., Camargo, L.M., Aguiar, D.M., Yabsley, M.J., Davidson, W.R., Stromdah, E.Y., Williamson, P.C., Stich, R.W., Long, S.W., Camargo, E.P., Walker, D.H., 2007. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Veterinary Parasitology* 143, 189–195.
- Loretti, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Veterinary Parasitology* 134, 193–213.
- Lunkes, G.J., Lunkes, D., Stefanello, F., Morsch, A., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Schetinger, M.R.C., 2003. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research* 109, 189–194.
- Lunkes, G., Lunkes, D., Morsch, V., Mazzanti, C., Morsch, A., Miron, V., Schetinger, M.R.C., 2004. NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan induced diabetes. *Diabetes Research Clinical Practice* 65, 1–6.
- Makita, K., Shimoyama, T., Sakurai, Y., Yagi, H., Matsumoto, M., Narita, N., Sakamoto, Y., Saito, Y., Ikeda, Y., Suzuki, M., Titani, K., Fujimura, Y., 1998. Placental ecto-ATP diphosphohydrolase: its structural feature distinct from CD39, localization and inhibition on shear-induced platelet aggregation. *International Journal of Hematology* 68, 297–310.
- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J., Islam, N., Pinsky, D., 2003. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *Journal Thrombosis Haemostasis* 1, 2497–2509.
- Oliveira, C.B., Da Silva, A.S., Vargasa, L.B., Bitencourt, P.E.R., Souza, V.C.G., Costa, M.M., Leal, C.A.M., Moretto, M.B., Leal, D.B.R., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2011. Activities of adenine nucleotide and nucleoside degradation enzymes in platelets of rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology* 178, 9–14.
- Paim, C.B., Paim, F.C., Da Silva, A.S., França, R.T., Costa, M.M., Leal, C.A.M., Soares, J.F., Labruna, M.B., Schetinger, M.R.C., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2012. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Veterinary Parasitology* 185, 131–137.
- Park, H.S., Hourani, S.M., 1999. Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5-diphosphate (ADP) in human platelets. *British Journal of Pharmacology* 127, 1359–1366.
- Pestana, B.R., 1910. O Nambuyú (nota preliminar). *Revista da Sociedade Científica de São Paulo* 5, 14–17.
- Pilla, C., Emanuelli, T., Frassetto, S.S., Battastini, A.M.O., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F., 1996. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7, 225–230.
- Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Bonan, C.D., Wyse, A.T.S., 2007. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *BioFactors (Oxford)* 31, 77–98.

- Soares, J.F., Giroto, A., Brandão, P.E., França, R.T., Da Silva, A.S., Lopes, S.T.A., Labruna, M.B., 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary Parasitology* 180, 203–208.
- Soslau, G., Youngprapakorn, D., 1997. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochemistry Biophysics Acta* 1355, 131–140.
- Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Zago, A.M., Donatele, D.M., Caliani, K.M., Yoshinari, N.H., 2009. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 163, 357–361.
- Wagner, D.D., Burger, P., 2003. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 23, 2131–2137.
- Woulfe, D., Yang, J., Brass, L., 2001. ADP and platelets: the end of the beginning. *Journal of Clinical Investigation* 107, 1503–1505.
- Yegutkin, G., 2008. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochemistry Biophysics Acta* 1783, 673–694.

4 DISCUSSÃO

A seguir serão realizadas considerações a respeito dos resultados dos dois artigos apresentados nessa tese de doutorado. O objetivo do primeiro artigo foi avaliar a trombocitopenia, coagulação sanguínea e atividade plaquetária. Enquanto, no segundo artigo objetivou-se mensurar a atividade das enzimas que modulam a concentração de ATP, ADP, AMP e adenosina em plaquetas de cães experimentalmente infectados com *R. vitalii*.

O primeiro relato de diátese hemorrágica em cães decorrentes de infecção por *R. vitalii*, data do início do século passado (PESTANA, 1910). Entretanto, somente durante as últimas décadas é que essa patologia retorna a despertar interesse na comunidade científica.

Na rangeliose, sinais de alterações hemostáticas podem ser observados na forma de petéquias generalizadas nas mucosas oral e vaginal, sangramento nasal e oral, hematemese, melena e diarreia com sangue, além de sangramento através da pele das orelhas (LORETI & BARROS, 2005). Somado a isto, pode ser observada hemorragia em vísceras como: estômago, intestino, pulmão, coração, rim, bexiga, vesícula biliar, pâncreas e adrenal (FIGHERA et al., 2010).

Os resultados encontrados no primeiro artigo corroboram com os achados de França et al. (2010), pois apresentaram redução no número de plaquetas em animais infectados, quando comparados aos controles, nos dias 10 e 20 PI. De acordo com a literatura, as causas de trombocitopenia podem ser: lesão de medula óssea, trombocitopenia imunomediada, coagulação intravascular disseminada e sequestro esplênico (WONG & THOMAS, 1998).

É importante ressaltar que os megacariócitos originam as plaquetas circulantes (PATEL et al., 2005). No primeiro artigo, a avaliação dos aspirados de medula óssea demonstraram que a contagem de megacariócitos nos animais infectados foi acompanhada de um aumento que chegou a 55% no dia 20 PI em animais infectados pela *R. vitalii*. Esse resultado possui alta relevância, pois descarta a possibilidade de a trombocitopenia, nessa patologia, ser decorrente de alteração na megacariopoiese.

As infecções graves e a inflamação, na maioria das vezes, levam a alterações hemostáticas, que podem variar de alterações laboratoriais insignificantes até

coagulação intravascular disseminada grave (LEVI et al., 2010). Esses sangramentos anormais são reconhecidos clinicamente quando lesões na mucosa, serosa, feridas e locais de punção venosa sangram por períodos prolongados, formando hematomas. As anormalidades mais frequentes no exame são: contagem de plaqueta diminuída, TP e TTPa prolongados (ORDOG et al., 1985).

É relevante chamar a atenção que, nos resultados apresentados no artigo I ocorreu redução na contagem plaquetária no dia 10 PI no grupo infectado. Essa trombocitopenia manteve-se até o dia 20 PI. Entretanto, não ocorreu alteração significativa nos valores de TP e TTPa nos animais parasitados por *R. vitalii*, quando comparados com o grupo controle.

Sabe-se que na coagulopatia de consumo os valores de TP e TTPa estão aumentados (ORDOG et al., 1885), fato que não foi observado neste trabalho, portanto, descartou-se que a origem da trombocitopenia em cães com rangeliose pudesse ser decorrente de coagulação intravascular disseminada. Assim, a trombocitopenia neste estudo pode estar associada à destruição imunomediada e sequestro decorrente do aumento esplênico ou vasculite. Esplenomegalia e vasculopatias são aspectos morfológicos observados na infecção por *R. vitalii* (FIGHERA, et al., 2010).

O limite fisiológico da contagem plaquetária é variável entre as diversas espécies animais, estando entre 100.000 a 800.000/ μ L (TRALL, 2007). Na trombocitopenia inferior a 100.000/ μ L, a possibilidade de sangramento está aumentada. Entretanto, o limite no qual predispõe ao aparecimento desse sinal clínico ainda é controverso (VANDERSCHUEREN et al., 2000). Animais com trombocitopenia não apresentam hemorragia espontânea até que a contagem de plaquetas esteja entre 50.000 e 10.000/ μ L (TRALL, 2007).

Estudo avaliando a relação entre contagem plaquetária e risco de sangramento em pacientes com trombocitopenia sugere que aproximadamente 7.000/ μ L de plaquetas fornecem suporte para manter a hemostasia endotelial. O risco de sangramento não aumenta substancialmente até a contagem de plaquetas atingir 10.000/ μ L (SLICHTER, 2004). Essas observações permitem suspeitar que as diáteses hemorrágicas observadas na infecção por *R. vitalii* não tenham como única causa a trombocitopenia.

Cabe ressaltar que, em resposta à lesão vascular, as plaquetas estabelecem interações adesivas com as estruturas subendoteliais expostas. Elas se ativam através do contato com substâncias trombogênicas, ligando-se a moléculas adesivas solúveis,

tornando-se reativas à continuação da agregação de mais plaquetas (RUGGERI et al., 1999).

No artigo I dessa tese, foi evidenciado distúrbio na agregação plaquetária, sendo que a diminuição ocorreu no grupo de cães infectados nos dias 10 e 20 PI. Esse achado mostra que a habilidade das plaquetas se aderirem à superfície lesionada e também umas às outras, para promover a formação do trombo plaquetário em resposta a um agente agonista, esteve comprometida no grupo de cães infectados por *R. vitalii*.

Grandes quantidades de ATP e ADP estão presentes em eritrócitos, plaquetas e outras células teciduais, podendo deixar esses locais por dano físico ou exocitose. Sabe-se que a ADP interage com receptores P2Y sobre plaquetas e induz agregação plaquetária, contribuindo assim, com a hemostasia normal. Já o ATP pode reagir com receptores P2X impedindo esse mecanismo (STAFFORD et al., 2003).

Este tipo de sinalização é dependente da liberação dos nucleotídeos e nucleosídeos, do seu metabolismo por enzimas que atuam extracelularmente e pela presença dos receptores que se ligam seletivamente aos nucleotídeos resultantes e transportam o sinal para o interior da célula (GOUNARIS, 2002)

No artigo II desse estudo pode-se destacar que há redução na hidrólise de ATP e ADP pelas enzimas NTPDases nas plaquetas dos animais infectados no dia 12 PI. Isso pode ser associado à redução na expressão dessas enzimas, decorrente de um efeito compensatório pelo aumento desses nucleotídeos na corrente circulatória. Entretanto, no dia 21 PI o ADP aumentou em cães infectados por *R. vitalii*. Este achado pode ser devido a infecção ter passado para um estágio crônico.

Foi ainda realizada a determinação da hidrólise do AMP nas plaquetas, pela 5'-ectonucleotidase, onde observou-se redução desse nucleotídeo em animais infectados no dia 12 PI. Entretanto, a atividade da ADA esteve reduzida em plaquetas no grupo infectado, independente do dia em que foi realizada a avaliação dessa enzima. Esses achados indicam que a modulação de nucleotídeos e nucleosídeos esteve alterada no decorrer da doença.

A redução na atividade da 5'-ectonucleotidase pode ter contribuído com o aumento nas concentrações extracelulares de AMP. Já a elevação da ADA pode ser atribuída à resposta fisiológica, devido ao aumento da concentração de adenosina extracelular.

As ectonucleotidases NTPDase, 5'-ectonucleotidases e a ADA são enzimas que modulam o mecanismo hemostático, exercendo função importante na agregação

plaquetária (ZIMMERMANN, 1999). A atividade dessas enzimas foi encontrada alterada em diversas patologias, contribuindo para ocorrência de transtorno no processo hemostático dessas doenças (SCHETINGER, et al., 2007).

Correlação positiva foi encontrada entre o a contagem de plaquetas (Artigo I) e a hidrólise de ATP ($r=0,87$), ADP ($r=0,91$) e AMP ($r=0,83$) e a desaminação da ADA ($r=0,93$) (Artigo II), no dia 12 PI em cães com *R. vitalii*. Estudos têm demonstrado atividade oposta de ADP e ATP quanto à indução da agregação plaquetária. O ADP funciona como agonista da agregação, enquanto que o ATP é antagonista desse efeito (PARK & HOURANI, 1999). Entretanto, a ADA tem função de inibir a agregação plaquetária (MACKENZIE et al., 1994). Assim, pode-se afirmar que a redução na atividade da NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA contribuiu para redução da agregação plaquetária na rangeliose, favorecendo a ocorrência de diátese hemorrágica nos cães infectados.

No artigo I foi observado tendência de aumento no número de plaquetas no dia 20 PI. Entretanto o artigo II demonstrou redução ainda maior na atividade da ADA nesse dia, fato que indica uma quantidade ainda mais elevada de adenosina no meio extracelular. Isso evidencia que, apesar do aumento das plaquetas, ainda ocorre uma forte interferência da adenosina na agregação das plaquetas, reforçando a hipótese de que o sangramento observado nessa patologia ocorre em virtude de um desequilíbrio entre plaquetas e atividade enzimática.

5 CONCLUSÕES

5.1 Artigo 1

- O aumento da contagem de megacariócitos observado em aspirados de medula óssea de cães infectados com *R. vitalii* descarta dano na medula como causa de trombocitopenia nessa patologia.
- Grave trombocitopenia ocorre na fase aguda da infecção por *R. vitalii* em cães.
- Os valores de TP e TTPa em cães portadores de rangeliose descartam a ocorrência de coagulopatia de consumo durante a fase aguda da doença.
- A redução na contagem de plaquetas no sangue periférico de cães infectados por *R. vitalii*, na fase aguda da doença, sugere sequestro ou/e trombocitopenia imunomediada.
- A redução na agregação plaquetária sugere diminuição da liberação de ADP pelas plaquetas, contribuindo para as alterações hemorrágicas na rangeliose.

5.2 Artigo 2

- A hidrólise de AMP, ADP, ATP e desaminação da adenosina foram alterada durante a infecção por *R. vitalii*.
- A redução da atividade da NTPDase, 5'-ectonucleotidase e ADA em plaquetas de cães portadores de rangeliose, durante o período de infecção, pode ser relacionada a trombocitopenia.
- O aumento da atividade enzimática da NTPDase e da 5-nucleotidase no dia 21 PI pode ser atribuído a um aumento compensatório no número de plaquetas.
- O aumento nas concentrações de adenosina desaminase, um inibidor da agregação plaquetária, pode contribuir para hemorragias em cães infectados por *R. vitalii*.

6 IMPORTÂNCIA DO TRABALHO

Este estudo apresenta relevância científica, pois demonstra pela primeira vez, alterações na atividade das enzimas que participam da cascata purinérgica em cães infectados por *R. vitalii*, tornando-se evidente que essas enzimas estão implicadas na fisiopatologia da doença, contribuindo para ocorrência das diáteses hemorrágicas.

Procedeu-se ao estudo da sinalização purinérgica a contagem de plaquetas no sangue periférico de cães infectados por *R. vitalii* e observou-se acentuada trombocitopenia nestes cães. Entretanto, durante a avaliação de megacariócitos em aspirados foi encontrado um aumento no número destas células. Este resultado é importante, pois descartou que a redução no número de plaquetas no sangue periférico em cães com rangelirose tenha sido decorrente de afecções nos megacariócitos ou na megacariopoiese, levando a acreditar que a trombocitopenia é decorrente da destruição das plaquetas circulantes, possivelmente por processos imunomediados.

Outro aspecto a ser considerado neste estudo diz respeito à mensuração do TP e TTPa. Neste trabalho não foi observada diferença significativa nestes testes de coagulação sanguínea entre os grupos infectado e controle. Isto é relevante, uma vez que demonstra que as alterações hemorrágicas na infecção por *R. vitalii* não podem ser atribuídas a coagulopatia de consumo.

Por fim, é importante chamar a atenção para redução da agregação plaquetária e as alterações na hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeo observadas neste trabalho, o que tornou evidente a contribuição da sinalização purinérgica nas diáteses hemorrágicas em cães infectados por *R. vitalii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, v. 14, n. 5, p. 462 – 470, ago. 2009.

ANFOSSI, G. et al. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. **Thrombosis Research**, v. 105, n. 1, p. 71 – 78, jan. 2002.

ARMSTRONG, A. W.; GOLAN D. E. Pharmacology of Hemostasis and Thrombosis. In:_____ GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, W.; ARMSTRONG, A. W. **Principles of Pharmacology**, ed. 3, Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p. 387 - 415.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic target. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 36, n. 2, p. 217 – 222, mar.-abr., 2006.

BAHNER, I. et al. Infection of human marrow stroma by human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) is both required and sufficient for HIV-1-induced hematopoietic suppression in vitro: demonstration by gene modification of primary human stroma. **Blood**, v. 90, n.5, p. 1787 – 1798, set. 1997.

BEHNER, O.; FORER, A. From megakaryocytes to platelets platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. **European Journal of Haematology**, v. 60, n. 61 p. 3 – 23, dez. 1998.

BERGMEYER, J. **Methods of enzymatic analysis**. VCH Publishers, 1983, p. 418 – 424.

BIRK, A. V. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 140, n. 3, p. 166 – 175, set. 2002.

BOMMER, N. X. et al. Platelet distribution width and mean platelet volume in the interpretation of thrombocytopenia in dogs. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 49, n. 10, p. 518 – 524, out. 2008.

BORJESSON, D. L. et al. Thrombocytopenia in a mouse model of human granulocytic ehrlichiosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 11, p. 1475 – 1479, dez. 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, n. 2, p. 269 – 278, jun. 2006.

BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **The Journal of Physiology**, v. 168, n. 1, p. 178 – 195, ago. 1963.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248 – 254, mai. 1976.

BRASS, L. F.; ZHU, L.; STALKER, T. J. Minding the gaps to promote thrombus growth and stability. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3385 – 3392, dez. 2005.

BOLTON-MAGGS, P. H. B.; CHALMERS, E. A.; COLLINS, P. W., et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. **British Journal of Haematology**, v. 135, n.5, p. 603 – 633, dez. 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. **Journal of the American Heart Association**, v. 22, n.3, p. 364 – 373, mar. 2002.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 1, p. 58 – 86, mar 2006.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31 – 304, 2004.

CARINI, A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Revista Médica de São Paulo**, v. 22, p. 459 – 462, 1908.

CARINI, A.; MACIEL, J. J. Contribuição ao tratamento do nanbyuvú pelo trypanblau. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, p. 63 – 64, 1914.

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for the Ca^{2+} ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157 – n. 2, p. 375 – 380, set. 1986.

CLEN, D. et al. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. **Blood**, v. 95, n.3, p. 921 – 929, fev. 2000.

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

CRIADO-DORNELIO, A. et al. New molecular data on mammalian Hepatozoon species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **The Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 93 – 99, fev. 2006.

CRISTALLI, G. et al. Adenosine deaminase; functional implications and different classes of inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, n. 2, p. 105 – 128, mar. 2001.

CURRY, A.; PIERCE, J. M. Conventional and near-patient test of coagulation. **Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain**, v. 7, n. 2, p. 45 – 50, 2007.

DALY, M. E. Determinants of platelet count in humans. **Haematologica**, v. 96, n. 1, p. 10 – 13, jan. 2011.

Da SILVA, A. S. et al. Clotting disturbances in *Trypanosoma evansi*-infected cats. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 2, p. 207 – 209, 2010.

Da SILVA, A. S. et al. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical- pathological aspects and treatment. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 4, p. 347 – 352, ago. 2011.

De La RUE, M.; SILVA, R. A. M. S.; CARLI, G. A. Coagulopathy in dogs infected with *trypanosome* (Trypanozoom) *evansi* (Stell, 1885) Balbiani, 1888. **Parasitología al día**, v. 21, n. 3-4, p. 92 – 96, jul. 1997.

Di VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587 – 600, fev. 2001.

EYRE, L.; GAMLIN, F. haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia and intensive care medicine**, v.11, n.6, p. 244 – 246, jun. 2010.

ENJYOJI, K. et al. Targeted disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v. 5, n. 9, p. 1010 – 1017, set. 1999.

FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. C.; JAIN, N. C. Scham's Veterinary Hematology. 5 ed, Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008, p. 787.

FIGHERA, R. A. et al. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 974 – 987, nov. 2010.

FRANÇA, R. T. et al. *Rangelia vitalii*, in dog in southern Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 4, p. 383-387, jun. 2010.

FREDHOLM, B. B. et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 143 – 156, jun. 1994.

GACHET C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 466 – 472, mar. 2008.

GALE, A. J. Current understanding of hemostasis. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n.1, p. 273 – 280, nov. 2011.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**. v. 93, n.1, p. 105 – 113, abr. 2004

GEDDIS, A. E.; KAUSHANSKY, K. The root of platelet production. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1689 – 1691, set. 2007.

GENTRY, P. A. Platelet biology. In:_____ FELDMAN, B. F.; ZINKL, B. F.; JAIN, N.C.: **Schalms Veterinary Hematology**, 5 ed, Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008, p. 459 - 456.

GEORGE, J. N. Platelet immunoglobulin G: its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha granule proteins. **Blood**, v 76 n. 5, p. 859 – 870, set. 1990.

GEORGE, J. N. Platelets. **The Lancet**. v. 355, n, 9214, p. 1531 – 1539, abr. 2000.

GÖDECKE, A. cAMP Fuel for extracellular adenosine formation? **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 6, p. 1087 – 1089, mar. 2008.

GOPEGUI, R. R. et al. Clinical pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 129 – 132, jul. 2007.

GOUNARIS, K. Nucleotidase cascades are catalyzed by secreted proteins of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4917 – 1924, set. 2002.

GRYGLEWSKI, R. J. Prostacyclin among prostanoids. **Pharmacological Reports**, v. 60, n. 1, p. 3 – 11, jan-fev., 2008.

GUISTI, G.; GALLANTI, B. Colorimetric method. In:_____ Bergmeyer, H. U. **Methods of enzymatic analysis**, ed 3., Weinheim'Verlag Chemie, 1984, p 315 – 323.

HARKET, L. The role of platelets in the early and the late vascular responses initiated by mechanical vascular injury. **Fibrinolysis and proteolysis**, v. 11, n. 1, p. 97 – 103, abr. 1997.

HARRISON, P. Measuring platelet function? **The hematology Journal**, v. 5, p. 164 – 169, 2004.

HARVEY, J. W. **Atlas of Veterinary Haematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals**. Saunders, Florida. 2001, p. 240.

HEYMANN, D.; REDDINGTON, M.; KREUTZBERG, G. W. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 43, n. 4, p. 971 – 978, out. 1984.

HILLARY, A.; JOHNSTON-COX; RAVID, K. Adenosine and blood platelets. **Purinergic Signal**, v. 7, n. 3, p. 357 – 365, fev. 2011.

HUANG, Y. H. et al. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. **Journal of Medicine virology**, v. 63, n. 3, p. 247 – 251, mar. 2001.

ITALIANO, J. E. JR; SHIVDASANI, R. A. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 6, p. 1174 – 1182, june. 2003.

JAIN, N. C. **Essential of Veterinary Hematology**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p. 417.

JACKSON, S. P. The growing complexity of platelet aggregation. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5087 – 5095, fev. 2007.

JACOBS, G.; CALVERT, C.; KAUFMAN, A. Neutropenia and thrombocytopenia in three dogs treated with anticonvulsants. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 5, p. 681 – 684, mar. 1998.

JENKINS, G. C.; FACER, C. A. Haematolgy of African Trypanosomiasis. In:_____ Tizardi,I. **Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis**, ed 1, CRC Press, Boca Raton, USA, 1998, p. 13 – 44.

JENNINGS, L. K. Mechanisms of platelet activation need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. **Thrombosis Haemostasis**, v. 102, n. 2, p. 288 - 257, ago. 2009.

JOHNS, C. S. Platelet function testing. **Clinical Hemostasis Review**, v. 18, n. 4, p. 1 – 9, jul.-ago., 2004.

KARPATKIN, S. The spleen and thrombocytopenia. **Clinics and Haematology**, v. 12, n. 2, p. 591 – 604, jun. 1983.

KAUSHANSKY, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p.3339 – 3347, dez. 2005.

KAUSHANSKY, K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 981 – 986, fev. 2008.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v. 96, n. 6, p. 2157 – 2162, set. 2000.

KITAKAZE, M. et al. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. **Circulation Research**, v. 69, p. 1402 – 1408, 1991.

KRAUSPENHAR, C.; FIGHERA, R. A.; GRAÇA, D. L. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 1, n. 4, p. 273 – 281, out./dez., 2003.

KRIZ, N.; RINDER, C. S.; RINDER, H. M. Physiology of hemostasis: with relevance to current and future laboratory testing. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 29, n. 2, p. 159 -174, jun. 2009.

LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks humans, dogs and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189 – 195, jan. 2007.

LEVI, M.; SCHULTS, M.; VAN DER POLL, T. Disseminated intravascular coagulation in infectious disease. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, n. 34, v. 4, p. 367 – 377, jun. 2010.

LEVI, M.; TOH, C. H.; THACHIL, J. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. **British Journal of Haematology**, v. 145, n. 1, p. 24 – 33, abr. 2009.

LEVINE, R. F.; HAZZARDD, K. C.; LAMBERG, A. D. The significance of megakaryocyte size. **Blood**, v. 60, n. 5, p. 1122 – 1131, nov. 1982.

LORETI, A. P., BARROS, S. S. Parasitismo por *Rangelia vitalii* em cães (“Nambiuvú”, “Peste de Sangue”) – uma revisão crítica sobre o assunto. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 71, n.1, p. 101 – 131, jan./mar. 2004.

LORETI, A. P., BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 3-4, p. 193-213, jul. 2005.

LÖWENBERG, E. C.; MEIJERS, J. C. M.; LEVI, M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, n. 6, p. 242 – 251, jun. 2010.

LUNKES, G. I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v.109, n. 4, p. 189 – 194, fev. 2003.

LUNKES, G. I. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan induced diabetes. **Diabetes Research Clinical Practice**, v. 65, n. 1, p. 1 – 6, jul. 2004.

MACKENZIE, W. M.; HOSKIN, D. W.; BLAY, J. Adenosine inhibits the adhesion of anti-CD3-activated killer lymphocytes to adenocarcinoma cell through an A3 receptor. **Cancer Research**, v. 54, n. 13, p. 3521 – 3526, jul. 1994.

MA, Y. Q.; QIN, J.; PLOW, E. F. Platelet integrin alpha(IIb) beta (3): activation mechanisms. **Journal of Thrombosis and haemostasis**, v. 5, n. 7, p. 1345 – 1352, jul. 2007.

MAKITA, K. et al. Placental ectoATP diphosphohydrolyase: its structural feature distinct from CD39, localization and inhibition on shear induced platelet aggregation. **International Journal of Hematology**, v. 68, n. 3, p. 297 – 310, out. 1998.

MALISZWWKI, C. R. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 8, p. 3574 – 3583, out. 1994.

MARCUS, A. J. et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal Thrombosis Haemostasis**, v. 1, n. 12, p. 2497 – 1509, dez. 2003.

MAYNARD, D. M. et al. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 5, n. 9, p. 1945 – 1955, set. 2007.

MORRELL, C. N. et al. Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 102, n. 10, p. 3782 – 3787, mar. 2005.

NUTT, S. L. et al. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 221 – 231, jan. 2005.

NIIYA, K. et al. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. **Blood**, v. 70, n. 2, p. 475 – 483, ago. 1987.

OLIVEIRA, C. B. et al. Activities of adenine nucleotide and nucleoside degradation enzymes in platelets of rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 178 n. 1/2, p. 9 – 14, jan. 2011.

ORDOG, G. J.; WASSERBERGER, J.; BALASUBRAMANJUM, S. Coagulation abnormalities in traumatic shock. **Annals of Emergency Medicine**, v. 14, n. 7, p. 650 – 655. Jul. 1985.

PAPATHANASIOU, A.; GOUDEVENOS, J.; TSELEPIS, A. D. Aspirin resistance in cardiovascular disease: pathogenesis, diagnosis and clinical impact. **Current Pharmaceutical designs**, v. 15, n.10, p. 1085 – 1094, 2009.

PATEL, S. R.; HARTWIG, J. H.; ITALIANO, J. E. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3348 – 3354, dez. 2005.

PARK, H.S.; HOURANI, S. M. Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5'-diphosphate (ADP) in human platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 6, p. 1359 – 1366, jul. 1999.

PEARSON, J. D.; CARLETON, J. S.; GORDON, J. L. Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth muscle cells in culture. **Biochemical Journal**, v. 190, n. 2, p. 421 – 429, ago. 1980.

PESTANA, B. R. O nambyuvú (nota preliminar). **Revista da Sociedade Científica de São Paulo**, v. 5, p. 14 – 17, 1910.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E. C. 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, n. 4, p. 225 – 230, 1996.

POLASEK, J. Three modes of platelet degranulation? **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 35, n. 5, p. 408 – 409, jan. 2006.

PROVAN, D. et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 168 – 186, jan. 2010.

RAFAJ, R. B. et al. Alteration in some blood coagulation parameters in naturally occurring cases of canine babesiosis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 57, n. 2, p. 295 - 302, jun. 2009.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 413 – 492, set. 1998.

ROBSON, S. C. et al. Modulation of extracellular nucleotide-mediated signaling by CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1. **Drug Development Research**, v. 53, n. 2/3, p. 193 – 207, june. 2001.

ROBSON, S. C. et al. Thromboregulatory potential of endothelial CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase: modulation of purinergic signalling in platelets. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 4, n. 2, p. 155 – 171, abr. 2000.

RUGGERI, Z. M. Structure and function of von Willebrand factor. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, n.4, p. 576 – 584, ago. 1999.

RUGGERI, Z. N.; DENT, J. A.; SALDIVAR, E. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. **Blood**, v. 94, n. 1, p. 172 – 178, jul. 1999.

RUMBAUT, R. E.; THIAGARAJAN, P. Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. **Morgan & Claypool Life Sciences**, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53450. acesso em: 15 set. 2010.

SCHETINGER, M. R. C. et al. NTPDase and 5-nucleotidase activities in physiological and disease conditions. New perspectives for human health. **BioFactors**, v. 31, n. 2, p. 77 – 98, 2007.

SCHETTERS, T. P. M. et al. Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1 – 2, p 7 – 15, mai. 2009.

SLICHTER, S. J. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. **Transfusion Medicine Review**, v. 18, n. 3, p. 153 – 167, jul. 2004.

SMITH, R. D. et al. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 6, p. 1216 – 1221, jun. 1975.

SOARES, J. et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3, p. 153 – 167, jul. 2011.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1355, n. 2, p. 131-140, fev. 1997.

SPANVELLO, R. M. et al. Activities of the enzymes that hydrolyzes adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patient. **Journal of Neurology**, v. 257, n.1, p. 24 – 30, jul. 2010.

SPOLIDORIO, M. G. et al. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 357 – 361, ago. 2009.

STAFFORD, N. P. et al. Mechanisms involved in Adenosine Triphosphate-induced platelet aggregation in whole blood. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, p. 1928 – 1933, out. 2003.

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

STIFF, P. J. Platelets. In: _____(ed) WALKER, H. K. HALL, W. D. HURST, J. W. **Clinical Methods**. 3 ed., Boston: Butterworths, 1990, p. 728 – 731.

SUN, L.; HWANG, W. Y. K.; AW, S. E. Biological characteristics of megakaryocytes: Specific lineage commitment and associated disorders. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 11, p. 1821 – 1826, abr. 2006.

TAGHIZADEH, M. An update on immune-mediated thrombocytopenia. **LabMedicine**, v. 39, n. 1, p. 51 – 54, jan. 2008.

THRALL, M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2007, p. 181.

VANDERSCHUEREN, S., et al. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 6, p. 1871 – 1876, jun. 2000.

Van HINSBERGH V. W. M. The endothelium: vascular control of haemostasis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 95, n. 2, p. 198 – 201, abr. 2001.

Van HINSBERGH, V. W. M. Endothelium – role in regulation of coagulation and inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 93 – 106, out. 2011.

VARGA-SZABO, D.; BRAUN, A.; NIESWANDT, B. Calcium signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n.7, p. 1057 – 1066, jul. 2009.

WAGNER, D. D.; BURGER, P. Platelets in inflammation and thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, n. 12, p. 2131 – 2137, dez. 2003.

WARE, J. A.; HEISTAD D. D. Seminars in medicine of the Israel hospital, Boston. Platelet endothelium interactions. **The New England Journal of Medicine**, v.328, p. 628 – 635, mar. 1993.

WHITE, J. G.; CLAWSON, C. C. The surface-connected canalicular system of blood platelets – a fenestrated membrane system. **The American Journal of Pathology**, v. 101, n. 2, p. 353-364, nov. 1980.

WOULFE, D.; YANG, J.; BRASS, L. ADP and platelets: the end of the beginning. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 12, p. 1503 – 1503, jun. 2001.

WONG, S. J.; THOMAS, J. A. Cytoplasmic nuclear, and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1959 – 1963, jul. 1998.

WU, K. K.; THIAGARAJAN, P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. **Annual Review of Medicine**, v. 47, n. 315–331, fev. 1996.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1783, n. 5, p. 673 – 694, mai. 2008.

ZIMMERMANN, H. 5'-nucleotidase-molecular structure and functional aspects. **Archive of Biochemical Journal**, v. 285, n. 2, p. 345 – 365, jul. 1992.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties, and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 6, p. 231 – 136, jun. 1999.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1/2, p. 44 – 56, jan/fev. 2001.

ZUCKER-FRANKLIN, D.; PHILIPP, C. S. Platelet production in the pulmonary capillary bed: New ultrastructural evidence for an old concept. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 1, p. 69 – 74, jul. 2000.