

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

**ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM
NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM
PLAQUETAS DE RATOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE POR *Sporothrix schenckii***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Cipolatto Rocha

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM
NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM
PLAQUETAS DE RATOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE POR *Sporothrix schenckii***

Bruna Cipolatto Rocha

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

Orientadora: Prof. (Dra) Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

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

**ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E
NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PLAQUETAS DE RATOS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Sporothrix schenckii***

elaborada por
Bruna Cipolatto Rocha

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Dr. Carlos Eduardo Blanco Linares (URI)

Dr. Janio Moraes Santurio (UFSM)

Santa Maria, 30 de Março de 2012

Dedico este trabalho...

... Aos meus pais, Julio e Rose, pelo apoio, força e amor.

... À minha irmã Gabriela, pelos exemplos de perseverança e disciplina.

... Ao meu namorado Carlos Hugo, pelo amor, presença e incentivo.

...Sem eles nada disso seria possível.

*“Bem maior do que os mares mais profundos
Bem maior do que os campos que eu vi
Bem maior que o teatro das estrelas
É meu amor por tí...”*

(Roupa Nova)

AGRADECIMENTOS

“Deus, te agradeço por tudo. Por me ajudar a seguir, me fazer crescer, abrir meus olhos para o mundo. Por cada dia, por cada vez que eu me refaço. Por cada sonho, que se tornou realidade. Por me mostrar cada verdade. Por estar sempre em meu caminho. Por tanta luz, tanto amor, tantas alegrias, tanta força. Por cada passo que eu dou. Por minha família. Eu te agradeço senhor.”

Aos meus amados pais, Julio e Rose por estarem sempre ao meu lado me protegendo e incentivando. Obrigada pelo cuidado, pelos sorrisos, pelas palavras doces de carinho e aconchego dos abraços. Obrigada por todo esforço e educação recebida. Obrigada pelos exemplos de vida, persistência, amor e bondade.

À minha querida irmã Gabriela, pela convivência, amor, preocupação e apoio. Obrigada pelas palavras de tranquilidade que me ajudaram a seguir.

Ao meu amor Carlos Hugo, por todos os momentos que passamos juntos e por todos que ainda virão. Obrigada por tanta força para seguir em frente, tantas alegrias, tanto amor, pela compreensão, paciência e confiança, enfim, por estar sempre em meu caminho.

À toda minha família, pela união em todas as horas. Obrigada por acreditarem em mim.

À minha orientadora Daniela Bitencourt Rosa Leal, pela aposta, incentivo, confiança e todos os ensinamentos.

Aos amigos e colegas do laboratório 4229, pelo carinho, coleguismo, amizade e pelos incontáveis sorrisos nos extensos e custosos dias de trabalho. Obrigada pela colaboração de todos neste trabalho. De maneira especial, agradeço à amiga Livia, que tanto me ajudou a seguir em frente com sua atenção e incentivo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM pelo auxílio e apoio prestados. Especialmente ao professor Sydney, pela orientação e atenção, disponibilizando seu tempo para tirar dúvidas e me permitindo assistir suas incansáveis aulas de micologia.

À banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas contribuições que farão a este trabalho.

À todos que participaram deste trabalho de alguma forma, meu muito obrigada.

*“Insisto na caminhada.
O que não dá é pra ficar parado.
Se amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro um arco-íris da
cartola. E refaço. Colo. Pinto e bordo.
Porque a força de dentro é maior.
Maior que todo mal que existe no mundo.
Maior que todos os ventos contrários.
É maior porque é do bem. E nisso, sim, acredito até o fim.
O destino da felicidade me foi traçado no berço.”*

Caio Fernando de Abreu

RESUMO

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

ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PLAQUETAS DE RATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Sporothrix schenckii*

Autora: Bruna Cipolatto Rocha
Orientadora: Prof. (Dra) Daniela Bitencourt Rosa Leal
Co-Orientador: Prof. (Dr) Sydney Hartz Alves
Data e local de Defesa: Santa Maria, 30 de Março de 2012.

A esporotricose é uma micose cosmopolita que tem como agente etiológico o fungo *Sporothrix schenckii*, que afeta o homem e várias espécies de animais, especialmente, os felinos. A forma linfocutânea da micose é a mais freqüente, já as formas disseminadas, são menos freqüentes e têm sido descritas principalmente entre pacientes imunocomprometidos. O *Sporothrix schenckii* é introduzido acidentalmente no organismo humano ou animal através de ferimentos causados por espinhos, farpas de madeira ou por qualquer objeto pontiagudo contaminado pelo fungo. Como o felino é um animal doméstico, pode transmitir a esporotricose ao homem, através da arranhadura e/ou mordedura, devido à grande quantidade de leveduras encontradas nas lesões e a possibilidade destes animais carregarem o agente nas unhas e cavidade oral. A infecção ativa uma resposta imune e inflamatória, modulada pela sinalização purinérgica, a qual envolve purinas extracelulares, receptores purinérgicos e ectoenzimas. As purinas representam uma importante classe de moléculas extracelulares, que ao interagirem com receptores específicos na superfície celular, sinalizam vias de grande importância que medeiam diversos efeitos biológicos. A sinalização induzida por estas moléculas correlaciona-se diretamente à atividade de enzimas localizadas na superfície da membrana celular, as ectoenzimas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da esporotricose na atividade de ectoenzimas em plaquetas e seus processos tromborregulatórios. Para este estudo, foram utilizados ratos *Wistar* machos divididos em 3 grupos (controle, infectado com isolado clínico de ação sistêmica de *Sporothrix schenckii* e infectado com isolado clínico de ação linfocutânea de *Sporothrix schenckii*), onde cada grupo foi constituído por 10 animais. Após 28 dias, foi coletado o sangue e determinadas as atividades das ectoenzimas em plaquetas, assim como o perfil de agregação plaquetária. A única alteração observada foi na atividade da NTPDase, com aumento na hidrólise de ATP e ADP nas plaquetas dos ratos experimentalmente infectados com o isolado clínico de ação linfocutânea de *S. schenckii*. Esta alteração pode estar contribuindo para a redução de ADP extracelular, o qual é responsável pela ativação descontrolada de plaquetas e desencadeamento de processos trombogênicos. Desta forma, poderia também estar protegendo o organismo contra a formação de trombos e lesões nodulares, presentes na esporotricose. Sugere-se então, que o sistema purinérgico está envolvido no processo de hemostasia e tromborregulação durante a infecção por *Sporothrix schenckii*, evitando a excessiva agregação plaquetária e consequentemente, a formação de trombos.

Palavras-chaves: Esporotricose. Ectoenzimas. Agregação plaquetária. Plaquetas.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programme of Post Graduation in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ENZYMES ACTIVITY THAT HYDROLYZE NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE ADENINE IN PLATELETS OF RATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Sporothrix schenckii*

Author: Bruna Cipolatto Rocha
Oriented by: Prof. (Dra) Daniela Bitencourt Rosa Leal
Co-oriented by: Prof. (Dr) Sydney Hartz Alves
Date and place of the defense: Santa Maria, March 30, 2012

Sporotrichosis is a cosmopolitan mycosis whose etiological agent is the fungus *Sporothrix schenckii*, affecting humans and several animals, especially felines. The most frequent form of the mycosis is the lymphocutaneous. The disseminated forms are less frequent and have been described mainly among immunocompromised patients. The *Sporothrix schenckii* is accidentally introduced in the human or animal body through wounds caused by thorns, wood splinters or any sharp object contaminated by the fungus. Cat as domestic animals may transmit sporotrichosis to humans through scratches and/or bite due to the large amount of yeast found in the lesions and the possibility of these animals carry the agent under nails and oral cavity. The infection activates an immune and inflammatory response, modulated by purinergic signaling, which involves extracellular purines, purinergic receptors and ectoenzymes. The purines are an important class of extracellular molecules which by interacting with specific receptors on the cell surface signaling pathways that mediate many important biological effects. The signaling induced by these molecules is directly correlated to the activity of enzymes on the surface of the cell membrane, the ectoenzymes. The objective of this study was to evaluate the influence of sporotrichosis in the activity of ectoenzymes in platelets and its thrombus regulatory process. For this study, male *Wistar* rats were divided into 3 groups, where each group consisted of 10 animals (control, infected with clinical isolate of systemic action of *Sporothrix schenckii* and infected with clinical isolate of lymphocutaneous action of *Sporothrix schenckii*). After 28 days, blood was collected and the activity of certain ectoenzymes in platelets as well as the profile of platelet aggregation. The only change was observed in NTPDase activity, with an increase in ATP and ADP hydrolysis in platelets from rats experimentally infected with clinical isolate of lymphocutaneous action of *Sporothrix schenckii*. This change may be contributing to the reduction of extracellular ADP, which is responsible for the uncontrolled activation of platelets and trigger thrombogenic processes. Thus, it could also be protecting the body against the formation of thrombi and nodular lesions present in sporotrichosis. Then it is suggested that the purinergic system is involved in hemostasis and tromborregulação during infection by *Sporothrix schenckii*, avoiding excessive platelet aggregation and therefore the formation of thrombus.

Keywords: Sporotrichosis. Ectoenzymes. Platelet aggregation. Platelets

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Morfologias microscópicas de <i>S. schenckii</i>	16
Figura 2- Função dos linfócitos T <i>helper</i> (Th) 1 e Th2 e citocinas tipo 1 e tipo 2 na regulação da imunidade celular e humoral.....	19
Figura 3- Ativação plaquetária.....	22
Figura 4- Destino do ATP liberado: possível papel na quimiotaxia de leucócitos.....	26
Figura 5- Membros da família das NTPDases.....	27
Figura 6- Representação estrutural da família E-NPP	29
Figura 7- Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana.....	30
Figura 8- Degradação das purinas extracelulares por ectoenzimas na superfície celular.....	32

MANUSCRITO

Figure 1- NTPDase activity in peripheral blood platelets from control rats and infected with IL and IS of <i>Sporothrix schenckii</i> using ATP (A) ($P < 0.05^*$, $n=10$) and ADP (B) ($P < 0.01^{**}$, $n=10$). Bars represent means \pm SEM. One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc). *Indicates a significant difference compared with IS. **Indicates a significant difference compared with control group and IS.....	54
Figure 2- 5'- nucleotidase activity in peripheral blood platelets from control rats and infected with IL and IS of <i>Sporothrix schenckii</i> . Bars represent means \pm SEM ($n=10$). One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc).....	55
Figure 3- ADA activity in peripheral blood platelets from control rats and infected with IL and IS of <i>Sporothrix schenckii</i> . Bars represent means \pm SEM ($n=10$). One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc).....	56
Figure 4- NPP activity in peripheral blood platelets from control rats and infected with IL and IS of <i>Sporothrix schenckii</i> . Bars represent means \pm SEM ($n=10$). One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc).....	57
Figure 5- Platelet aggregation from control rats and infected with IL and IS of <i>Sporothrix schenckii</i> . Bars represent means \pm SEM ($n=10$). The results are expressed as percentage of aggregation. One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc)	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato

AMP: adenosina monofosfato

ATP: adenosina trifosfato

LDH: lactato desidrogenase

E-NTPDase: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

E-NPP: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

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

E-ADA: ecto-adenosina desaminase

IL-1: Interleucina-1

IL-2: Interleucina-2

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina-6

IL-12: Interleucina-12

IL-17: Interleucina-17

IL-21: Interleucina-21

IL-22: Interleucina-22

IL: Isolado clínico de ação linfocutânea de *Sporothrix schenckii*

INF- γ : Interferon-gamma

IS: Isolado clínico de ação sistêmica de *Sporothrix schenckii*

NK: *natural killer*

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

PRP: plasma rico em plaquetas

PPP: plasma pobre em plaquetas

SEM: erro padrão da média

Th1: T *helper* 1

Th2: T *helper* 2

Th17: T *helper* 17

TNF- α : fator de necrose tumoral-alpha

TNF- β : fator de necrose tumoral-beta

Ca²⁺: íon cálcio

Mg²⁺: íon magnésio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3 MANUSCRITO	34
4 CONCLUSÕES	59
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
6 ANEXOS	74
6.1 Anexo A- Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética.....	74

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada na seguinte forma: primeiramente é apresentada a introdução e os objetivos. A seguir, os resultados, discussão e conclusões são apresentados na forma de manuscrito, o qual foi escrito, seguindo-se as normas do periódico ao qual o mesmo foi submetido à publicação. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem no item introdução. A formatação atende a MDT de 2010 da UFSM.

1 INTRODUÇÃO

Sporothrix schenckii foi descrito pela primeira vez em 1898 por Benjamin Schenck. Após o isolamento deste fungo, o micologista Erwin Smith concluiu que o agente era um microrganismo do gênero *Sporotrichum*. Em 1900, Hektoen e Perkins classificaram como *Sporothrix schenckii* o agente etiológico da esporotricose (Hektoen & Perkins, 1900). Este fungo pertence à subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes* (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Entretanto, segundo Guarro, este fungo pertence à divisão *Ascomycota*, à classe *Pyrenomyces*, ordem *Ophiostomales*, e à família *Ophiostomataceae* (Guarro *et al.*, 1999; Marimon *et al.*, 2007). Além disso, segundo o *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS – número taxonômico serial: 181714) *S. schenckii* pertence à divisão *Ascomycota*, subdivisão *Pezizomycotina*, classe *Sordariomycetidae*, ordem *Sordariales*, família *Cephalothecaceae*, gênero *Sporothrix*, espécie *Sporothrix schenckii*.

A esporotricose é uma infecção subaguda ou crônica que afeta o homem e outros animais, e possui distribuição universal, com casos relatado nos EUA, Japão, México, Colômbia, Peru, Brasil, Sul da África, Índia, Austrália, entre outros (KAUFFMAN, 1999; PAPPAS *et al.*, 2000; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2001; MORRIS, 2002; WELSH *et al.*, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2006).

O fungo vive em solo rico em matéria orgânica, vegetação, cascas de árvores e em locais de clima quente e úmido, principalmente em regiões de climas tropicais, subtropicais e temperados (LACAZ *et al.*, 2002), sob a forma miceliana saprofítica (DA ROSA *et al.*, 2005). A temperatura do solo pode atingir 37°C nos países de clima tropical. Portanto, não se exclui a possibilidade de ser encontrada a fase de levedura naturalmente misturada a micélios no solo. Porém, é rara a descrição na literatura de isolados ambientais (STEENBERGEN *et al.*, 2004).

Fatores como a aeração, CO₂, pH, fonte de carbono e a presença de cátions divalentes podem influenciar a transição morfológica deste fungo (RODRIGUEZ-DEL VALLE *et al.*, 1983; ALSINA & RODRIGUEZ-DEL VALLE, 1984), no entanto, a temperatura é um fator determinante no dimorfismo (LOPES *et al.*, 2006), ou seja, a 37° C apresenta-se em forma de levedura, morfologia presente em lesões cutâneas.

Já a 25° C, apresenta-se sob a forma filamentosa ou conídio e esta é obtida através do cultivo in vitro (LIMA et al., 1999), como pode ser observado na Figura 1.

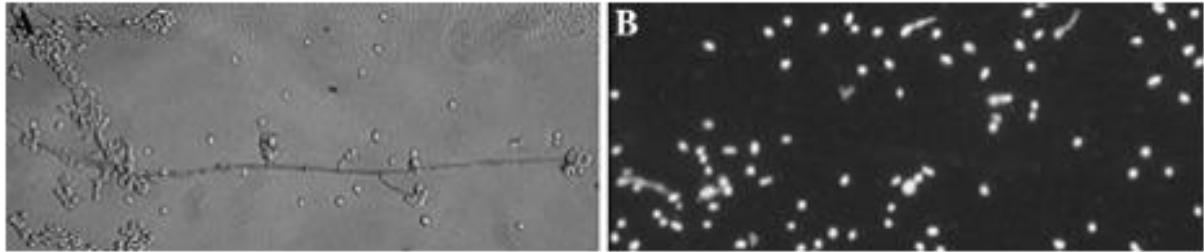


Figura 1- Morfologias microscópicas de *S. schenckii*. (a) conidióforos e conídios (25°C), lactofenol azul de algodão; (b) forma de levedura (37°C), calcofluor. Aumento de 400x. (CRISEO & ROMEO, 2010).

Na fase miceliana, o *S. schenckii* apresenta-se sob a forma de hifas septadas, com conídios oblongos, pequenos e unicelulares (MACKINNON et al., 1969), que podem ainda ser escuros ou hialinos, e são a forma infectante do fungo (KAUFFMAN, 1999). Já a fase leveduriforme, presente no sítio de infecção, apresenta-se como células fusiformes e ovóides tendo o aspecto semelhante a um “charuto” e se multiplica ativamente de acordo com o aumento e a gravidade das lesões (TAYLOR, 1970), por brotamento (KAUFFMAN, 1999). Os isolados clínicos do *S. schenckii* produzem colônias úmidas, elevadas, com sulcos ou dobras na superfície, variando sua coloração de branca a creme, tornando-se marrons, cinza-escuro a negras (LACAZ et al., 1998).

A inoculação do *S. schenckii* no organismo ocorre acidentalmente através de ferimentos causados por fômites que estejam contaminados pelo fungo, como espinhos e objetos pontiagudos (MORAES et al., 2008). Porém, outra forma bastante comum de infecção, é a transmissão zoonótica por gatos, cães, tatus, cavalos, porcos, pássaros e roedores (RIPPON, 1988; CONTI-DIAZ, 1989; REED et al., 1993; DA ROSA et al., 2005). Os gatos realizam a transmissão através de arranhões ou mordidas devido à grande quantidade de leveduras encontradas nas lesões e do transporte do agente ser nas unhas e cavidade oral (SCHUBACH & SCHUBACH, 2000; SOUZA et al., 2006). No Brasil, o número de pacientes que adquirem esporotricose por transmissão direta de gatos domésticos aumentou

significativamente, em especial no estado do Rio de Janeiro (SCHUBACH *et al.*, 2005).

Devido aos fatores que promovem o crescimento e a viabilidade do fungo, pessoas como camponeses, floricultores, pescadores, caçadores, entre outros, possuem maior risco de infecção (KAUFFMAN, 1999; MORRIS, 2002; DA ROSA *et al.*, 2005; LOPES, SCHUBACH e COSTA, 2006). Fatores como alcoolismo crônico, diabetes melitus, transplante de órgãos, doença pulmonar obstrutiva crônica, uso de fármacos imunossupressivos e infecção por HIV predispõem à aquisição de esporotricose (RAMOS & SILVA *et al.*, 2007).

As formas clínicas encontradas são: linfocutânea, cutânea fixa, extracutânea disseminada, pulmonar, osteoarticular, e outras formas raras (sistema nervoso central, olhos, pericárdica, laringea, glândula mamária, epidídimo, fígado, baço e medula óssea) (KAUFFMAN, 1999; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2003; PANG *et al.*, 2004; DA ROSA *et al.*, 2005; LOPES, SCHUBACH e COSTA, 2006) mais frequentemente encontradas entre pacientes imunocomprometidos (LIMA *et al.*, 1999; KONG *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2009)

Segundo Teixeira e colaboradores (2009), as diferenças entre as formas clínicas da esporotricose devem-se a distúrbios imunológicos. A resposta imune do hospedeiro, assim, determina o grau de invasão do fungo. No entanto, as variações na apresentação clínica da doença, também podem ser explicadas por fatores intrínsecos ao patógeno, tais como termotolerância e patogenicidade.

A termotolerância tem sido descrita como essencial na infecção por *S. schenckii*. Os isolados clínicos deste fungo, a partir de biópsia de tecidos extracutâneos, são capazes de crescer quando cultivados *in vitro* a 37 °C, enquanto que a maioria dos isolados cutâneos apresentam crescimento diminuído nesta temperatura, com cultivo limitado no máximo em 35 °C (SEIDENFELD *et al.*, 1982; TACHIBANA *et al.*, 2001). Kwon-Chung (1979) demonstrou que isolados clínicos de *S. schenckii*, de lesões linfocutâneas, foram capazes de crescer em altas temperaturas e após inoculação subcutânea, colonizar órgãos internos de camundongos. Contudo, isolados clínicos da forma cutânea fixa, não apresentaram crescimento a 37 °C e demonstraram menor potencial de invasão ao tecido.

Os estudos envolvendo inoculação intraperitoneal e intracardíaca evidenciaram que as lesões eram mais exacerbadas quando os camundongos eram

mantidos a baixas temperaturas (MACKINNON & CONTI-DÍAZ, 1962), sugerindo do mesmo modo a relação entre a termotolerância e a colonização do tecido.

Pouco se conhece sobre os fatores que contribuem para a virulência de *S. schenckii*. Entretanto, enzimas extracelulares e a capacidade de crescer a 37 °C e em pH fisiológico, são fatores de virulência deste fungo utilizados para invadir tecidos profundos assim como para a transição morfológica da forma saprofítica para a forma parasitária que é essencial para a patogenicidade de fungos dimórficos (HOGAN *et al.*, 1996; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Os mecanismos imunológicos de respostas aos fungos são, principalmente, de origem celular, e envolvem neutrófilos, macrófagos, linfócitos e, em menor extensão, as células NK (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1997). Os neutrófilos secretam substâncias que evitam o crescimento da hifa e a invasão da derme, restringindo sua localização às camadas superficiais da pele (BIER *et al.*, 1989). Também apresentam atividade fagocítica mais efetiva, enquanto que os macrófagos podem tê-la comprometida devido à composição química da parede celular do fungo, que possui quitina, lâminas insolúveis de fibrila resistentes à lise, sendo responsáveis pelo desencadeamento de lesões granulomatosas (CORBELLINI; ANICET; SCROFERNEKER, 1996). Estas lesões restringem o crescimento fúngico e confinam a infecção, conferindo proteção pelo efeito de macrófagos ativadas, que inibem o crescimento fúngico, pela encapsulação promovida pela fibrose e pela necrose, reduzindo a oferta de nutrientes e de oxigênio (RUBIN e FARBER, 1999; ZAITZ *et al.*, 1998; LACAZ *et al.*, 2002). A resposta humoral específica não está totalmente esclarecida, mas depende da produção de anticorpos por plasmócitos devidamente programados. Os fungos são pouco suscetíveis ao ataque de anticorpos, tendo eles apenas a função de opsonização (ZAITZ *et al.*, 1998; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Os macrófagos só conferem uma resposta imune protetora após serem ativadas por citocinas derivadas de linfócitos T, principalmente IFN- γ . Os macrófagos normais são incapazes de inibir a replicação dos fungos, porém quando ativadas por IFN- γ , são competentes para lisá-los (KIRKPATRICK, 1996; ZAITZ *et al.*, 1998).

Nas últimas duas décadas, a imunopatogênese de infecções fúngicas foi explicada primariamente em termos do balanço entre respostas Th1 e Th2 (Figura 2). Embora respostas Th1, dirigidas pelas citocinas IL-12 e IFN- γ , sejam responsáveis pela proteção principal contra fungos, outras citocinas e caminhos

estão surgindo, como por exemplo, o padrão de resposta Th17, que pode atuar em uma resposta exacerbada, antes atribuída a Th1, e ajudar a explicar a associação entre respostas crônicas inflamatórias e persistência fúngica (ROMANI, 2008).

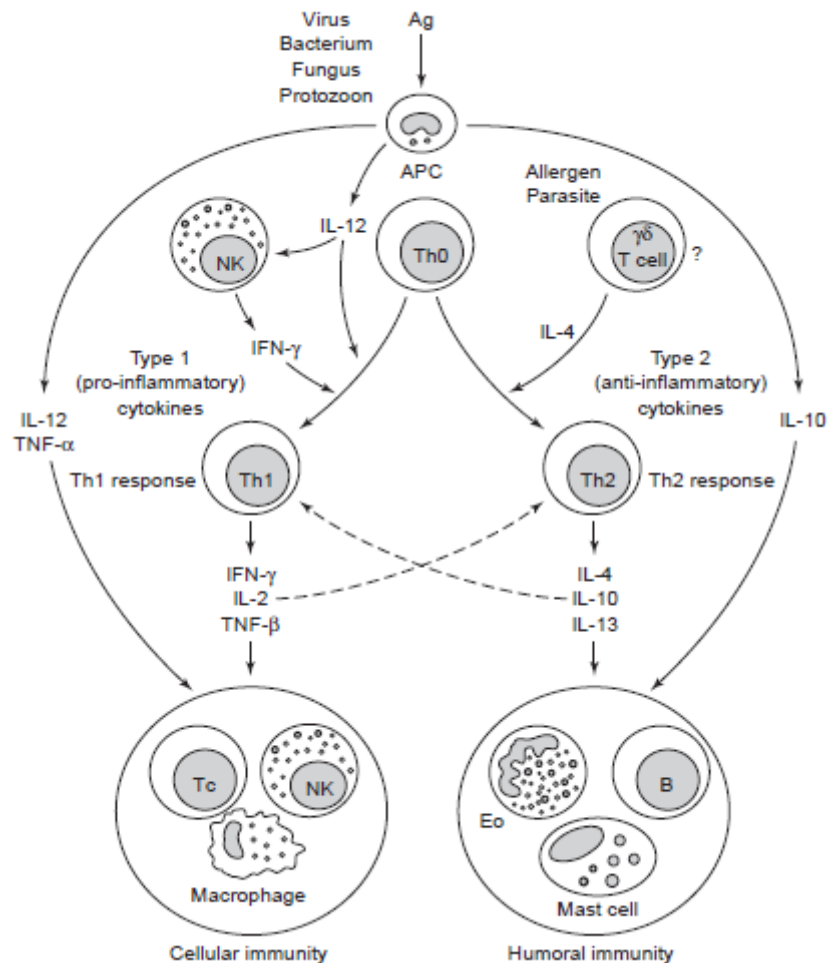


Figura 2 – Função dos linfócitos T *helper* (Th) 1 e Th2 e citocinas tipo 1 e tipo 2 na regulação da imunidade celular e humoral. Fonte: ELENKOV e CHROUSOS (1999, adaptado). Ag – antígeno. Eo – eosinófilo. APC – célula apresentadora de antígeno. NK – *natural killer*. Tc – linfócito T citotóxico.

Estudos realizados por Koga e colaboradores (2002), confirmaram a presença de células dendríticas em granulomas de indivíduos com esporotricose, e que estas atuavam na apresentação de antígenos e produção de IL-12 gerando uma resposta Th1. Tradicionalmente, as respostas mediadas por células Th1 produtoras de IFN-γ são consideradas as responsáveis por conferir imunidade protetora contra fungos,

enquanto respostas Th2, mediadas por IL-4, levam ao aumento da suscetibilidade a infecções fúngicas. Já as células Th17, produtoras de IL-17, compreendem uma nova subpopulação de células T com uma função na imunidade adaptativa ainda pouco compreendida (ROMANI, 2011). Entretanto, as citocinas derivadas da população de células Th17 (IL-17, IL-21, IL-22, TNF- α e IL-6) estão associadas com uma importante função protetora na imunidade contra vários agentes patológicos, incluindo bactérias e fungos e facilitando a ativação de neutrófilos (YE, et al., 2001; HUANG et al., 2004; BETTELLI et al., 2008; DEEPE & GIBBONS, 2009; CHAMILOS et al., 2010).

Os fungos patogênicos interagem com uma variedade de células hospedeiras durante o processo infeccioso. Para atravessar tecidos e causar uma doença invasiva esses microrganismos precisam transpor barreiras fisiológicas, invadindo células não fagocíticas como células epiteliais e endoteliais (PIZARRO-CERDA & COSSART, 2006).

O endotélio é uma monocamada contínua formada por células endoteliais ligadas umas as outras. Ele é versátil, multifuncional e possui papel importante na homeostase, como a regulação da trombose e trombólise, modulação do tônus vascular e fluxo sanguíneo, assim como na regulação das respostas imune e inflamatória (BALDWIN & THURSTON, 2001; SUMPIO et al., 2002).

Os microrganismos devem atravessar a barreira endotelial para disseminar e infectar diferentes órgãos e tecidos. Esse processo compreende adesão às células endoteliais, migração pelo endotélio e penetração na matriz subendotelial. Três diferentes mecanismos de interação de fungos com células endoteliais têm sido descritos: o primeiro mecanismo é a fagocitose do microrganismo por leucócitos que atravessam a célula endotelial (NADIR & KAUFSHTEIN, 2005). O segundo mecanismo é a passagem do fungo entre as células endoteliais (FIGUEIREDO et al., 2007). E o terceiro mecanismo é a endocitose do microrganismo pelas células endoteliais (KLOTZ *et al.*, 1983).

O *Sporothrix schenckii* coloniza, primariamente, o tecido subcutâneo e o sistema linfático, porém, pode ocorrer disseminação hematogênica (DAVIS et al., 2002). Estudos prévios mostraram que células de levedura de *S. schenckii* aderem às células endoteliais e diferente de outros patógenos, não resulta em dano celular. Entretanto, o mecanismo utilizado por este patógeno para invadir o hospedeiro, ainda não está bem esclarecido (FIGUEIREDO et al., 2004).

As plaquetas, ou trombócitos, após atravessar a barreira endotelial, são ativadas, pois possuem um importante papel na manutenção da integridade endotelial e hemostasia (SANTOS et al., 2008). Na membrana celular das plaquetas, composta por uma bicamada lipídica, estão presentes: glicoproteínas, proteínas adesivas, fosfolipídios (ZAGO et al., 2004), microtúbulos dispostos de maneira concêntrica na periferia, garantindo sua forma discóide e resistência a deformação (MESA & ALFONSO, 2000); um sistema de túbulos e vesículas, procedentes de invaginações da membrana, permitindo a comunicação com sua superfície, chamado de sistema canalicular aberto, que libera substâncias endógenas durante a ativação plaquetária (DAVEY, 1982) e membranas internas, derivadas do retículo endoplasmático, denominadas sistema tubular denso, que possui a função de estoque e liberação de cálcio, entre outras estruturas. No citoplasma encontra-se glicogênio e organelas como mitocôndrias e grânulos (HERBENER & DEAN, 1988).

Há quatro tipos de grânulos delimitados por membrana: grânulos alfa, lisossomos, microperoxissomos e grânulos densos ou gama. As proteínas dos grânulos alfa incluem fatores plaquetários específicos (fator V), proteínas plasmáticas (fibrinogênio e fibronectina) e proteínas sintetizadas pela própria plaqueta (trombospondina e fator de Von Willebrand) (ZAGO et al., 2004). Os grânulos densos contêm ADP, ATP, Ca^{2+} e serotonina (QAWI & ROBSON, 2000). Nestes grânulos estão presentes quase 60% do total de nucleotídeos da adenina das plaquetas. Porém, nucleotídeos da adenina também podem ser encontrados nas mitocôndrias e citoplasma plaquetários (HOLMSEN, 1985).

Sob condições fisiológicas normais, as plaquetas circulam em estreito contato com a mucosa das células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos (SALLES et al., 2008). Porém, quando o vaso sofre lesão, elas são ativadas e aderem aos sítios danificados (SANTOS et al., 2008). Geralmente, a ativação plaquetária, é iniciada pela exposição a um agonista plaquetário que se liga a receptores de superfície, desencadeando uma cascata de eventos bioquímicos. A trombina, o colágeno, o ADP, a epinefrina e o tromboxano A_2 , são estímulos fisiológicos para a ativação plaquetária. O ADP em baixas concentrações (0,1 a 1,0 μM) causa primeiramente uma agregação reversível, que é consequência do sinal de ativação do receptor (MESA & ALFONSO, 2000). A esta primeira fase, se segue uma segunda, que ocorre em altas concentrações de ADP (2 a 5 μM), na qual é irreversível e

dependente da síntese de tromboxano A₂ e é acompanhada da liberação do conteúdo dos grânulos alfa e densos (COLMAN, 1990).

A palavra “adesão” descreve a interação entre as plaquetas e qualquer outro tipo celular diferente, enquanto que “agregação” se refere exclusivamente à interação entre duas plaquetas (LOPEZ-FARRE, 2001). A agregação ocorre após a adesão e é definida como uma reação de plaquetas ativadas entre si (MESA & ALFONSO, 2000).

A hemostasia é a resposta fisiológica normal à injúria vascular na qual é composta por um conjunto de processos bem regulados que executam funções importantes, tais como manter o sangue em um estado fluido e livre de coágulos nos vasos e estar pronto para induzir o tampão hemostático rápido e localizado em um local de lesão vascular. Para isso, é necessário o funcionamento perfeito de três fatores: a integridade dos vasos, a presença de plaquetas em número e estado de funcionamento normal e o mecanismo de coagulação do sangue (GARCIA-NAVARRO, 2005).

O mecanismo de hemostasia primária ocorre quando há uma descontinuidade do endotélio, causada por lesão vascular, formando o tampão plaquetário. Concomitantemente, ocorre a adesão plaquetária, que induz a uma rápida transdução de sinal, desencadeando uma série de eventos. Entre estes podemos citar a ativação plaquetária, as mudanças no citoesqueleto associadas à alteração na conformação e expansão de pseudópodos, e a contração e secreção dos conteúdos granulares (CASTRO et al., 2006) (Figura 3).



Figura 3: Ativação plaquetária. Plaquetas em forma discóide (esquerda). Expansão dos pseudópodos (centro). Então, se espalham (direita). Adaptado de *Molecular Cell Biology*, Lodish, 5^o edição.

As plaquetas do tampão plaquetário liberam ADP, que é um potente indutor da agregação plaquetária. Durante a agregação, fatores do plasma sanguíneo, dos vasos lesados e das plaquetas promovem a interação seqüencial de cerca de 13 proteínas plasmáticas, formando assim o coágulo sanguíneo, mais consistente que o tampão plaquetário. O coágulo faz grande saliência para o interior do vaso, mas logo se contrai, graças à ação da actina, miosina e ATP das plaquetas. Protegida pelo coágulo, a parede do vaso se restaura pela formação de tecido novo. Então o coágulo é removido também pelas enzimas liberadas pelos lisossomos das plaquetas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Há estudos evidenciando a participação das plaquetas em doenças com componente inflamatório agindo na vasculatura, sugerindo sua participação na resposta inflamatória (MASSBERG et al., 2002), ou seja, quando o agente infeccioso causa lesão e ativação do endotélio, ocorre alteração na permeabilidade endotelial e aumento da adesão de leucócitos e de plaquetas (SATTAR et al., 2003). É importante ressaltar que a hiperatividade plaquetária pode levar à formação patológica de trombos e oclusão vascular (KEATING et al., 2004). Estes processos são modulados pela sinalização purinérgica, que envolve purinas extracelulares, receptores purinérgicos e ectoenzimas (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998), que por sua vez, são responsáveis pelo metabolismo do ATP. Elas atuam no sistema vascular através da tromborregulação, controlando a agregação plaquetária (YEGUTKIN, 2008).

É amplamente reconhecido que a sinalização purinérgica é um sistema envolvido em muitos mecanismos neuronais e não-neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2004). A sinalização purinérgica envolve três principais componentes que são os nucleotídeos e nucleosídeo da adenina; receptores purinérgicos específicos, através dos quais as purinas exercem seus efeitos; e as ectonucleotidases, responsáveis pelo controle dos níveis dessas moléculas no meio extracelular (ATKINSON et al., 2006).

Os nucleotídeos liberados do citoplasma, antes de serem metabolizados pelas ectonucleotidases, devem interagir com receptores específicos da membrana plasmática, os receptores purinérgicos P2 (DI VIRGILIO et al., 2001; KUNAPULI et al., 2003). Eles podem ser divididos em duas subclasses, acoplados a proteína G, chamados de P2Y e os ligados a canais iônicos, designados P2X. Ambos receptores

purinérgicos são estimulados por ATP (RALEVIC et al., 1998). Já os efeitos da adenosina são mediados através da sua ligação a quatro diferentes tipos de receptores, A1, A2A, A2B e A3, conhecidos como receptores P1. Todos os receptores são glicoproteínas transmembrana acopladas a proteína G (YAAR et al., 2005).

Os nucleotídeos extracelulares, ATP, ADP e AMP bem como o nucleosídeo adenosina, têm sido implicados em um grande número de funções fisiológicas (KUNAPULI & DANIEL, 1998; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). O ATP e o ADP podem ser liberados no corpo de diversas maneiras, como por exemplo, através da ativação plaquetária, pois são estocados nos grânulos densos; através de células musculares lisas e endoteliais que transportam nucleotídeos do citoplasma através da membrana; assim como através do rompimento de outras células, para desempenhar diversos efeitos sobre as plaquetas, células endoteliais, leucócitos e células vasculares lisas durante a lesão (KUNAPULI & DANIEL, 1998).

Em condições fisiológicas, os nucleotídeos são encontrados no meio extracelular em baixas concentrações (DI VIRGILIO et al., 2001). Nestas condições, o ATP extracelular, por exemplo, pode formar poros nas membranas celulares, resultando em mudanças osmóticas na célula (LEAL et al., 2005). Já em altas concentrações, pode atuar como uma molécula citotóxica e levar à morte celular, pela formação de grandes poros na membrana plasmática. Os nucleotídeos extracelulares como ATP e ADP não atravessam a membrana celular, mas podem realizar suas ações biológicas através de receptores específicos na superfície celular, denominados receptores purinérgicos (DI VIRGÍLIO et al., 2001). Os receptores purinérgicos são divididos baseado em suas propriedades farmacológicas e estruturais em três principais famílias (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998): receptores P2X, receptores P2Y e receptores P1. Em plaquetas, os nucleotídeos da adenina atuam através dos receptores purinérgicos P2X1 (receptor ionotrópico que leva ao rápido influxo de cálcio para o citosol), P2Y1 (receptor metabotrópico que mobiliza cálcio dos estoques internos, iniciando os processos de agregação) e P2Y12 (receptor acoplado à proteína G que estabiliza os agregados de plaqueta) (ANDRÉ et al., 2003).

O ATP extracelular pode exibir efeitos opostos dependendo da concentração, da célula e do receptor em que atua. Em baixas concentrações, o ATP induz a agregação, enquanto que em altas concentrações inibe esse fenômeno (SOSLAU &

YOUNGPRAPAKORN, 1997). É capaz de exercer efeitos sobre o sistema vascular tais como controle da proliferação celular em células endoteliais e musculares lisas, arritmia e apoptose (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003). Ainda, pode atuar como uma molécula sinalizadora no controle da inflamação e da resposta imune (DI VIRGILIO et al., 2001), assim como desencadear funções pró-inflamatórias nos neutrófilos, estimular a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- β , estimular a proliferação de linfócitos (BOURS et al., 2006) e ainda tem sido considerado como um inibidor da agregação plaquetária induzida por ADP (COADE & PEARSON, 1989). O ATP liberado no meio extracelular exerce seus efeitos ao se ligar a receptores P2X ou a P2Y. Os receptores P2X₁ respondem somente ao ATP, enquanto que os receptores P2Y, respondem ao ATP e a outros nucleotídeos, incluindo o ADP, o UTP e o UDP, mas não ao AMP (DI VIRGILIO et al., 2001).

O ADP é conhecido desde 1961 e não possui um papel definido nos linfócitos (DI VIRGILIO, 2001). Porém seu principal efeito funcional está relacionado com as plaquetas. O ADP é capaz de ativá-las e estimular a agregação plaquetária, parte importante do processo hemostático (BOARDER & HOURANI, 1998), pois quando é secretado pelos grânulos densos, amplifica a resposta de plaquetas induzidas por outros agonistas (CATTANEO & GACHET, 2001). Quando o ADP é liberado ao ambiente extracelular, interage com receptores metabotrópicos (P2Y) para desempenhar suas ações (DI VIRGILIO et al., 2001). Porém é necessário que haja um controle dos níveis extracelulares de ADP, para a regulação dos processos trombóticos e/ou hemorrágicos, o qual é modulado principalmente pela ação das ecto-nucleotidases (RALEVIC & BURNISTOCK, 2003).

O AMP é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP (BARSOTTI & IPATA, 2004) que exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio no metabolismo, servindo também como substrato para a formação da adenosina (CUNHA, 2001; LATINI & PEDATA, 2001).

A adenosina é tanto um precursor quanto um metabólito dos nucleotídeos da adenina. Algumas fontes de adenosina na circulação incluem o ATP e o ADP liberados das plaquetas, o AMP liberado pelos neutrófilos, o ATP liberado das células endoteliais e adenosina que é carregada das células sanguíneas para o plasma por transportadores de nucleosídeos (SHRYOCK & BELARDINELLI, 1997). Após ser liberada ao meio extracelular, a adenosina liga-se a receptores P1, que também são metabotrópicos (BURNSTOCK, 2007) e exerce vários efeitos em

diferentes processos fisiopatológicos, tais como proteção tecidual, diminuição da pressão arterial através da vasodilatação em casos de hipertensão, da proliferação celular e do aumento na expressão de fatores de crescimento endoteliais, (MUBAGWA et al., 1996; SHRYOCK & BELARDINELLI, 1997; RALEVIC & BURNSTOCK, 2003, BOROWIEC et al., 2006), propriedades anti-inflamatórias (CRONSTEIN, 1994), imunossupressoras, entre outras (SPYCHALA et al., 1997). Em plaquetas, a adenosina é conhecida por inibir a agregação induzida pelo ADP, tornando-se um agente protetor dos vasos e artérias (DUARTE et al., 2007).

Após exercer seus efeitos, os nucleotídeos precisam ser degradados para manter seus níveis extracelulares em concentrações fisiológicas. Um complexo multienzimático, formado por ectoenzimas, é responsável por essa hidrólise (ZIMMERMANN, 2001) (Figura 4). O sitio catalítico das ectonucleotidases está voltado para o meio extracelular. Elas são em geral, proteínas ligadas à membrana, porém isoformas extracelulares clivadas e solúveis também existe. A atividade catalítica máxima é adaptada ao meio extracelular e requer a presença de cátions divalentes, tais como cálcio ou magnésio, e um pH levemente alcalino. A principal ação funcional destas enzimas é o término da sinalização por nucleotídeos, acompanhado pela recaptção de purinas (ZIMMERMANN, 2000).

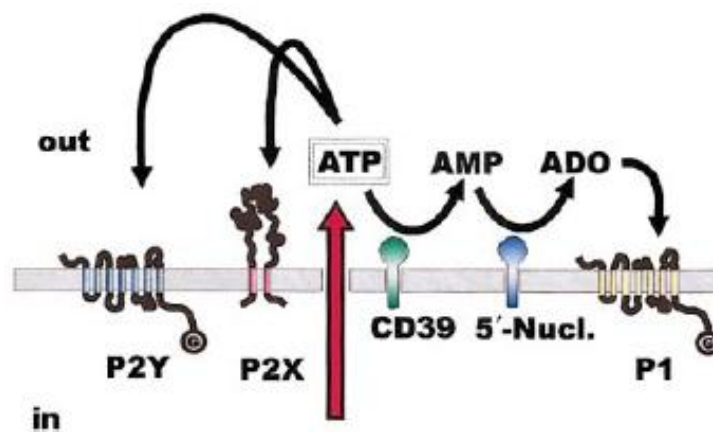


Figura 4- Destino do ATP liberado: possível papel na quimiotaxia de leucócitos. ATP liberado para o meio extracelular pode se ligar a receptor P2X ou PY para realizar suas funções e o restante é logo hidrolisado à ADP e em seguida à AMP pela CD39. AMP hidrolisado à adenosina pela 5'-nucleotidase (DI VIRGILIO, et al. 2001).

A cascata purinérgica é iniciada pela enzima Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDases, CD39, apirase, ATP-difosfohidrolase, E.C 3.6.1.5), a qual faz parte da família das NTPDases. Este termo é usado para designar uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001). Essa classe de enzimas inclui oito membros, que diferem quanto à especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; BIOGENNESE et al., 2004), na qual quatro estão localizados na membrana celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular (NTPDase 1, 2, 3, 8); e quatro exibem uma localização intracelular (NTPDase 4,5,6,7) (ROBSON et al., 2006) (figura 5).

A função geral da NTPDase têm sido atribuída à hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP e ADP e, dependendo da localização tecidual, a atividade enzimática possui diferentes papéis fisiológicos (SARKIS et al., 1995; ZIMMERMANN, 1999; BONAN et al., 2001).

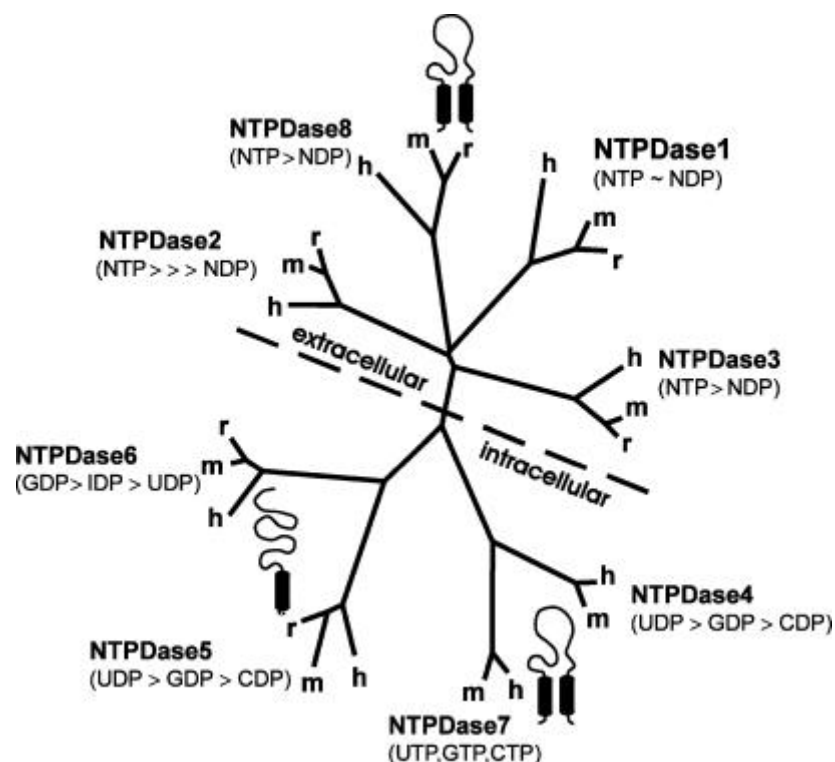


Figura 5 - Membros da família das NTPDases (Adaptado de ROBSON et al., 2006).

As quatro formas localizadas na superfície celular (NTPDase 1,2,3,8) podem ser diferenciadas de acordo com a preferência pelo substrato, uso de cátion divalente e formação de produto. Todas as NTPDases localizadas na superfície requerem Ca^{2+} ou Mg^{2+} para sua máxima atividade (ZIMMERMANN, 2001; KUKULSKI et al., 2005). Estas enzimas apresentam um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões que são conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACRs), as quais são de extrema importância para a atividade catalítica (ZIMMERMANN, 1999) e estão envolvidas no reconhecimento do substrato, ligação e hidrólise (KIRLEY et al., 2006).

A primeira NTPDase identificada foi a NTPDase-1, que está ancorada à membrana via dois domínios transmembrana e que hidrolisa os nucleotídeos ATP e ADP em proporções semelhantes. Uma expressão abundante foi encontrada no endotélio vascular, nas células da musculatura lisa, no pâncreas, nas células dendríticas e em células sanguíneas como linfócitos, plaquetas e eritrócitos, bem como no plasma (FRASSETTO et al., 1993; SARKIS et al., 1995; PILLA et al., 1996; ZIMMERMANN, 2001; YEGUTKIN, 2008). A NTPDase-2 é associada ao sistema nervoso central e periférico. A NTPDase-3 é associada com estruturas neuronais, agindo na regulação dos níveis de ATP pré-sinápticos (YEGUTKIN, 2008). Já as NTPDases 4, 5, 6 e 7 estão localizadas no meio intracelular (ZIMMERMANN, 2001).

Dando continuidade à cascata purinérgica, a família das NPPs (E.C. 3.1.4.1) é composta por sete membros (NPP1-7) (Figura 6), numerados de acordo com sua ordem de descoberta (STEFAN, et al., 2005). Esses membros estão envolvidos em múltiplos papéis fisiológicos na qual incluem a formação de ossos, a motilidade celular, as metástases tumorais, resistência à insulina em diabetes do tipo II, reciclagem de nucleotídeos e modulação da sinalização purinérgica (GODING et al., 2003; STEFAN et al., 2006). Somente os três primeiros membros dessa família, NPPs1-3, são capazes de hidrolisar nucleotídeos (STEFAN et al., 2006) e estas são encontradas em quase todos os tecidos (BOLLEN et al., 2000)

Todas NPPs apresentam, voltado para o meio extracelular, um domínio catalítico com 60% de identidade de aminoácidos entre as diferentes isoformas da enzima (STEFAN et al., 2005; STEFAN et al., 2006). Elas são metaloenzimas e sua atividade pode ser bloqueada por quelantes de metais, sendo que a atividade pode ser restaurada pela adição de cátions divalentes como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}

(BOLLEN et al., 2000). Esta enzima foi caracterizada em plaquetas de ratos, apresentando atividade catalítica adaptada para o meio extracelular e pH ideal entre 8.5 - 9 (FÜRSTENAU et al., 2006). O p-nitrofenil- 5'-timidina-monofosfato (p-Nph-5'-TMP) é usado como substrato artificial específico (SAKURA et al., 1998).

Após a hidrólise de ATP e ADP pela NTPDase, a ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) será responsável pela hidrólise de AMP. Esta é uma enzima que está ancorada à membrana plasmática com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (figura 7). Entretanto, formas solúveis e clivadas desta enzima também já foram descritas (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER et al., 2005).

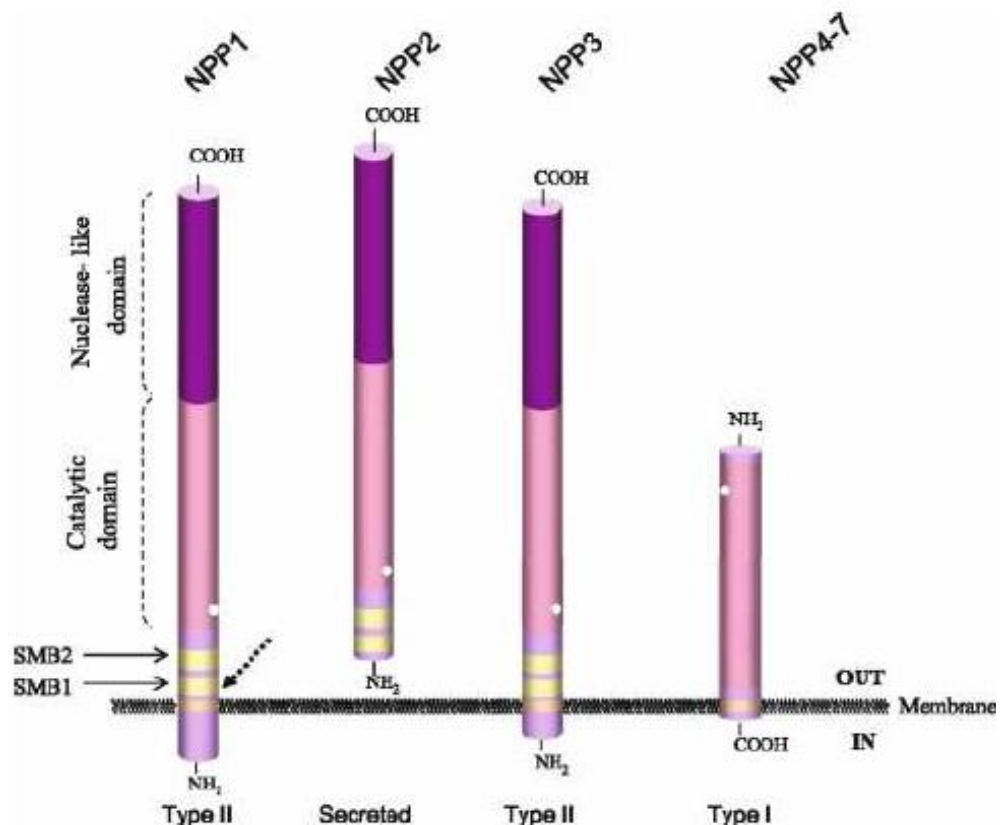


Figura 6: Representação estrutural da família E-NPP (STEFAN et al., 2006).

Esta enzima catalisa a desfosforilação de vários nucleotídeos 5'-monofosfatados como UMP, GMP e AMP a seus respectivos nucleosídeos (ZIMMERMANN, 1996). Porém, foi comprovado que a 5'-nucleotidase hidrolisa mais eficazmente o AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela

formação de adenosina (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN et al., 1998; ZIMMERMANN, 2001). Ela participa do metabolismo dos nucleotídeos da adenina, atuando juntamente com as NTPDases e NPPs, convertendo o AMP, resultante da hidrólise do ATP e ADP, à adenosina. A atividade catalítica desta enzima controla os níveis intracelulares e extracelulares de AMP e adenosina (KAWASHIMA, 2000). Assim, de acordo com a sua localização tecidual, ela desempenha importantes funções como, por exemplo, no controle da agregação plaquetária, na regulação do tônus vascular e também na neuromodulação e neuroproteção do sistema nervoso (ZIMMERMANN et al., 1998; KAWASHIMA et al., 2000; DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

Ecto-5' - Nucleotidase



Figura 7: Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana (ZIMMERMANN, 2001).

Dando seqüência na cascata enzimática, a adenosina desaminase (ADA) (E.C. 3.5.4.4.) é de suma importância no metabolismo das purinas, pois ela catalisa a desaminação irreversível da adenosina em inosina (RESTA et al., 1998; ROBSON et al., 2006). Em humanos, já foram descritas duas formas moleculares da ADA. São elas a ADA1 e a ADA2, que se diferenciam por características como peso molecular, propriedades cinéticas e distribuição tecidual (HIRSCHHORN & RATECH, 1980; UNEGERER et al., 1992). A ADA1 está presente em todos os tecidos humanos, apresentando alta atividade em linfócitos e monócitos, e representa a maior parte da atividade da ADA total, enquanto que a ADA2 é a isoenzima predominante no soro e

representa a menor parte da atividade da ADA total em tecidos (ZUKKERMAN et al., 1980).

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

Diversos estudos garantem que mudanças na atividade da ADA refletem alterações na imunidade (ADAMS et al., 1976; FISCHER et al., 1976; UNGERER et al., 1992). Ela tem sido aceita como uma importante enzima na maturação e função dos linfócitos T, relacionando-se com proliferação e diferenciação linfocítica (GALANTI et al., 1981). Iwaki-Egawa e colaboradores (2006) propuseram que a ADA2 pode desempenhar um importante papel na regulação da proliferação celular, pois sua presença no plasma humano pode ser através da secreção por monócitos ativados em processos inflamatórios.

A elevada atividade da ADA no soro tem sido encontrada em pacientes com doenças onde a imunidade celular é estimulada. Por exemplo, atividade da ADA 1 está elevada em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (RATECH et al., 1988) e em pacientes com hepatite aguda (KOBAYASHI et al., 1993). Em contraste, a atividade da ADA 2 está aumentada em pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (GAKIS et al., 1989).

Como a ADA é responsável pelo controle dos níveis de adenosina no soro, acaba por estar intimamente relacionada com os processos de tromborregulação, já que a adenosina, metabólito dos nucleotídeos da adenina, pode levar à inibição da agregação plaquetária, dependendo de seus níveis no meio extracelular (MALDONADO et al., 2008). Junto com a rota catabólica da cascata purinérgica que age como um mecanismo de degradação de nucleotídeos extracelulares, há uma via oposta (anabólica) (Figura 8), que tem como propósito reconstituir o pool de ATP extracelular pela enzima adenilato quinase (EC2.7.4.3), uma vez que os nucleotídeos extracelulares ATP e ADP assim como o nucleosídeo adenosina, são importantes moléculas de sinalização da vasculatura através da ativação e agregação de plaquetas em locais de lesão vascular (YEGUTKIN et al., 2002).

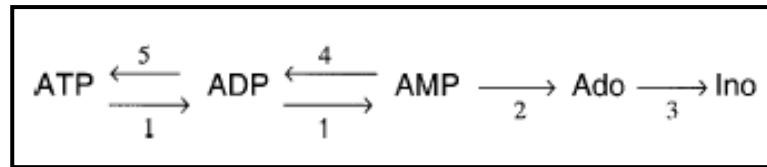


Figura 8: Degradação das purinas extracelulares por ectoenzimas na superfície celular. O esquema mostra a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, bem como a conversão irreversível de adenosina (Ado) em inosina (Ino). (1) NTPDase/CD39 (EC 3.6.1.5); (2) ecto-5'-nucleotidase/CD73 (EC 3.1.3.5); (3) adenosine desaminase (EC 3.5.4.4); (4) adenilato quinase (EC 2.7.4.3); (5) NDP quinase (EC 2.7.4.6). (Adaptado de YEGUTKIN et al., 2002).

Considerando que a resposta vascular desencadeada pela infecção causada por *Sporothrix schenckii* é modulada por moléculas sinalizadoras do sistema purinérgico, é de grande relevância avaliar a influência da esporotricose na atividade das ectoenzimas em associação com o perfil de agregação plaquetária, uma vez que estas apresentam importante papel na manutenção da hemostasia e controle da tromborregulação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da esporotricose na atividade de ectoenzimas em plaquetas e seus processos tromborregulatórios.

2.2 Objetivos Específicos

Em ratos infectados com isolados clínicos de ação sistêmica e de ação linfática de *Sporothrix schenckii*:

- Determinar a atividade das enzimas NTPDase, 5'- nucleotidase, ADA e NPP em plaquetas;
- Verificar o perfil de agregação plaquetária induzida pelo ADP.

3 MANUSCRITO

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

O manuscrito está submetido à revista Research in Microbiology.

NTPDase activity in platelets in experimental sporotrichoses

Bruna Cipolatto Rocha^a, Lívia Gelain Castilhos^a, Karine Bizzi Schlemmer^c, Cristiano Bicca Noal^a, Viviane do Carmo Gonçalves Souza^b, Jeandre Augusto dos Santos Jaques^b, Daniele Carvalho de Oliveira^c, Marcio Machado Costa^d, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes^d, Claudio Alberto Martins Leal^b, Sydney Hartz Alves^{a,c}, Daniela Bitencourt Rosa Leal^{a,b*}

a) Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

b) Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Laboratório de Enzimologia Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

c) Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

d) Centro de Ciências Rurais, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

bruna_cipolatto@hotmail.com

liviagelain@hotmail.com

kabizzi@hotmail.com

crisnoal2005@yahoo.com.br

vicgsouza@yahoo.com.br

jeandreaugusto@hotmail.com

daniele_caroli@yahoo.com.br

marmcvet@yahoo.com.br

sonia@smail.ufsm.br

camleal@terra.com.br

hartzsa@smail.ufsm.br

dbitencourtrosaleal@gmail.com *Correspondence and reprints

Corresponding author:

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

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

Prédio 20 – Sala 4102

Phone: + 55 55 32209581

Abstract

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by *Sporothrix schenckii*, a cosmopolitan dimorphic fungus that affects humans and several animals. Temperature is a factor for dimorphism appearance. At 37°C it appears as yeast present in skin lesion and at 25°C it appears as filaments or conidia usually present in the environment. The infection activates an immune and inflammatory response, which is modulated by purinergic signaling involving extracellular purines, purinergic receptors, and ectoenzymes. The aim of this work was to assess the activity of the enzymes involved in the hydrolysis of adenine nucleotides and nucleosides (E-NTPDase, 5'-nucleotidase, NPP and ADA) present in platelets of rats experimentally infected with two different clinical isolates of *S. schenckii*. Also, we evaluated the profile of the platelet aggregation involved. Eight-week male *Wistar* rats were divided into three groups (n = 10): control (C), infected with clinical isolate of systemic action (IS) and infected with clinical isolate of lymphocutaneous action (IL) of *S. Schenckii*. Clinical isolates were obtained from the mycology collection at Mycology Research Laboratory (LAPEMI-UFSM). Inoculant clinical isolates were composed of a conidial suspension in water for injection and performed intraperitoneally. After 28 days of inoculation, we evaluated the enzymatic activity of NTPDase, 5'-nucleotidase, NPP and ADA as well as the profile of platelet aggregation. As a result, we observed an increase in the NTPDase activity in the IL group. The ATP hydrolysis ($p < 0.05$, $n = 10$) increased approximately 17% and 25% in the IL group when compared with the control and IS groups, respectively. The ADP hydrolysis ($p < 0.01$, $n = 10$) showed to be increased at about 11% and 18% in the IL group when compared with the control and IS groups, respectively. There was no significant difference in the activity of 5'-nucleotidase, NPP or ADA nor in the profile of platelet aggregation between the groups. The increase in the NTPDase activity is likely to be part of a possible mechanism to maintain the homeostasis, since it degrades over ATP generated by cellular damage and consequently leads to a decrease in extracellular concentrations of ADP. In conclusion, the increase in the enzyme activity contributed to protect the organism from the infected animals against thrombus formation and nodular lesions present in sporotrichosis, since ADP has an important aggregation effect and uncontrolled activation of platelets, leading to thrombogenic processes.

Keywords: Sporotrichosis, *Sporothrix schenckii*, platelets, NTPDase, ADA, NPP, 5'-Nucleotidase

1 Introduction

Sporotrichosis is a subacute or chronic infection that affects humans and other animals caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. This infection has been considered the most common subcutaneous mycosis in Latin America. It has a worldwide distribution with cases reported in the U.S., Japan, Mexico, Colombia, Peru, Brazil, South Africa, India, Australia, among other countries (KAUFFMAN, 1999; PAPPAS et al., 2000; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2001; MORRIS, 2002; WELSH et al., 2002; QUEIROZ et al., 2003; LOPES et al., 2006).

Dimorphism of *S. schenckii* is determined by temperature. At 37°C it is present as yeast, morphology present in skin lesions, whereas at 28°C it is present in the form filaments or conidia achieved through *in vitro* culture (LIMA et al., 1999). *S. schenckii* is found in soil and plants thus people related to certain occupations that involve gardening techniques, floriculture and agriculture are part of the population at risk (MORRIS, 2002).

Sporotrichosis is presented in clinical forms such as lymph, fixed, disseminated, cutaneous, pulmonary, and osteoarticular as well as some other rare forms, such as central nervous system, eye, pericardium, larynx, mammary gland, epididymis, liver, spleen and bone marrow (KAUFFMAN, 1999; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2001; QUEIROZ et al., 2003; PANG et al., 2004; DA ROSA et al., 2005; LOPES et al., 2006; KAUFFMAN et al., 2007). According to Teixeira et al (2009), the difference between these clinical forms is due to immune disorders and the host immune response, which determines the degree of invasion of the fungus. However, variations in the clinical presentation of this disease can also be explained by factors intrinsic to the pathogen, such as thermotolerance and pathogenicity.

The infection activates an immune and inflammatory response, which is modulated by purinergic signaling composed of extracellular purines, purinergic receptors and ectoenzymes. Extracellular purines (ATP, ADP and adenosine), secreted by white blood cells, platelets and damaged endothelial cells represent an important class of extracellular molecules which interact with their specific receptors called purinergic. On the cell surface, they signal pathways of great importance that mediate various biological effects, such as immune response, platelet aggregation, inflammation and pain (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998).

ATP induces an extremely rapid influx of calcium from the extracellular medium associated with platelet shape change (MAHAUT-SMITH et al., 2004). ADP plays crucial roles in the physiological process of homeostasis and in the development and extension of arterial thrombosis (BORN, 1985). When compared with strong agonists such as thrombin or collagen, ADP is, by itself, a weak agonist of platelet aggregation inducing only reversible responses. However, when ADP is stored at a very high concentration in platelet dense granules and released upon activation at sites of vascular injury, it constitutes an important so-called secondary agonist, which greatly amplifies most of the platelet responses and contributes to the stabilization of thrombus (MUSTARD et al., 1975; JONES et al., 2011). Born and his co-workers (1964) found that adenosine is a strong inhibitor of ADP-induced aggregation *in vivo* as well as *in vitro*. The signaling induced by these molecules is directly correlated to the activity of enzymes located on the surface of the cell membrane that regulates the concentrations of extracellular nucleotides in tissues (ZIMMERMANN, 1996).

After nucleotides exert their functions, they are hydrolyzed by a multienzyme system in order to maintain the extracellular levels at the physiological concentration avoiding purinergic receptor desensitization. These enzymes include ectonucleotidases from distinct families, such as the NTPDase (EC 3.6.1.5, CD39), NPP (EC 3.1.4.1), and 5'-Nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73). These ectoenzymes are responsible for the hydrolysis of ATP, ADP and AMP until the formation of adenosine, which, in turn, is converted into inosine by ADA ectoenzyme (EC 3.5.4.4) (ZIMMERMANN, 2000). There have been no changes of these enzyme activities under several pathophysiological conditions such as diabetes mellitus, multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis (LUNKES et al., 2003; SPANEVELLO et al., 2010; BECKER et al., 2010).

Considering that ectoenzymes play an important role in homeostasis maintenance and there are few studies establishing the relationship between the purinergic system and mycosis caused by *Sporothrix schenckii*, this study aimed to investigate the involvement of the purinergic system in thrombus regulation during sporotrichosis, determining the enzyme activity of E-NTPDase, E-5'-nucleotidase, E-ADA and E-NPP in the platelet experimental model.

2 Material and methods

2.1 Reagents

The substrates ATP, ADP, AMP, p-nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate(p-Nph-5'-TMP), adenosine as well as Trizma base, sodium azide, HEPES and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Bovine serum albumin and K₂HPO₄, was obtained from Reagen. All the other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

2.2 Animals

Eight-week-old male Wistar rats (n=30) weighing an average of 160 g from the Central Animal House of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) were used. Animals were kept under a temperature range between 21-22°C and 60-65%, relative humidity with 12/12 h light and dark cycle. The protocol was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee under the number 102/2010. The handling and care of animals were performed according to the Manual on the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian Society of Science in Animal of Laboratory (COBEA, 2003).

2.3 Preparation and inoculation of *Sporothrix schenckii*

Two different clinical isolates of *Sporothrix schenckii* were used in the experiment: one was of systemic action and the other of lymphocutaneous action. Clinical isolates were collected, identified and stored in an appropriate culture medium (potato agar with chloramphenicol) by the LAPEMI mycology collection (Laboratory of Mycology Research). Inocula of the clinical isolates were composed of a spore suspension in water for injection, prepared from potato cultivation in agar for 7 days at 25°C containing a total of 3x10⁶ colony forming units (UFC) in 1.5 mL. Rats were divided into three groups (n=10): control (C), infected with clinical isolate of systemic action (IS), and infected with clinical isolate of lymphocutaneous action (IL). We added 1 mL via intraperitoneal of inoculum corresponding to the respective treatment group and the control group was added 1 mL of 0.9% saline at 25°C.

2.4 Preparation of biological samples

Rats were anesthetized with isoflurane and blood was collected by cardiac puncture and transferred to tubes containing 0.129 M sodium citrate as anticoagulant. After euthanasia, a small sample of liver, spleen, lung and testis was removed from each rat for the examination for the mycological evidence of mycosis.

2.5 Isolation of platelets

Platelets were prepared from rats by the method of Pilla et al. (1996) modified by Lunkes et al. (2003). Briefly, blood was collected into 0.129 M citrate and centrifuged at 160 g for 15 min. The platelet-rich plasma was centrifuged at 1400 g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES isosmolar buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. Washed platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer and protein was adjusted to 0.4–0.6 mg/mL and used to determine enzymatic activities. The integrity of the platelet preparation was confirmed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer).

2.6 NTPDase and 5'-nucleotidase activity

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM tris- HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μL as describe by Lunkes et al. (2003). For AMP hydrolysis, the 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, except that the 5 mM CaCl_2 was replaced by 10 mM MgCl_2 . Twenty microliters of platelets (8-12 μg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubation proceeded for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM, and AMP at a final concentration of 2 mM, and the time of incubation was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 μL of 10% 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 KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out to correct for nonenzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation 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 Adenosine deaminase (ADA) activity

ADA activity from platelets was determined according to Giusti and Galanti (1984) which is based on the direct measurement of the formation of ammonia, produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Briefly, 50 μ L of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37 °C for 60 min. The protein content used for the platelet experiment was adjusted between 0.7 and 0.9 mg/mL. 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 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

2.8 E-NPP activity

The E-NPP activity from platelets was assessed using p-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (p-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Fürstenau et al. (2006). The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose and 5.0 mM CaCl₂, pH 8.9, was preincubated with approximately 20 μ g per tube of platelet protein for 10 min at 37°C to a final volume of 200 μ L. The enzyme reaction was started by the addition of p-Nph-5'-TMP at a final concentration of 0.5 mM. After 80 min of incubation, 200 μ L NaOH 0.2N was added to the medium to stop the reaction. The amount of p-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of 18.8x 10⁻³M/cm. Enzyme activity was expressed as nmol of p-nitrophenol released/min/mg protein.

2.9 Platelet aggregation

Platelet aggregation was measured by the method of Born and Cross (1963) by turbidimetric measurement with a Chrono-log optical aggregometer, with AGGRO/LINK® Model 810-CA software for Windows version 5.1. The preparation of platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of blood for 20 min at 1000 g and the preparation of platelet poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation of the sample by 3700 g for 30 min. After calibration of the aggregometer, data concerning the assays and reagents were entered on a computer coupled to the equipment, and the patient's test was then performed. Aggregation was measured at 37°C and expressed as the maximal percent change in light transmittance from

baseline at 5 min after the addition of the agonist ADP at concentration of 10 μ M, with platelet poor plasma as a reference. Results were expressed as percentage of aggregation.

2.10 Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue Method using bovine serum albumin as standard as described by Bradford (1976).

2.11 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls Multiple Comparison Test. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference among the analyses used. All data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3 Results

3.1 Mycological examinations

In order to prove the infection in animals, mycological examination was performed in some organs (lung, liver, spleen, and testis) 28 days after the inoculation. In the control group, all samples were negative for mycosis. In the group infected with clinical isolate of systemic action, all samples obtained tested positive for mycosis in the four organs collected. However, in the group infected with clinical isolate of lymphocutaneous action, 1 sample obtained a positive result in the lung, liver, spleen and testis, 3 in the lung and testis, 2 in the liver and testis, and 4 in the testis.

3.2 NTPDase activity

Figure 1 shows the results obtained for E-NTPDase activity by ATP and ADP hydrolysis. Post hoc analysis revealed in ATP hydrolysis (Fig. 1A) an increase of 17% and 25% in the activity of NTPDase in infection by IL, when compared with control and IS, respectively. Control, IL, and IS groups presented 1.28 ± 0.05 , 1.49 ± 0.10 ($p < 0.05$, $n = 10$), and 1.19 ± 0.04 nmol Pi/min/mg of protein, respectively. In the hydrolysis of ADP (Fig. 1B), there was an increase of 11% and 18% in rats with IL, compared with control and IS, respectively. Control, IL, and IS groups had 1.32 ± 0.03 , 1.47 ± 0.05 ($p < 0.01$, $n = 10$), and 1.25 ± 0.02 nmol Pi/min/mg of protein, respectively. Values were transformed to log in order to use a parametric statistical method.

3.3 Determination of 5'-nucleotidase activity

Results of 5'-nucleotidase enzymatic activity in platelets are presented in Figure 2. Control, IL and IS groups presented 6.66 ± 1.17 , 7.37 ± 1.31 and 6.74 ± 1.25 nmol Pi/min/mg of protein, respectively. As can be observed, there was no significant difference between the groups ($P > 0.05$, $n = 10$).

3.4 Determination of ADA activity

Figure 3 shows the results obtained for results of ADA enzymatic activity in platelets. Control, IL, and IS groups presented 2.93 ± 0.48 , 5.97 ± 0.81 , and 5.77 ± 1.15

U ADA/mg of protein, respectively. As can be observed, there was no significant difference between the groups ($P>0.05$, $n=10$).

3.5 Determination of E-NPP activity

Results obtained for the E-NPP activity are shown in Fig. 4. Control, IL, and IS groups presented 1.02 ± 0.25 , 0.87 ± 0.18 , 1.01 ± 0.24 nmol of p-nitrophenol released/min/mg protein, respectively. Post hoc analysis showed that there was no significant difference between the groups ($P>0.05$, $n=10$).

3.6 Platelet aggregation

Figure 5 presents the results obtained for platelet aggregation using ADP as an agonist. Control, IL, and IS groups showed 43.5 ± 6.06 , 40 ± 7.77 , and 39.25 ± 6.5 percent of aggregation, respectively. As can be seen neither IS nor IL differed from control ($P>0.05$, $n=10$).

4 Discussion

In this study, we evaluated the implication of enzymes called ectonucleotidases in platelets in infection processes by dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*, which causes sporotrichosis. Davis and colleagues (2002) stated that subcutaneous tissue and the lymphatic system are the first places colonized by this fungus; however, hematogenous spread may occur. Figueiredo and colleagues (2004) showed that endothelial cell invasion by *S. schenckii* does not result in cell damage. Later in 2007, Figueiredo and colleagues suggested a mechanism where the fungus crosses the endothelial monolayer on a route modulated by cytokines. However, the mechanism used by this pathogen to invade the host is not still well understood.

The important role in endothelial integrity maintenance as well as thrombus regulation process control are closely related to platelets or thrombocytes (MASSBERG et al., 2002) meaning that platelet hyperactivity may lead to pathological thrombus formation and vascular occlusion (KEATING et al., 2004). The intact endothelium prevents platelet adhesion in the intracellular matrix (GAWAZ, 2006); however, when there is damage and activation of the endothelium, a change in endothelial permeability and increased leukocyte adhesion and platelet occur (SATTAR et al., 2003).

Molecules of infectious agents are recognized by the innate immune system causing an inflammatory response that is essential to control early infection (FIGUEIREDO et al., 2011). These processes are modulated by purinergic signaling which involves extracellular purines, ectoenzymes and purinergic receptors (RALEVIC and BURNSTOCK, 1998). Ectoenzymes are responsible for ATP metabolism. They act on the vascular system by hemostasis and thrombogenesis maintenance, especially regulating platelet aggregation (YEGUTKIN, 2008).

In the vascular system, NTPDase plays an important role in haemostasis since it controls the pro-inflammatory and pro-thrombotic nucleotides such as ATP and ADP, preventing clot and vascular occlusion (YEGUTKIN, 2008). The assessment of this enzyme activity revealed that ATP and ADP hydrolysis was increased in platelets of rats infected with clinical isolate of lymphocutaneous action *S. schenckii*. This could lead to the consumption of high extracellular ATP levels, thereby inducing an anti-inflammatory response and consequently to high levels of extracellular AMP, since

low-level purinergic signaling induced by nucleotides at decreased concentrations modulates ongoing inflammatory and immune responses by P2 receptors.

Platelets may also play an important role in inflammation and may influence the phenotype of other blood cells and blood vessels thus contributing with several other non hemostatic disorders, such as cystic fibrosis, rheumatoid, diabetes, atherosclerosis and cancer (JAIN et al., 2010; BOILARD et al., 2010). The increased activity of NTPDase helps to regulate ADP extracellular levels released during platelet activation, since this nucleotide, at high levels, is capable of promoting the recruitment of platelets to the site of vascular lesion, platelet aggregation and thrombus formation (ROZALSKI et al., 2005). Thus, we suggest that the possible reduced levels of extracellular ADP contribute to the process of thrombus regulation in sporotrichosis.

Changes in NTPDase activity may also be observed in other diseases, such as diabetes mellitus (LUNKES et al., 2003) and multiple sclerosis (SPANEVERELLO et al., 2010), as well as in physiological situations such as pregnancy (LEAL et al., 2007) suggesting this is an important physiological and pathological parameter. Becker et al (2010) found an increase in ATP and ADP hydrolysis by NTPDase in platelets of patients with rheumatoid arthritis when compared with the control group. This situation reflects an organic compensatory response in order to regulate the concentrations of the nucleotide in the extracellular environment, which were significantly decreased in the serum of these patients with rheumatoid arthritis. Such decrease was associated with the increased metabolism of the enzyme.

In the experiment performed by Bach and colleagues (2010), they verified the activity of NTPDase in lymphocytes of rabbits inoculated with zoospores of *P. Insidiosum*. An increase in the enzyme activity related to the ATP hydrolysis was observed leading to a decrease in the concentration of extracellular ATP. In low concentrations it has an affinity for P2Y purinergic receptors on the lymphocytes surface, stimulating Th2 immune response and leading to subsequent production of IL-4 and activation of eosinophils and mast cells, causing significant lesions in tissues. Some evidence shows the activation of platelets in diseases with inflammatory component (MASSBERG et al., 2002). It is known that activated platelets contribute to inflammation and are a major source of inflammatory mediators. Some compounds such as the derived growth factor (PDGF) exhibit P-

selectin, CD40 and CD40 ligand allowing the interaction and activation of leukocytes and subsequent release of a range of inflammatory cytokines (GAWAZ et al., 2005).

Since platelets express different sets of ectoenzymes and purinergic receptors, which regulate thromboembolic process induced by vascular injuries (FÜRSTENAU et al., 2006), the E-NPP activity was also evaluated, showing that it is responsible for the direct ATP hydrolysis to extracellular AMP. No changes in this ectoenzyme activity were observed.

Continuing the purinergic cascade, E-5'-NT not only ends the signaling of ATP, but also generates important intermediates to regulate the platelet aggregation, such as adenosine, from AMP substrate. However, when the activity of this enzyme was assessed in platelets of rats with induced sporotrichosis, no changes were observed in AMP hydrolysis. Moreover, there was an increased ADP hydrolysis, suggesting high AMP levels found in extracellular environment. Regarding the E-ADA activity, no changes were observed between the groups, which indicates that this nucleoside is present in physiological levels in the extracellular medium, which could be related to normal platelet aggregation, since adenosine can exert anti-aggregating to stimulate especially A_{2A} and A_{2B} (JOHNSTON-COX et al., 2011). Since no changes were observed in the ADA activity, adenylate kinase (EC 2.7.4.3) could be activated in an attempt to reconstitute the pool of ATP. As proposed by YEGUTKIN et al (2002), an opposite via could lead to the recovery of adenine nucleotides, which are essential to have effects on tromborregulation, such as ATP and ADP released from platelet granules when platelets are activated (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997). Thus, the more ATP formation, the more ATP hydrolysis would be available to form ADP, which in turn could also be hydrolyzed, helping to prevent platelet aggregation and thrombus formation.

Platelet activation includes an additional source of extracellular adenine nucleotides (ROBSON, 2001; MARCUS et al., 2003). Sévigny and colleagues (2002) demonstrated that NTPDase interacts with the bloodstream, revoking platelet aggregation. Thus, it is believed that platelet aggregation was not altered in infected groups due to the high ADP hydrolysis and possibly by normal adenosine levels, as well as the reconstitution of the ATP pool. In conclusion, the modulation of ectonucleotidase activities on the surface of platelets may be responsible for preventing thrombus formation during sporotrichosis.

Conflicts of Interest statement

There are no actual or potential conflicts of interest.

Acknowledgements

The financial support by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), PRONEX and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

References

- Bach, B.C., Leal, D.B.R., Ruchel, J.B., Souza, V.C.G., Maboni, G., Dal Pozzo, M., Schlemmer, K.B., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2010. Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 64, 718-722.
- Becker, L.V., Rosa, C.S., Souza, V.C.G., Bagatini, M.D., Casali, E.A., Leal, C.A.M., Da Silva, J.C.N., Moretto, M.B., Pinheiro, F.V., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Leal, D.B.R., 2010. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*. 43, 1096-1100.
- Boilard, E., Nigrovic, P.A., Larabee, K., Watts, G.F., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R.W., Ware, J., Lee, D.M., 2010. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 327, 580–583.
- Born, G.V., 1985. Adenosine diphosphate as a mediator of platelet aggregation in vivo: an editorial view. *Circulation*. 72, 741-746.
- Born, G.V.R.; Cross, M.J., 1963. The aggregation of blood platelets. *J Physiol*. 95, 168–178.
- Born, G.V.R., Honour, A.J., Mitchell, J.R., 1964. Inhibition by adenosine and by 2-chloroadenosine of the formation and embolization of platelet thrombi. *Nature*. 202, 761–765.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.
- Bustamante, B., Campos, P.E., 2001. Endemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 14, 145-149.
- Chan, K. et.al., 1986. A direct colorimetric assay for the Ca^{2+} - ATPase activity. *Analytical Biochemistry*. 157, 375-380.
- Da Rosa, A.C., Scroferneker, M.L., Vettorato, R., Gervini, R.L., Vettorato, G., Weber, A., 2005. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 52, 451-459.
- Davis, D.A., Bruno, V., Loza, L., Filler, S.G., Mitchell, A.P., 2002. *C. albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics*. 162, 1573-1581.
- Figueiredo, R.T., Carneiro, L.A.M., Bozza, M.T., 2011. Fungal surface and innate immune recognition of filamentous fungi. *Frontiers in Microbiology*. 2, 1-14.

- Figueiredo, C.C., Deccache, P.M.S., Lopes-Bezerra, L.M., Morandi, V., 2007. TGF- α induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. *Microbiology*. 153, 2910- 2921.
- Figueiredo, C.C., Lima, O.C., Carvalho, L., Lopes-Bezerra, L.M., MORANDI, V., 2004. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microbial Pathogenesis*. 36, 177-188.
- Fürsternau, C., Trentin, D.D.A., S., Barreto-Chaves, M.L., Sarkis, J.J., 2006. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets*. 17, 84-91.
- Gawaz, M., 2006. Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells, Molecules & Diseases*. 36, 206-210.
- Gawaz, M., Langer, H., May, A.E., 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 115, 3378–3384.
- Guisti, G., Galanti, B., 1984. Colorimetric method. In: Bergemeyer H. U. (ed) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 315–323.
- Jain, S., Harris, J., Ware, J., 2010. Platelets: linking hemostasis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30, 2362–2367.
- Johnston-Cox, H. A., Yang, D., Ravid, K., 2011. Physiological implications of adenosine receptor-mediated platelet aggregation. *Journal of Cellular Physiology*. 226, 46-51.
- Jones, S., Evans, R.J., Mahaut-Smith, M.P., 2011. Extracellular Ca^{2+} modulates ADP-evoked aggregation through altered agonist degradation: implications for conditions used to study P2Y receptor activation. *Br J Haematol*. 153, 83–91.
- Kauffman, C.A., 1999. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis*. 29, 231-236.
- Kauffman, C.A., Bustamante, B., Chapman, S.W., Pappas, P.G., 2007. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 45, 1255-1265.
- Keating, F., Whitaker, D., Kabbani, S., Ricci, M., Sobel, B., Schneider, D., 2004. Relation of augmented platelet reactivity to the magnitude of distribution of atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 94, 725-728.
- Lima, O.C., Figueiredo, C.C., Pereira, B.A.S., Coelho, M.G.P., Morandi, V., Lopes-Bezerra, L.M., 1999. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32, 651-657.
- Lopes, L.M., Schubach, A., Costa, R.O., 2006. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cien*. 78, 293-308.

- Lunkes, G.I., 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, 4189-194.
- Mahaut-Smith, M.P., Tolhurst, G., Evans, R.J., 2004. Emerging roles for P2X1 receptors in platelet activation. *Platelets*. v.15, 131–144.
- Marcus, A.J., Brocman, M.J., Drosopoulos, J.H., Islam, N., Pinsky, D.J., Sesti, C., Levi, R., 2003. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation. Cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase- 1), *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1, 2497-2509.
- Massberg, S., Brand, K., Grüner, S., Page, S., Müller, E., Müller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B., Gawaz, M., 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of Experimental Medicine*. 196, 887-896.
- Morris, R., 2002. Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatol*. 27, 427-431.
- Mustard, J.F., Perry, D.W., Kinlough-Rathbone, R.L., Packham, M.A., 1975. Factors responsible for ADP-induced release reaction of human platelets. *Am J Physiol*. 228, 1757–1765.
- Pang, K.R., Wu, J.J., Huang, D.B., Tying, S.K., 2004. Subcutaneous funga infections. *Dermatol Ther*. 17, 523-531.
- Pappas, P.G., Tellez, I., Deep, A.E., Nolasco, D., Holgado, W., Bustamante, B., 2000. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis*. 30, 65-70.
- 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.
- Queiroz, F., MC Ginnis, M.R., Salkin, I., Graybill, J.R., 2003. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am*. 17, 59-85.
- Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological reviews*. 50, 413-492.
- Robson, S.C., 2001. Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 21, 1251-1252.
- Rozalski, M., Nocun, M., Watala, C., 2005. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets – potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochimica Polonica*. 52, 411-415.
- Sattar, N., Mccarey, D.W., Capell, H., Mcinnes, I.B., 2003. Explaining how “high grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation*. 108, 2957-2963.

Sévigny, J., Sundberg, C., Braun, N., et al., 2002. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase 2 have for thromboregulation. *Blood*. 99, 2801-2809.

Soslau, G., Youngprapakorn, D., 1997. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta*. 1355, 131-140.

Spanevello, R.M., Mazzanti, C.M., Bagatini, M., Correa, M., Schmatz, R., Stefanello, N., Thomé, G., Morsch, V.M., Becker, L., Bellé, L., De oliveira, L., Schetinger, M.R., 2010. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol*. 257, 24-30.

Teixeira, P.A.C., Castro, R.A., Nascimento, R.C., Tronchin, G., Torres, A.P., Lazéra, M., Almeida, S.R., Bouchara, J.P., Penha, C.V.L., Bezerra, L.M.L., 2009. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiology*. 155, 3730-3738.

Welsh, O., Schmidt, P., Stingl, P., Hafner, J., Leppard, B., Mahé, A., 2002. Tropical dermatology. Part II. *J Am Acad Dermatol*. 46, 748-763.

Yegutkin, G.G., Henttinen, T., Samburski, S.S., Sychala, J., Jalkanen, S., 2002. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. **The Biochemical Journal**. 367, 121-128.

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

Zimmermann, H., 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Progress in Neurobiology*. 49, 589-618.

Zimmermann H., 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedeberg Arch of Pharmacol*. 362, 299-309.

Figure Captions

Figure 1: NTPDase activity in peripheral blood platelets from control rats and infected with IL and IS of *Sporothrix schenckii* using ATP (A) ($P < 0.05^*$, $n=10$) and ADP (B) ($P < 0.01^{**}$, $n=10$). Bars represent means \pm SEM. One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc). *Indicates a significant difference compared with IS. **Indicates a significant difference compared with control group and IS.

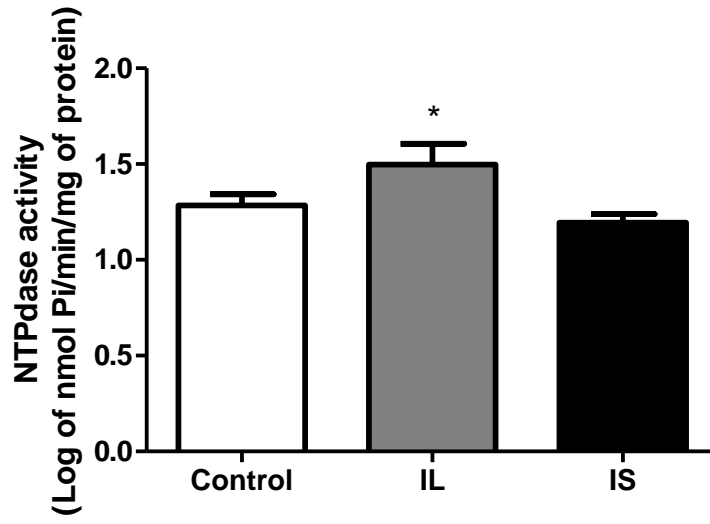
Figure 2: 5'- nucleotidase activity in peripheral blood platelets from control rats and infected with IL and IS of *Sporothrix schenckii*. Bars represent means \pm SEM ($n=10$). One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc).

Figure 3: ADA activity in peripheral blood platelets from control rats and infected with IL and IS of *Sporothrix schenckii*. Bars represent means \pm SEM ($n=10$). One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc).

Figure 4: NPP activity in peripheral blood platelets from control rats and infected with IL and IS of *Sporothrix schenckii*. Bars represent means \pm SEM ($n=10$). One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc).

Figure 5: Platelet aggregation from control rats and infected with IL and IS of *Sporothrix schenckii*. Bars represent means \pm SEM ($n=10$). The results are expressed as percentage of aggregation. One-way ANOVA + Student Newman-Keuls (post hoc).

A



B

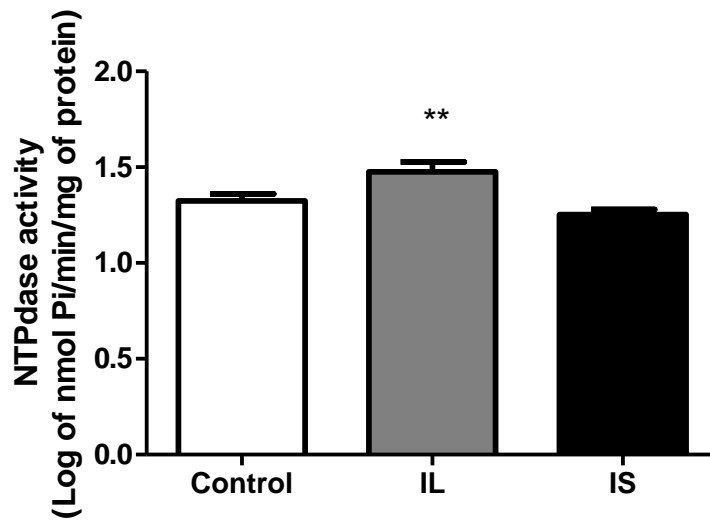


Figure 1

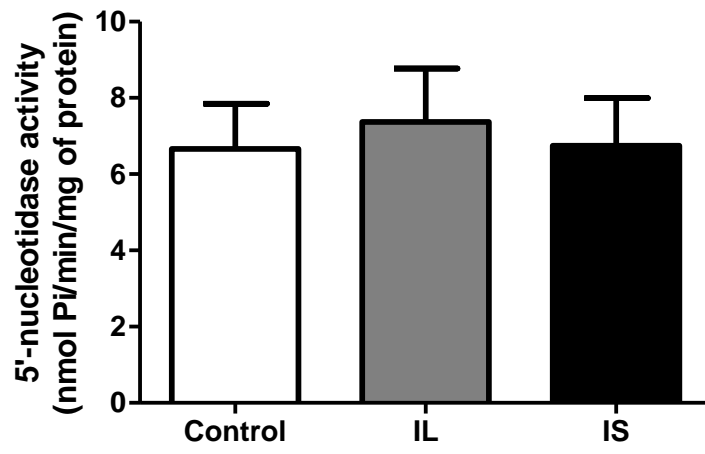


Figure 2

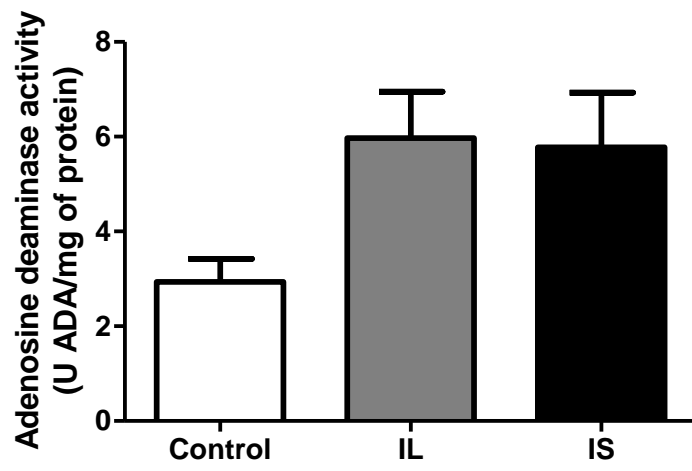


Figure 3

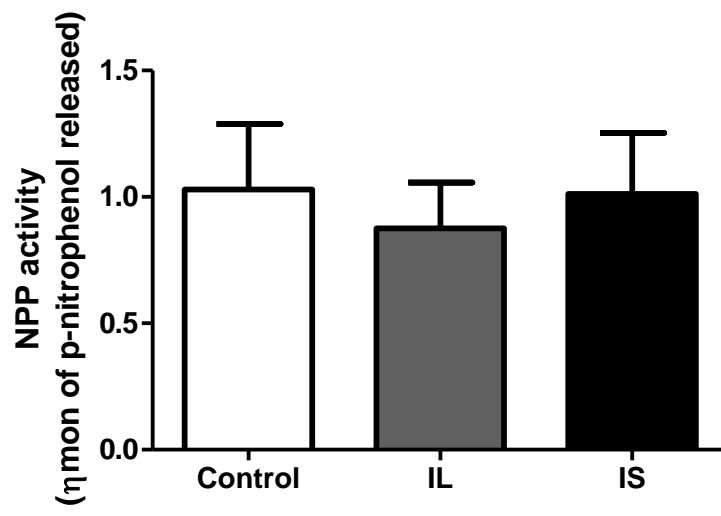


Figure 4

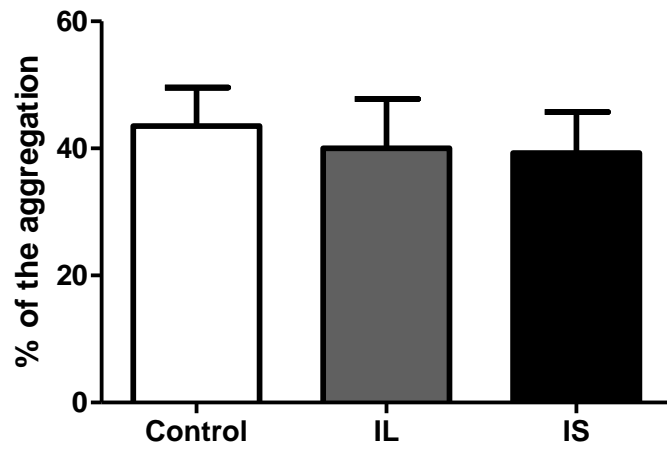


Figure 5

4 CONCLUSÕES

- A atividade da NTPDase mostrou-se aumentada na hidrólise de ATP e ADP nos ratos infectados com a cepa linfática de *S. schenckii*, podendo estar contribuindo para a redução de ADP extracelular, protegendo o organismo contra a formação de trombos e lesões nodulares, presentes na esporotricose.
- O perfil de agregação plaquetária, induzido pelo ADP, não se mostrou alterado nos animais infectados, podendo ser em função da alta hidrólise do ADP pela NTPDase.
- A modulação da atividade das ectonucleotidases, na superfície de plaquetas, seria responsável pela prevenção da formação de trombos na esporotricose.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Celular and molecular immunology**. 3ªed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997.

ADAMS, A.; HARKNESS, R.A. Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues. **Clinical and Experimental Immunology**, v.26, p.647-9, 1976.

ALSINA, A.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N. Effects of divalent cations and functionally related substances on the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. **Sabouraudia**, v. 22, p. 1-5, 1984.

ANDRÉ, P.; DELANEY, S.; LAROCCA, T.; VICENT, D.; DEGUZMAN, F.; JUREK, M.; KOLLER, B.; PHILLIPS, D. R.; CONLEY, P. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. **The Journal of Clinical Investigation**, v.112, p.398-406, 2003.

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

BALDWIN, A.L.; THURSTON, G. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 29, p. 247-278, 2001.

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

BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051-1057, Junho, 2008.

BIER, O.G. et al. **Imunologia básica e aplicada**. 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

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

BOARDER, M. R.; HOURANI, S. M. O. The regulation of vascular function by P2 receptor: multiple sites and multiple receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.19, p.99-107, 1998.

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

BONAN, C.D.; SCHETINGER, M.R.C.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: implications in physiological and pathological conditions. **Drug Development Research**, v.52, p. 57-65, 2001.

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

BOURS, M. J. ; SWENNEN, E. L. ; DI VIRGILIO, F. ; CRONSTEIN, B. N. ; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.358-404, 2006.

BURNSTOCK, G. introduction: P2 receptors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.4, p.793-803, 2004.

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

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Endemic sporotrichosis. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 14, p.145-149, 2001.

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

CATTANEO, M.; GACHET, C. The platelet ADP receptors. **Haematologica**, v. 86, p. 346-348, 2001.

CHAMILOS, G. et al. Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of T(H)-17 responses. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. 1-10, 2010.

COADE, S. B.; PEARSON, J. D. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. **Circulation Research**, v.65, p.531-537, 1989.

COLMAN, R. W.; Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation. **The FASEB Journal**, v. 4, p. 1425-1435, 1990.

CONTI-DIAZ, I. A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathology**, v. 108, p. 113-116, 1989.

CORBELLINI, V.A.; ANICET, K.L.; SCROFERNEKER, M.L. Imunologia dos fungos. In: SCROFERNEKER, M.L. (Coord.) **Notas de imunologia**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1996, p. 317-323.

CRISEO, G.; ROMEO, O. Ribosomal DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis of Environmental *Sporothrix schenckii* Strains: Comparison with Clinical Isolates. **Mycopathologia**, v. 169, p. 351–358, 2010.

CRONSTEIN, B. N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **Journal of Applied Physiology**, v.76, p.5-13, 1994.

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

DA ROSA, A.C.; SCROFERNEKER, M.L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R.L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, p. 451-459, 2005.

DAVEY, F. R. Plaquetas e doenças plaquetárias. In:_____. **Diagnósticos clínicos e condutas terapêuticas por exames laboratoriais**. 17 ed. São Paulo, 1982, p. 1211-1233.

DAVIS, D. A.; BRUNO, V.; LOZA, L.; FILLER, S. G.; MITCHELL, A. P. *C. albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. **Genetics**, v. 162, p. 1573-1581, 2002.

DEEPE, G. S., JR.; GIBBONS, R. S. Interleukins 17 and 23 influence the host response to *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 142-51, 2009.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J. M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O. R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, n.3, p.587-600, 2001.

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

DUNWIDDIE, T.; MASINO, S. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v.24, p.31-55, 2001.

FIGUEIREDO, C. C.; DECCACHE, P. M. S.; LOPES-BEZERRA, L. M.; MORANDI, V. TGF-1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. **Microbiology**, v. 153, p. 2910- 2921, 2007.

FIGUEIREDO, C. C.; LIMA, O. C.; CARVALHO, L.; LOPES-BEZERRA, L. M.; MORANDI, V. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, p. 177-188, 2004.

FISCHER, D.; VAN DEN WEYDEN, M.B.; SYNDERMAN, R.; KELLEY, W.N. The role for adenosine deaminase in human monocyte maturation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.58, p.399-407, 1976.

FRASSETTO, S.S.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 1, p. 47-55, 1993.

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

GAKIS, C.; CALIA, G.; NAITANA, A.; PIRINO, D.; SERRU, G. Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects: a hypothesis on the significance of ADA2. **Panminerva Medica**, v.31, p.107-13, 1989.

GALANTI, B.; NARDIELLO, S.; RUSSO, M.; FIORENTINO, F. Increased lymphocyte adenosine deaminase in typhoid fever. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.13, p.47-50, 1981.

GARCIA-NAVARRO C. E. K. **Manual de Hematologia Veterinária**, 2º ed. São Paulo: Varela, 2005.

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

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, p.454-500, 1999.

HEKTOEN, L.; PERKINS C.F. Refractory subcutaneous caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **Journal of Experimental Medicine**. V.5, p.77-89, 1900.

HERBERNER, G. H.; DEAN W. L.; Immunocytochemical localization of the Ca²⁺ - ATPase polypeptide in human platelets. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 153, p. 848-854, 1988.

HIRSCHHORN, R.; RATECH, H. Isozymes of adenosine deaminase. **Isozymes**, v.4, p.131-157, 1980.

HOGAN, L. H.; KLEIN, S. M.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 469-488, 1996.

HOLMSEN, H.; Nucleotide metabolism of platelets. **Annual Review of Physiology**, v. 47, p. 677-690, 1985.

HUANG, W. et al. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 3, p. 624-631, 2004.

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

ITIS – Integrated Taxonomic Information System. Disponível na internet via URL: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt>

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO. **Histologia Básica**, 9º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 29; p. 231-237, 1999.

KAWASHIMA, Y.; TOSHIRO, N.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v. 96, p. 2157-2162, 2000.

KEATING, F.; WHITAKER, D.; KABBANI, S.; RICCI, M.; SOBEL, B.; SCHNEIDER, D. 2004. Relation of augmented platelet reactivity to the magnitude of distribution of atherosclerosis. **The American Journal of Cardiology**, v.94, p. 725-728, 2004.

KIRKPATRICK, C.H. Immune responses to fungi. In: RICH, R.R. et al. **Clinical immunology: principles and practice**. Saint Louis: Mosby, 1996. v.1, p. 571-578.

KIRLEY, T.L.; CRAWFORD, P.A.; SMITH, T.M. The structure of the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 379-389, 2006.

KLOTZ, S. A.; DRUTZ, D. J.; HARRISON, J. L.; HUPPERT, M. Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. **Infection and Immunity**, v. 42, n° 1, p. 374-384, 1983.

KOBAYASHI, F.; IKEDA, T.; MARUMO, F.; SATO, C. Adenosine deaminase isoenzymes in liver diseases. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 88, p. 266-271, 1993.

KOGA, T. et al. Immunohistochemical detection of interferon-gamma-producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 40, n° 2, p. 111-114, 2002.

KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN H. D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 12, p. 1077-1081, 2006.

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

KUNAPULI, S. P.; DANIEL, J. L. P2 Receptor subtypes in the cardiovascular system. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 513-523, 1998.

KUNAPULI, S. P.; DORSAM, R. T.; SOOHONG, K.; QUINTON, T. M. Platelet Purinergic receptors. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 3, p. 175-180, 2003.

KWON-CHUNG, K. J. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. **Journal of Infectious Diseases**, v. 139, p. 424-431, 1979.

KWON-CHUNG, K.; BENNETT, J. Sporotrichosis. In: KWON-CHUNG K. et al. (Eds). **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.707-729, 1992.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, v. 9, p.479-497, 2002.

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

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

LIMA, O. C.; FIGUEIREDO, C. C.; PEREIRA, B. A.S.; COELHO, M. G. P.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L. M. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 651-657, 1999.

LOPES, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 293–308, 2006.

LOPEZ-FARRÉ, A.; DE MIGUEL, L. S.; MONTÓN, M.; JIMÉNEZ, A.; LOPEZ-BLOYA, A.; GÓMEZ, J.; NÚÑEZ, A.; RICO, L.; CASADO, S. angiotensin II AT₁ receptor antagonists and platelet activation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, p. 45-49, 2001.

MACKINNON, J. E.; CONTI-DÍAZ, I. A. The effect of temperature on sporotrichosis. **Sabouraudia**, v. 2, p. 56-59, 1962.

MACKINNON, J.E.; CONTI-DIAS, T.A.; GEZUELE, E.; CIVILA, E.; DA LUZ, S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations of its patogenicity and ecology. **Sabouraudia**, v. 7, n°1, p. 38-45, 1969.

MALDONADO, P. A.; CORRÊA, M. C.; BECKER, L. V.; FLORES, C.; MORETTO, M. B.; MORSCH, V.; SCHETINGER, M. R. C. Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. **Clinical Biochemistry**. v.41, p.400-406, 2008.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 3198-3206, 2007.

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

MESA, M. G.; ALFONSO, C.C.; características estructurales y funcionales de las plaquetas. **Revista cubana de angiología y cirugía vascular**, v. 1, n° 2, p. 132-141, 2000.

MORAES, R.G.; LEITE, I. C.; GOULART, E. G.; **Parasitologia e Micologia Humana**. v. 5, p. 177-188, 2008.

MORRIS, R. Sporotrichosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 27, p. 427-31, 2002.

MUBAGWA, K.; MULLANE, K.; FLAMENG, W. Role of adenosine in heart and circulation. **Cardiovascular Research**, v.32, p.797-813, 1996.

NADIR, E.; KAUFSHTEIN, M. Images in clinical medicine. *Candida albicans* in a peripheral blood smear. **New England Journal of Medicine**, v.353, p.9, 2005.

NASCIMENTO, R. C.; ESPÍNDOLA, N. M.; CASTRO, R. A.; TEIXEIRA, P. A. C.; LOUREIRO Y PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ALMEIDA, S. R. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. **European Journal of Immunology**, v.38, p.3080- 3089, 2008.

PANG, K. R; WU, J.J.; HUANG, D. B.; TYRING, S.K. Subcutaneous fungal infections. **Dermatology and Therapy**, v. 17, n°6, p. 523-531, 2004.

PAPPAS, P.G.; TELLEZ, I.; DEEP, A.E.; NOLASCO, D.; HOLGADO, W.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p.65-70, 2000.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATTARTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v.7, p. 225-230, 1996.

PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v.124, p.715-727, 2006.

QAWI, I.; ROBSON, S. C.; new developments in anti-platelet therapies: potential use of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase in thrombotic disorders. **Current Drug Targets**, v.1, p.285-296, 2000.

QUEIROZ, F.; MCGINNIS, M.R.; SALKIN, I.; GRAYBILL, J.R. Subcutaneous mycoses. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.17, p.59–85, 2003.

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

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

RAMOS-E-SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S.; CESTARI, T. Sporotrichosis. **Clinical Dermatology**, v.25, n°2, p.181-187, 2007.

RATECH, H.; MARTINIUK, F.; BORER, W.Z.; RAPPAPORT, H. Differential expression of adenosine deaminase isozymes in acute leukemia. **Blood**, v.72, p.1627-32, 1988.

REED, K. D.; MOORE, F. M.; GEIGER, G. E.; STEMPER, M. E. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. **Clinical Infectious Disease**, v.16, p.384-387, 1993.

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

RIPPON, J. W. **Medical Mycology**: The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes. Philadelphia: WB Saunders Company, 1988, 325-352.

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

RODRIGUEZ-DEL VALLE, N.; ROSARIO, M.; TORRES BLASINI, G. Effects of pH, temperature, aeration and carbon source on the development of the mycelial forms of *Sporothrix schenckii* from conidia. **Mycopathologia**, v.82, p.83-88, 1983.

ROMANI, L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. **Medical Mycology**, v.46, n° 6, p.515-529, 2008.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Immunology**, v.11, n°4, p.275-88, 2011.

RUBIN, E.; FARBER, A.L. **Fungal infections**. Pathology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.230-236.

SAKURA, H.; NAGASHIMA, S.; NAGASHIMA, A.; MAEDA, M. Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a aggregation inhibitor in fetal circulation. **Thrombosis Research**, v.91, p.83-89, 1998.

SALLES, I. I.; FEVS, H. B.; ISERBYT, B. F.; DE METER, S. F.; VANHOORELBEKE, K.; DECKMYN, H. Inherited traits affecting platelet function. **Blood Review**, v.22, p.155-172, 2008.

SANTOS M. E.; GALVÃO, T.; OLIVEIRA, A. L. M. Tamanho de Plaquetas e Doença Vascular. **NewsLab**, v.87, p.70-76, 2008.

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

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

SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M. P.; BARROS, M. B. L.; WANKE, B. Cat transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.1952-1954, 2005.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A. O. Esporotricose em cães e gatos-revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v.29, n.5, p.21-24, 2000.

SEIDENFELD, S. M.; COOPER, B. H.; SMITH, J. W.; MACKOWIAK, P. A. Effect of temperature on the susceptibility of *Sporothrix schenckii* to Amphotericin B. **Journal of Infectious Diseases**, v.146, p.711, 1982.

SHI, J.; KUKAR, T.; WANG, C.; LI, Q.; CRUZ P. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.17471-17478, 2001.

SHRYOCK, J. C.; BELARDINELLI, L. Adenosine and adenosine receptor in the cardiovascular system: biochemistry, physiology and pharmacology. **The American Journal of Cardiology**, v.79. p.02-10, 1997.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.G.F. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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

SOUZA, L. L.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEINERZ, A. R. M.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 37, p. 303-305, 2006.

SPYCHALA, J.; MITCHEL, B. S.; BARANKIEWICZ. Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase and 5'-nucleotidase. **Journal of Immunology**, v.158, p.4947- 4952, 1997.

STEENBERGEN, J.N.; NOSANCHUK, J.D.; MALLIARIS, S.D.; CASADEVALL, A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infection and Immunity**, v.72, n°6, p. 3478-3488, 2004.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling**, v.2, p.361-370, 2006.

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

SUMPIO, B. E.; RILEY, J. T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, p.1508-1512, 2002.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; ITO, M.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermointolerant mutant losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous Sporotrichosis. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.78, n°2, p. 293-308, 2001.

TAYLOR, J.J. Further clarification of *Sporotrichum* species. **Mycologia**, v.62, n°4, p. 797-825, 1970.

TEIXEIRA, P. A.C.; CASTRO, R. A.; NASCIMENTO, R. C.; TRONCHIN, G.; TORRES, A. P.; LAZÉRA, M.; ALMEIDA, S. R.; BOUCHARA, J. P.; PENHA, C. V. L.; BEZERRA, L. M. L. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. **Microbiology**, v.155, p.3730-3738, 2009.

TRAUTMANN, A.; Extracellular ATP in immune system: more than a just a “danger signal”. **Science Signaling**, v.2, p.1-3, 2009.

TSUBOI, I.; SAGAWA, K.; SHICHIJO, S.; YOKOYAMA, M.M.; OU, D.W.; WIEDERHOLD, M.D. Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus Type 1 and human immunodeficiency virus Type 1 infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 2, p. 626-630, 1995.

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

WELSH, O.; SCHMIDT, P.; STINGL, P.; HAFNER, J.; LEPPARD, B.; MAHE´ A. Tropical dermatology. Part II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.46, p.748-763, 2002.

YAAR, R.; JONES, M. R.; CHEN, J. F.; RAVID, K. Animal models for the study of adenosine receptor function. **Journal of Cellular Physiology**, v.202, p.9-20, 2005.

YE, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **The Journal of Experimental Medicine**, v.194, n°4, p. 519-527, 2001.

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

YEGUTKIN, G. G.; HENTTINEN, T.; SAMBURSKI, S. S.; SPYCHALA, J.; JALKANEN, S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. **Journal of biochemistry**. v.367, p.121-128, 2002.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. 1º ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, A.S.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto nucleotidases in the nervous system. **Progress Neurobiology**, v. 49, nº6, p. 589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B.; HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**, v.32, p.421-425, 1998.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.20, p.231-236, 1999.


ZIMMERMANN H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn Schmiedeberg Arch of Pharmacol**. v.362, p. 299-309, 2000.

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

ZUKKERMANN, S.H.; OLSON, J.M.; DOUGLAS, S.D. Adenosine desaminase activity during in vitro culture of human peripheral blood monocytes and pulmonary alveolar macrophage. **Experimental Cell Research**, v.129, p.281-7, 1980.

6 Anexos

6.1 Anexo A - Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ INTERNO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: " Atividade de enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleotídeos da adenina em linfócitos e plaquetas de ratos infectados experimentalmente por Sporothrix schenckii. "

Numero do Parecer: 102/2010

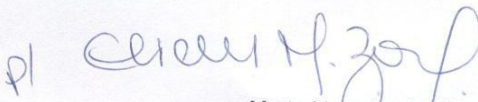
Pesquisador Responsável: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

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

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:

Santa Maria, 13 de dezembro de 2010.



Marta Lizandra do Rêgo Leal
 Coordenador do Comitê Interno de Ética em Experimentação
 Animal-UFSM

Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal - UFSM - Av. Roraima, 1000 – Prédio da Reitoria - 2º andar - Campus Universitário 97105-900 – Santa Maria – RS - - Tel: 0 xx 55 3220 9362