

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

ESTUDO DA HIDRÓLISE EXTRACELULAR DE NUCLEOTÍDEOS EM
Trichomonas gallinae

FERNANDA PIRES BORGES

Orientadora:

Prof. Dra. CARLA DENISE BONAN

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção do título de mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2006

À minha família, que me ensinou o valor das coisas e da vida.

Agradecimentos

*“Há uns que nos falam e não ouvimos, há uns que nos tocam e não sentimos. Há aqueles que nos ferem e nem cicatrizes deixam. Mas há aqueles que simplesmente **vivem** e nos marcam por toda a vida...”*

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, estiveram comigo durante mais esta etapa vencida, incentivando-me a prosseguir sempre, em uma constante superação de obstáculos.

Agradeço pela confiança, incentivo e amparo nas dificuldades.

Carla, Profº De Carli, Tiana, Paty!

Vocês sempre serão parte da minha vida. É imensurável a gratidão que sinto por cada um de vocês.

ÍNDICE

PARTE I	2
I. 1. Lista de Abreviaturas	3
I. 2. Resumo	4
I. 3. Abstract	5
I.4. Introdução	6
I.4.1. <i>Trichomonas gallinae</i>	7
I.4.1.1. Morfologia	7
I.4.1.2. Metabolismo	9
I.4.1.3. Epidemiologia, Formas de transmissão e Patologia	10
I.4.1.4. Sintomas Clínicos, Diagnóstico e Tratamento	11
I.4.1.5. Fatores que afetam a patogenicidade	13
I.4.2. Nucleotídeos extracelulares	13
I.4.3. Ectonucleotidases	14
I.4.3.1. Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases - NTPDases	15
I.4.3.1.1. Hidrólise de nucleotídeos em parasitos	18
I.4.3.2. 5'-nucleotidase	19
I.5. Objetivos	21
PARTE II	22
II. 1. Capítulo 1	23
II. 2. Capítulo 2	48
PARTE III	69
III. 1. Discussão	70
III. 2. Conclusões gerais	76
III. 3. Perspectivas	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	88

PARTE I

1. Lista de Abreviaturas

ACRs – regiões conservadas da apirase

ADP – adenosina 5'-difosfato

AMP – adenosina 5'-monofosfato

AMPCP - α,β -metileno-ADP

Cyclic AMP – adenosina 5'-monofosfato cíclico

ATP – adenosina 5'-trifosfato

CMP - citidina 5'-monofosfato

CTP – citidina 5'-trifosfato

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA - ácido etilenoglicol - bis (2-aminoetileter) - N,N,N',N' -tetraacético

ENTPDase – ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

ENPP – ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

GMP - guanosina 5'-monofosfato

GTP – guanosina 5'-trifosfato

IMP – inosina 5'-monofosfato

K_M – Constante de Michaelis-Menten

MEV – microscopia eletrônica de varredura

NTPDase - nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

UDP – uridina 5'-difosfato

UMP - uridina 5'-monofosfato

UTP - uridina 5'-trifosfato

TYM – extrato de triptose, levedo e maltose

V_{max} – *velocidade máxima*

I. 2. Resumo

Trichomonas gallinae é um protozoário flagelado que parasita o trato digestivo superior de várias aves, incluindo pombos domésticos, frangos e perus. O estudo dos mecanismos de patogenicidade deste parasito é de fundamental importância, uma vez que a infecção causada pelo mesmo tem envolvido grandes perdas econômicas. Sabe-se que além da função energética, o ATP desempenha inúmeras funções fisiológicas, como sinalização extracelular e mecanismos citolíticos. As concentrações dos nucleotídeos, tais como ATP e ADP, no meio extracelular são controladas por um grupo de enzimas denominadas ectonucleotidases. Fazem parte deste grupo as NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) e a ecto-5'-nucleotidase, as quais participam do controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeos. A presença dessas atividades enzimáticas pode estar associada com a virulência e evasão dos parasitos, servindo como um mecanismo de escape dos efeitos citolíticos do ATP. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar as atividades da NTPDase e 5'-nucleotidase, envolvidas na degradação dos nucleotídeos extracelulares em *T. gallinae*. A hidrólise de ATP, ADP e AMP foi ativada na presença de cátions divalentes e a adição de quelantes de cátions no meio de incubação reduziu significativamente a atividade específica da NTPDase e 5'-nucleotidase. As enzimas apresentaram ampla especificidade de substrato, observada através da hidrólise de outros nucleotídeos trifosfatados, difosfatados e monofosfatados, quando adicionados ao meio como substrato. O K_M para o ATP foi de $65,62 \pm 15,55 \mu\text{M}$ e para o ADP foi de $122,66 \pm 3,51 \mu\text{M}$. A V_{max} para o ATP e o ADP foi de $0,20 \pm 0,03$ e $0,70 \pm 0,09 \text{ nmolPi/min}/10^6$ trofozoítos, respectivamente. Para o AMP, o K_M foi $466 \pm 57 \mu\text{M}$, com uma V_{max} de $3,70 \pm 0,59 \text{ nmolPi/min}/10^6$ trofozoítos. A influência de outras enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares foi descartada através do uso de inibidores específicos. A hidrólise do ATP, ADP e AMP indicou a presença de uma cadeia enzimática na superfície do parasito, composta por uma NTPDase e uma ecto-5'-nucleotidase. A presença de atividades enzimáticas capazes de hidrolisar nucleotídeos extracelulares pode representar um mecanismo de sobrevivência dos parasitos nos seus ambientes naturais. A compreensão dos processos bioquímicos extracelulares destes parasitos pode ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos no parasitismo.

I. 3. Abstract

Trichomonas gallinae is a flagellated protozoan which parasitizes a variety of birds all over the world, including domestic pigeons, chickens and turkeys. The study of pathogenicity mechanisms is relevant, since the infection caused by this parasite involves significant economic loss. Besides the energetic function, extracellular ATP plays several physiological functions, such as extracellular signaling and cytolysis. Extracellular nucleotide levels are controlled by group of enzymes named ectonucleotidases. This group of enzymes includes the NTPDases (nucleoside triphosphate diphosphohydrolases) and an ecto-5'-nucleotidase, which participates in the control of extracellular nucleotide and nucleoside levels. The presence of these enzyme activities could be associated with the virulence and evasion of the parasites, escaping from the cytolytic effects of ATP. Therefore, the aim of this study was to characterize the NTPDase and 5'-nucleotidase activities, involved in extracellular nucleotide degradation in *T. gallinae*. ATP, ADP and AMP hydrolysis were activated in the presence of divalent cations and the addition of cation chelating agents in the incubation medium significantly decreased the specific activity of NTPDase and 5'-nucleotidase. The enzymes presented broad substrate specificity because others triphosphate, diphosphate and monophosphate nucleotides were also hydrolysed when they were added to the mixture as substrates. The K_M value for ATP was $65.62 \pm 15.55 \mu\text{M}$ and for ADP was $122.66 \pm 3.51 \mu\text{M}$. The V_{max} values for ATP and ADP were 0.20 ± 0.03 and $0.70 \pm 0.09 \text{ nmolPi}/\text{min}/10^6$ trichomonads, respectively. For AMP, K_M was $466 \pm 57 \mu\text{M}$, with the V_{max} value of $3.70 \pm 0.59 \text{ nmolPi}/\text{min}/10^6$ trichomonads. The influence of other enzymes able to hydrolyze extracellular nucleotides was tested through the use of specific inhibitors. ATP, ADP and AMP hydrolysis indicated the presence of an enzyme chain in the surface of the parasite, composed by an NTPDase and an ecto-5'-nucleotidase. The presence of enzyme activities able to hydrolyze extracellular nucleotides can represent a survival mechanism of the parasites in their natural environments. The study of extracellular biochemical processes of these parasites can improve the knowledge related to the mechanisms involved in the parasitism.

I.4. Introdução

Trichomonas gallinae (Rivolta, 1878) é um protozoário flagelado que parasita uma variedade de pássaros, sendo o pombo doméstico, *Columba livia*, seu hospedeiro primário. O local de infecção é preferencialmente o trato digestivo superior das aves, sendo que alguns isolados¹ são capazes de atingir as vísceras e o sistema nervoso central (BonDurant and Honigberg, 1994). Quando consideradas a prevalência da tricomonose e a mortalidade devido ao *T. gallinae*, a importância do estudo do parasito torna-se evidente. Vários autores estudaram a prevalência do flagelado e obtiveram resultados que variaram de 30 a 100% (Tasca e De Carli, 2006). O parasito apresenta ampla distribuição mundial, sendo observado em pombos na Inglaterra (Cooper e Petty, 1988), África do Sul (Pepler and Oettle, 1992), Alemanha (Krone et al., 2005), Estados Unidos (Rosenfield et al., 2002), Austrália (Mckeon et al., 1997) e Brasil (De Carli et al., 1979; Tasca e De Carli, 1999).

Nucleotídeos extracelulares, como a adenosina 5'-trifosfato (ATP) e a adenosina 5'-difosfato (ADP), estão envolvidos em inúmeras funções fisiológicas, agindo como moléculas sinalizadoras. Além disso, o ATP extracelular pode agir como molécula citotóxica, induzindo apoptose em linfócitos T citotóxicos (Filippini et al., 1990). Após exercerem suas funções, os nucleotídeos podem ser inativados, através de hidrólise, por um grupo de enzimas conhecidas como ectonucleotidases. Muitos estudos têm demonstrado a presença dessas enzimas na superfície dos parasitos (Vasconcelos et al., 1993, 1996; Meyer-Fernandes et al., 1997; Barros et al., 2000; Matos et al., 2001; Tasca et al., 2003). Vários autores sugerem que a

¹ Isolado - Organismo isolado de seu ambiente primário e cultivado em um meio axênico onde as suas características de crescimento são reproduzidas.

presença dessas enzimas nos parasitos pode servir como uma forma de escape contra os efeitos citotóxicos do ATP.

I.4.1. *Trichomonas gallinae*

I.4.1.1. Morfologia

O *T. gallinae* é um protozoário flagelado que não apresenta forma cística, somente a trofozoítica. O parasito apresenta forma elipsóide alongada, com um comprimento que varia de 12,5 a 20,0 μM . A porção anterior do trofozoíto apresenta quatro flagelos originados do complexo citossomal. A membrana ondulante, com bordas livres e delimitada por um flagelo recorrente, é a estrutura responsável pela locomoção do parasito, juntamente com os flagelos. O axóstilo aparece como uma estrutura mais rígida, atravessando longitudinalmente o centro do parasito, prolongando-se até a extremidade posterior. O *T. gallinae* é desprovido de mitocôndrias e os hidrogenossomos são as organelas responsáveis pela produção de energia. O núcleo apresenta-se oval ou elipsóide, contendo grânulos de cromatina uniformemente distribuídos com a presença de um único nucléolo (Bondurant & Honigberg, 1994) (Fig 1).

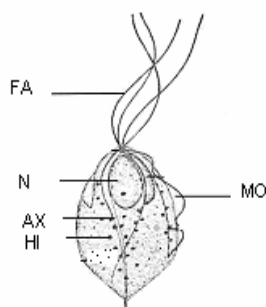


Fig. 1: Aspectos morfológicos do *T. gallinae*. FA (flagelo anterior), N (núcleo), MO (membrana ondulante), AX (axóstilo), HI (hidrogenossomos).

Quando observado no microscópio eletrônico de varredura (MEV), a superfície do *T. gallinae* apresenta-se franzida ou enrugada. Os quatro flagelos anteriores são de tamanho desigual, mostrando-se unidos por uma curta distância após emergirem do corpo, pelo canal periflagelar. Este último encontra-se reforçado por uma estrutura membranosa denominada pelta. Uma membrana ondulante bem desenvolvida se estende por aproximadamente todo o corpo do parasito, apresentando inúmeras ondas na sua extensão. A parte externa da membrana ondulante consiste de um filamento acessório e é delimitada por um flagelo recorrente, sendo que este não continua em extensão a ponto de formar um flagelo posterior livre (Tasca e De Carli, 2003).

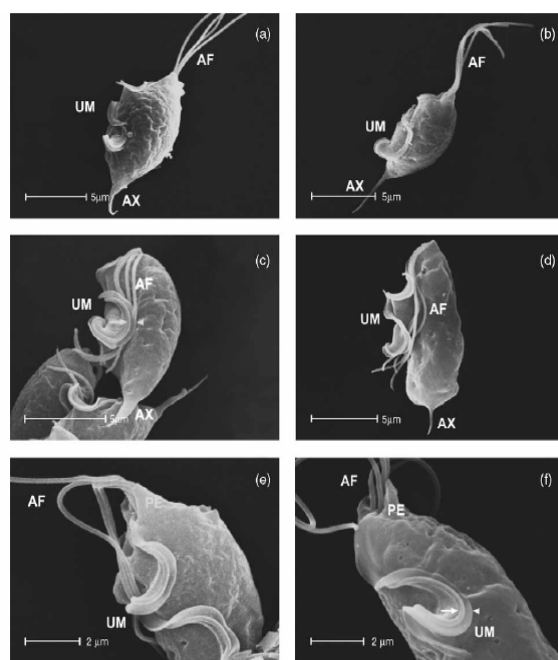


Fig. 2. Morfologia dos trofozoítos de *T. gallinae* observada por microscopia eletrônica de varredura. Trofozoítos de *T. gallinae* (AF: flagelo anterior, UM: membrana ondulante, AX: axóstilo, PE: pelta).As partes (c) e (f) mostram o filamento acessório e o flagelo recorrente (Tasca e De Carli, 2003).

I.4.1.2. Metabolismo

O *T. gallinae* é anaeróbico facultativo, capaz de utilizar a glicose, frutose, galactose, manose, lactose e ribose como carboidratos (Read, 1957; Daly, 1970). Os glicídeos diferem não somente nas propriedades estimuladoras do crescimento e da fermentação, mas também no efeito que eles produzem sobre o tamanho dos organismos na fase estacionária e sobre o nível de produção e estocagem de glicogênio, sendo este último fator diretamente responsável pelo tamanho do protozoário (Daly et al., 1974). Evidências sugerem que diferenças entre os isolados são responsáveis, pelo menos em parte, pelas diferenças relatadas por vários pesquisadores na utilização de açúcares e na produção de gases (Read, 1957; Honigberg and Pierce, 1963; Daly et al., 1974). Diferenças genéticas, como aquelas manifestadas pelo polimorfismo das enzimas do metabolismo dos carboidratos (hexoquinase, fosfo glicomutase) são características de todos os tricomonadídeos estudados até a atualidade, especialmente do *T. gallinae* (Bondurant e Honigberg, 1994; Nadler and Honigberg, 1988). Outras enzimas, como a malato desidrogenase e a lactato desidrogenase, também foram descritas em *T. gallinae* (Betterton e Dowda, 1976).

Uma característica comum do gênero *Trichomonas* é a incapacidade de realizar a síntese *de novo* de purinas e pirimidinas. Deste modo, o crescimento dos trofozoítos depende das vias de salvação para gerar nucleotídeos (Heyworth et al, 1982; 1984, Wang, 1990; Munagala e Wang, 2003).

I.4.1.3. Epidemiologia, Formas de transmissão e Patologia

O *T. gallinae* apresenta uma distribuição cosmopolita. O parasito é encontrado em pombos e em uma variedade de aves, como pardais, cardeais, papagaios, codornas e perus; sendo que nesta última espécie, a infecção tem causado importantes perdas econômicas. O *T. gallinae* pode ser encontrado também em galinhas e pássaros domésticos (BonDurant e Honigberg, 1994).

Em pombos, a tricomonose é transmitida pela ave adulta para sua prole no momento da alimentação, contaminando a ninhada minutos após o nascimento. A infecção pelo *T. gallinae* pode ser assintomática ou sintomática, podendo progredir para casos fatais entre 4 e 18 horas após a infecção. A tricomonose é considerada a maior causa de morte entre os pombos recém-nascidos. Falcões e outros pássaros selvagens podem se contaminar após se alimentarem de um pássaro infectado. Perus e galinhas adquirem a infecção através de água e grãos contaminados após o contato com os bebedouros e recipientes de alimentação (Tasca e De Carli, 2006). Os trofozoítos de *T. gallinae* podem permanecer vivos durante várias horas na água e por 5 dias nos grãos e são capazes de infectar outras aves que venham a se alimentar nestes recipientes.

Uma vez adquirida, a infecção pode persistir por um longo período, atingindo até mesmo dois anos (BonDurant e Honigberg, 1994). Os sítios de infecção mais comuns pelo *T. gallinae* são a boca, a faringe, o esôfago e o papo, sendo que a maioria dos isolados nunca abandona o trato digestivo superior. Inicialmente, o parasito provoca a formação de úlceras (Fig 3a), de cor branca-cremosa, úmida, com a presença de exudato na superfície da mucosa. Após a infecção se tornar crônica, essas lesões se tornam amareladas, maiores de tamanho, podendo

penetrar no crânio, nos olhos e atingir o sistema circulatório, causando necrose no fígado, baço, pâncreas, coração, pulmões e sacos aéreos (Bondurant e Honigberg, 1994) (Fig 3b, 3c).

Existe uma ampla variação do potencial de virulência dos isolados de *T. gallinae*; alguns não são patogênicos, outros o são apenas moderadamente e ainda, existem isolados muito virulentos. A expressão da patogenicidade é afetada pelas condições imunológicas do hospedeiro e pela diferença dos níveis de patogenicidade inerente aos parasitos (Bondurant & Honigberg, 1994).

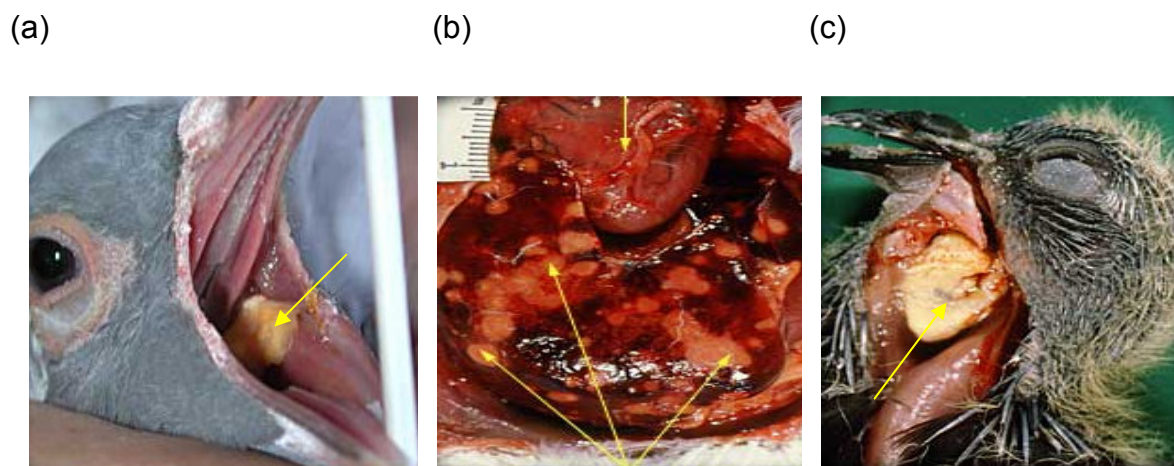


Fig 3: Características da infecção provocada por *T. gallinae*. (a) Lesão no papo característica de infecção pelo *T. gallinae*. (b) Formação de lesões caseosas no sistema digestivo, após o parasito invadir o sistema circulatório. (c) Lesão no papo de um pombo recém-nascido, mostrando obstrução do sistema digestivo superior e sistema respiratório, causando asfixia no animal. As setas indicam as lesões (www.albertaclassic.net/trichomonas/trichomonas.php).

I.4.1.4. Sintomas Clínicos, Diagnóstico e Tratamento

Os pássaros infectados pelo *T. gallinae* apresentam uma variedade de sintomas. Entre estes se destacam apatia, salivação em excesso, dificuldade de fechar o bico, respiração ofegante, dificuldade de se alimentar e beber, diarreia,

inchaço no papo e odor fétido no bico. Os pássaros geralmente morrem por sufocação devido ao bloqueio da traquéia causada pela lesão (Tasca e De Carli, 2006).

O diagnóstico da tricomonose pode não ser fácil, uma vez que a lesão assemelha-se às lesões causadas por outros parasitos, como candidíase. Sendo assim, o diagnóstico definitivo se dá pela identificação do parasito microscopicamente ou através da cultura (Levine, 1973; Samour et al., 1995).

A coleta do material a ser examinado deve ser feita com o auxílio de um *swab*, o qual é introduzido na garganta do animal. O material coletado deve ser imediatamente imerso em solução de cloreto de sódio glicosada e observada a fresco entre lâmina e lamínula. O restante do material é inoculado em meio de cultura TYM (*trypticase-yeast extract-maltose*) (Diamond, 1957).

O tratamento é somente viável em pássaros de cativeiro, uma vez que os fármacos utilizados requerem administração oral forçada, ou na alimentação ou na água dos criadouros. Os medicamentos antiprotozoários utilizados são o dimetridazol, metronidazol, sulfato de cobre, compostos de amônia quaternária, carnidazol e aminonitrotiazol. O uso de dimetridazol (400 mg/L) na água dos bebedouros, por no mínimo três dias, tem sido eficaz no controle da infecção pelo *T. gallinae* (Inghelbrecht et al., 1996).

Para controlar a tricomonose, as fontes de infecção devem ser eliminadas. Nos cativeiros, deve-se eliminar ou tratar aves infectadas e aves adultas cuja prole se tornou infectada. Além disso, é necessário manter a água dos bebedouros sempre fresca (Butcher, 2003), juntamente com regular desinfecção dos recipientes de água e comida.

I.4.1.5. Fatores que afetam a patogenicidade

Alguns estudos demonstraram a perda do potencial patogênico do *T. gallinae* após este ser submetido a longos períodos de cultivo *in vitro* (Honigberg, 1961, Stabler et al., 1964). Foi também demonstrado que o cultivo do parasito na presença de antibióticos, como penicilina e estreptomicina, resultou em uma rápida perda de virulência. O isolado testado, extremamente virulento, foi incapaz de causar infecção em pombos após ser cultivado *in vitro* durante 9 semanas (Stabler et al., 1964).

I.4.2. Nucleotídeos extracelulares

Além de desempenharem inúmeras funções no meio intracelular, nucleotídeos da purina e pirimidina também podem ser encontrados em quantidades significativas no espaço extracelular (Dombrowski et al., 1998). Diferentes tipos de células, como neutrófilos e células endoteliais, em situações de estresse, lesão ou metabolismo ativo são capazes de liberar nucleotídeos para o meio extracelular (Fredholm, 1997). Quando liberados no meio extracelular, estes compostos interagem com receptores específicos denominados purinoceptores localizados na superfície das células alvo (Gordon, 1986; Zimmermann et al., 1998). Quando ligados a esses receptores, os nucleotídeos extracelulares desempenham importantes e diversos efeitos em muitos processos biológicos, tanto em organismos unicelulares como órgãos e sistemas (Ralevic e Burnstock, 1998). Os receptores de adenosina, ou receptores P1, são divididos em 4 subtipos, A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, todos ligados a proteínas G. Os receptores P2 reconhecem ATP, ADP, UTP e UDP e são

classificados em P2X, que são canais iônicos, e P2Y, receptores associados a proteínas G (Ralevic e Burnstock, 1998).

Sabe-se que o ATP e o ADP estão envolvidos em diferentes mecanismos fisiológicos, como contração do músculo liso (Ventura et al., 2003), neurotransmissão (Edwards et al., 1992; Evans et al., 1992), tromborregulação (Marcus et al., 2005) e adesão celular (Kolosova et al., 2005). Além disso, estudos demonstram que os nucleotídeos extracelulares apresentam propriedades citotóxicas, podendo matar diferentes células, exceto àquelas que possuem alto nível de hidrólise de ATP na sua superfície (Filippini et al., 1990; Ferrari et al., 1997). Em parasitos, a atividade das enzimas que hidrolisam nucleotídeos está relacionada com virulência e evasão dos parasitos (Barros et al., 2000; Jesus et al., 2002).

I.4.3. Ectonucleotidasas

As ectonucleotidasas são enzimas localizadas na superfície celular, sendo responsáveis pela inativação, via hidrólise, dos nucleotídeos extracelulares. Essas enzimas apresentam sítio catalítico voltado para o lado externo da membrana (Zimmermann, 1996). As ectonucleotidasas incluem a família das E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), a família das E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), a ecto-5'-nucleotidase e as fosfatases alcalinas (Figura 4) (Zimmermann, 2001).

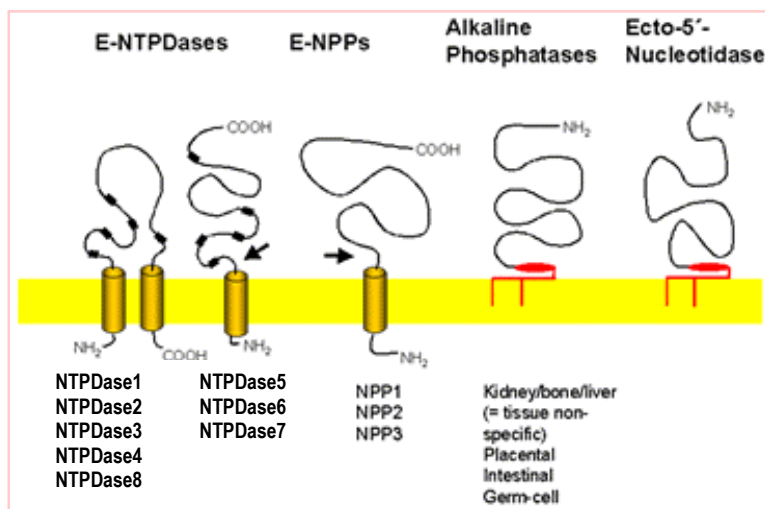


Figura 4. Topografia de membrana das ectonucleotidases. As setas indicam os sítios de clivagem que produzem proteínas solúveis. Os cinco domínios marcados em preto representam as regiões conservadas da apirase. (Adaptado de Zimmermann, H. 2001).

I.4.3.1. Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases - NTPDases

A família das NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) inclui as enzimas que hidrolisam uma variedade de nucleotídeos di- e trifosfatados a seus respectivos monofosfonucleosídeos e fosfato inorgânico (Bigonnesse et al., 2004). As enzimas dessa família possuem algumas características em comum, como dependência de cátions divalentes, insensibilidade a inibidores específicos de ATPases (Sarkis et al., 1995) e apresentam atividade ótima em pH alcalino.

Em mamíferos, oito membros pertencentes à família das NTPDases já foram clonados e caracterizados funcionalmente. Existe similaridade do gene com espécies de invertebrados, plantas, leveduras e protozoários (Handa e Guidotti, 1996; Vasconcelos et al., 1996; Smith et al., 1997; Zimmermann 1999), embora possam diferir consideravelmente apesar da identidade das seqüências. Entretanto, essas enzimas apresentam regiões altamente conservadas, denominadas “regiões conservadas da apirase, ACRs”, que são essenciais para o sítio catalítico (Zimmermann, 2001). A família E-NTPDase é composta por oito enzimas

classificadas como NTPDase1, 2, 3 e 8, localizadas na superfície das células e NTPDase4 a 7, situadas intracelularmente, apresentando massas moleculares na ordem de 70-80 KDa (Zimmermann, 2001; Shi et al., 2001; Bigonnesse et al., 2004).

As E-NTPDases apresentam uma ampla distribuição, podendo ser encontradas em diversas espécies de plantas (Vara e Serrano, 1981; Handa e Guidotti, 1996), insetos (Valenzuela et al., 1989; Faudry et al., 2004), e em uma variedade de tecidos de mamíferos (Sarkis et al., 1995; Sévigny et al., 1997; Lemmens et al., 2000; Kukulski e Komoszynski, 2003). Devido a ampla distribuição das E-NTPDases, tornou-se importante diferenciá-las das ATPases, enzimas que hidrolisam o nucleotídeo trifosfatado da adenina. De tal modo, a classificação da família das E-NTPDases tem sido adotada baseada nas características moleculares e bioquímicas, localização celular e nas diferentes razões de hidrólise ATP:ADP (Zimmermann, 2001). Independente da localização, as NTPDases estão envolvidas na degradação de nucleosídeos 5'-di e 5'-trifosfatados. Com exceção da ecto-ATPase (denominada como NTPDase2), todos os outros sete membros da família E-NTPDase podem ser considerados apirases (Zimmermann, 2001).

As NTPDase1 a 3 e 8 situam-se na membrana plasmática, com sítio ativo voltado para o lado extracelular. Essas enzimas apresentam ampla especificidade a substratos, sendo capazes de hidrolisar nucleosídeos 5'-di e 5'-trifosfatados (Sarkis et al., 1995; Zimmerman, 2001). Os valores de K_M (Constante de Michaelis) para ATP e ADP estão na ordem micromolar (Zimmermann, 2001). A NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfohidrolase, EC 3.6.1.5) apresenta uma razão de hidrólise ATP:ADP de 1:0,8, diferencialmente da NTPDase2, uma ATPase com substancial preferência pelo ATP (razão de hidrólise ATP:ADP igual a 1:0,03) (Wang e Guidotti, 1996; Kirley, 1997; Zimmermann, 1999). A NTPDase3 (HB6) é um intermediário

funcional e hidrolisa ATP aproximadamente três vezes mais que ADP (Smith e Kirley, 1998). As NTPDases são insensíveis a inibidores clássicos das ATPases intracelulares ou fosfatases (Plesner, 1995), mas são inibidas por azida em concentrações de 10 a 20 mM (Sarkis et al., 1995). Ortovanatado de sódio também tem sido relatado como inibidor de apirases (Valenzuela et al., 1989; Traverso-Cori et al., 1970; Pilla et al., 1996; Oses et al., 2004). Recentemente, uma enzima localizada na membrana plasmática, demonstrando dependência absoluta por cátions divalentes, foi clonada e caracterizada em membranas plasmáticas de células de fígado, jejuno e rins de camundongos (Bigonnesse et al., 2004). Essa enzima, classificada como NTPDase8, apresentou uma identidade de 20-50% com outras NTPDases de mamíferos.

A NTPDase4 é uma enzima encontrada no espaço intracelular, situando-se no complexo de Golgi (Wang e Guidotti, 1998) e nos vacúolos lisossomais (Biederbick et al., 2000). Essa enzima hidrolisa ATP, ADP e outros nucleosídeos 5'-di e 5'-trifosfatados, tendo preferência por nucleotídeos UTP e CTP. A NTPDase5 (CD39L4) e a NTPDase6, ambas enzimas intracelulares, hidrolisam nucleosídeos difosfatados com uma maior preferência e podem ser liberadas para o meio extracelular como enzimas solúveis após clivadas na seqüência N- terminal (Yeung et al., 2000). A NTPDase7 hidrolisa preferencialmente os nucleosídeos trifosfatados UTP, GTP e CTP somente na presença de cálcio e apresenta uma localização intracelular (Shi et al., 2001).

I.4.3.1.1. Hidrólise de nucleotídeos em parasitos

Diversos autores têm relatado a presença de enzimas que hidrolisam nucleotídeos na superfície de parasitos, atribuindo a elas diferentes funções na infecção das células hospedeiras. O protozoário *Toxoplasma gondii* foi um dos primeiros parasitos no qual uma atividade de hidrólise de ATP foi descrita e denominada NTPase (nucleosídeo trifosfato hidrolase) (Asai et al., 1983; Asai e Suzuki, 1990). Em *Schistosoma mansoni*, uma ATP difosfohidrolase foi caracterizada (Vasconcelos et al., 1993), sugerindo dano à homeostasia do hospedeiro por prevenir a ativação plaquetária induzida por ADP. Barros e colaboradores (2000) caracterizaram uma ectonucleotídeo difosfohidrolase em *Entamoeba histolytica*, associando a atividade de hidrólise do ATP com virulência e evasão dos parasitos. Além disso, uma atividade de ecto-ATPase dependente de magnésio foi caracterizada em *Leishmania tropica* (Meyer-Fernandes et al., 1997) e em *Leishmania amazonensis* (Berrêdo-Pinho et al., 2001). Coimbra e colaboradores (2002) caracterizaram uma ATP difosfohidrolase na superfície de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, sugerindo a participação da enzima na via de salvação de nucleosídeos.

Uma atividade ecto-ATPásica foi descrita na superfície de *Trypanosoma cruzi*, bem como sua possível função nas interações celulares parasito-hospedeiro (Bisaggio et al., 2003). Recentemente, uma ATP difosfohidrolase também foi caracterizada em *Trypanosoma cruzi* (Fietto et al., 2004), sugerindo um possível papel da enzima nos mecanismos de virulência do parasito.

Três distintas ATPases foram identificadas em *Trichomonas vaginalis* (Turner e Lushbaugh, 1991), apresentando diferentes pHs ótimos, cátion-

dependência e sensibilidade a inibidores. Matos et al. (2001) caracterizaram uma ATP difosfohidrolase em *T. vaginalis*. A enzima hidrolisa nucleotídeos di e trifosfatados, apresenta cálcio-dependência e não é inibida pelos inibidores clássicos das ATPases (como ouabaína, ortovanatado de sódio e azida sódica em baixas concentrações). Uma ecto-fosfatase foi caracterizada em *T. vaginalis*, apresentando localização na superfície e em vacúolos intracelulares do parasito (Jesus et al., 2002). A presença de ectonucleotidases na superfície dos parasitos pode servir como um meio de escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro, modulando a concentração de nucleotídeos no meio extracelular, protegendo-os dos efeitos citolíticos do ATP.

Além disso, através da hidrólise seqüencial de ATP a AMP, as NTPDases podem estar envolvidas na via de salvação das purinas extracelulares. O AMP, posteriormente degradado a adenosina pela ecto-5'-nucleotidase, serve como fonte de adenosina, com subsequente transporte deste nucleosídeo através de transportadores específicos (Handa e Guidotti, 1996).

I.4.3.2. 5'-nucleotidase

A 5'-nucleotidase ou nucleosídeo monofosfato fosfohidrolase é uma enzima que hidrolisa uma variedade de nucleotídeos monofosfatados, como AMP, CMP, UMP, IMP e GMP (Bianchi e Spychala, 2003), sendo o AMP o substrato preferencial. Sete 5'-nucleotidases humanas, possuindo diferentes localizações na célula, já foram caracterizadas e clonadas. A enzima encontra-se amplamente distribuída em tecidos de vertebrados (Grondal e Zimmermann, 1987; Zimmermann, 1992),

gerando adenosina a partir da hidrólise do AMP e conseqüente ativação dos receptores P1 de adenosina (Zimmermann, 2001).

A enzima 5'-nucleotidase pode ser encontrada na sua forma solúvel, como também ligada às membranas, sendo denominada de ecto-5'-nucleotidase. Essa forma apresenta o sítio de hidrólise voltada para o lado externo da membrana, sendo uma das enzimas pertencentes à cascata enzimática que hidrolisa o ATP até adenosina. Esse nucleosídeo é um importante modulador em vários processos fisiológicos, atuando como vasodilatador. A adenosina é de fundamental importância para o crescimento e sobrevivência dos protozoários parasitos por ser o precursor de nucleotídeos em espécies que não possuem capacidade de realizar síntese *de novo* de purinas e pirimidinas (Wang, 1990; Munagala e Wang, 2003).

I.5. Objetivos

Considerando a alta prevalência de tricomonose em pombos domésticos e a importância veterinária e econômica desta parasitose (Tasca e De Carli, 2006), o estudo bioquímico do *T. gallinae* pode levar ao maior conhecimento sobre o desenvolvimento do parasito. Com esta finalidade, o presente estudo teve como objetivos:

1. Realizar a caracterização bioquímica de uma NTPDase na superfície de trofozoítos de *T.gallinae*;
2. Determinar as condições ótimas para a atividade da ecto-5'-nucleotidase na superfície de trofozoítos de *T.gallinae*.

PARTE II

II. 1. Capítulo 1

Extracellular ATP and ADP hydrolysis in intact trophozoites of *Trichomonas gallinae*

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Parasitology

Extracellular ATP and ADP hydrolysis in intact trophozoites of *Trichomonas gallinae*

Fernanda Pires Borges^{a,b}, Patrícia de Brum Vieira^b, Renata Cristina Machado Wiltuschnig^b, Tiana Tasca^c, Geraldo Attilio De Carli^b, Carla Denise Bonan^{d,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^bLaboratório de Parasitologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

^cCentro Universitário Metodista IPA, Rua Cel. Joaquim Pedro Salgado, 80, 90420-060, Porto Alegre, RS, Brazil

^dFaculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

Carla Denise Bonan, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681 – Prédio 12, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3320 3500/ Ext. 4158

Fax: + 55 51 3320 3612

e-mail: cbonan@pucrs.br

Running: NTPDase activity in *T. gallinae*

Abstract

In the present report, we describe an NTPDase (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) activity in living trophozoites of *Trichomonas gallinae*. The enzyme hydrolyzes a variety of purine and pyrimidine nucleosides di and triphosphates in an optimum pH range of 6.0-8.0. This enzyme activity was activated by high concentrations of divalent cations, such as calcium and magnesium. Contaminant activities were ruled out because the enzyme was not inhibited by classical inhibitors of ATPases (1.0 mM ouabain, 5.0 mM sodium azide, 2.0 µg/mL oligomycin) and alkaline phosphatases (1.0 mM levamisole). A significant inhibition of ATP hydrolysis (38%) was observed in the presence of 20 mM sodium azide. Sodium orthovanadate (0.1 mM) inhibited ATP and ATP hydrolysis (24% and 78%), respectively. These compounds have been described as inhibitors of some NTPDases (apyrases). The apparent K_M (Michaelis constant) values was $65.62 \pm 15.55 \mu\text{M}$ for ATP and $122.66 \pm 3.51 \mu\text{M}$ for ADP (mean \pm S.D). V_{max} (maximum velocity) values were $0.20 \pm 0.03 \text{ nmolPi/min}/10^6$ trichomonads and $0.70 \pm 0.09 \text{ nmolPi/min}/10^6$ trichomonads for ATP and ADP, respectively (mean \pm S.D). The presence of an NTPDase activity in *T. gallinae* may be involved with pathogenicity, protecting the parasite from the cytolytic effects of the extracellular nucleotides.

Keywords: apyrase, NTPDase, nucleotidases, trichomonads, extracellular nucleotides, *Trichomonas gallinae*.

Introduction

Trichomonas gallinae is a flagellated protozoan which parasitizes a variety of birds all over the world. The domestic pigeon, *Columba livia*, is the primary host of this parasite. This trichomonad occurs in the upper digestive tract and in various organs of different avian groups (Stabler, 1954; De Carli et al, 1979). Other columbiform hosts have been found to harbor the parasite, as have also galliform birds, Java sparrows, raptors and sea gulls. This trichomonad species has caused important economic losses, especially in turkeys as well as in chickens and pet birds (BonDurant and Honigberg, 1994).

The normal sites of *T. gallinae* are the mouth, pharynx, esophagus and crop, where they cause the formation of caseous lesions. In pigeons, trichomonosis is mainly a disease of young birds, causing serious losses among these birds. The protozoan is the causative agent of canker in pigeons, causing a variety of pathological manifestations depending on the parasite isolate and the infected bird species. The virulent isolates may cause lesions in the upper digestive tract of birds, which allow the pathogen to enter the circulatory system, gain access to the liver, lungs, heart and pancreas (Baker, 1986; Cooper and Petty, 1988).

Besides its energy function in the intracellular environment, ATP has several effects on many biological processes, and can be found in significant concentrations outside cells (Dombrowski et al, 1998; Gordon, 1986). The level of exogenous ATP may be increased in various inflammatory and shock conditions, mainly as a consequence of nucleotide release from platelets, endothelial and blood vessel cells (Hantgan, 1984; Bodin and Burnstock, 1996; Dubyak, 2000), modulating biological processes by binding to specific cell surface receptors. In addition, extracellular ATP

may act as a signalling compound in cytolytic mechanisms (Fillipini et al, 1990; Steinberg and Di Virgilio, 1991), causing plasma membrane depolarization, Ca^{2+} influx and cell death.

After exert their actions, ATP and other nucleotides can be inactivated through hydrolysis by ecto-nucleotidases. This group includes the E-NTPDase family (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family), the E-NPP family (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family), ecto-5'-nucleotidase and alkaline phosphatases (Zimmermann, 2001). Some of these enzymes are attached to the plasma membrane with their active sites facing the extracellular side/environment. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDases) are enzymes that hydrolyze ATP, ADP and other triphosphonucleosides and diphosphonucleosides to their equivalent monophosphonucleosides and inorganic phosphate (Zimmermann and Braun, 1999). Furthermore, they are activated by high concentrations of divalent cations and they are not inhibited by classical inhibitors of ATPases or alkaline phosphatase (Plesner, 1995; Zimmermann, 1996). The eighth members already described of this protein family differs in their cellular localization and preference for nucleoside 5'-diphosphates (Zimmermann, 2001; Bigonnesse et al., 2004).

The activities of the ecto-enzymes can be measured using living cells (Meyer-Fernandes et al, 1997; Furuya et al, 1998). The presence of these enzymes has been demonstrated in the surface membranes in some parasites. Vasconcelos et al (1993, 1996) characterized and purified an ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, CD39, NTPDase1) on external surface of *Schistosoma mansoni*. Turner and Lushbaugh (1991) identified three ATPases in the sedimentable fractions of *Trichomonas vaginalis*. An Mg-dependent ecto-ATPase activity has been described

on the external surface of *Leishmania tropica* (Meyer-Fernandes et al, 1997). An ecto-nucleotide diphosphohydrolase was described in intact cells of *Entamoeba histolytica* (Barros et al, 2000). Recently, Jesus et al. (2002) characterized an ecto-ATPase in *Tritrichomonas foetus*. Furthermore, an ATP diphosphohydrolase and an ecto-5'-nucleotidase were described in *Trichomonas vaginalis* (Matos et al, 2001; Tasca et al, 2003). However, the presence of these ecto-nucleotidases has not been demonstrated in other trichomonad species. The present study describes the properties of an NTPDase activity in intact trophozoites of *Trichomonas gallinae*, the etiologic agent of trichomonosis in birds.

Materials and methods

Parasite culture

The *T. gallinae* isolate, TG7, from the upper digestive tract of domestic pigeons, *C. livia*, was used in this study. Trichomonads were axenically cultured *in vitro* in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium (Diamond, 1957) without agar (pH 7.2) supplemented with 10% (v/v) inactivated bovine serum, without antibiotics (Stabler et al., 1964; Tasca and De Carli., 1999), at 37 °C. The isolates were kept alive in liquid nitrogen (-196 °C) with 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Honigberg et al., 1965). Trichomonads from the logarithmic phase of growth were collected by centrifugation at 750 x g for 5 min. The parasites were then washed 3 times with 0.9% (w/v) NaCl solution, counted with a haemocytometer and adjusted to a density of 4 x 10⁶ organisms/mL. All samples were run in triplicate, with results achieved in at least three different parasites suspensions. All organisms were viable based on

motility, assessed before and after incubations. The viability was not affected by incubation conditions.

Enzyme assays

After preparing the parasite samples, the optimum conditions for nucleotide hydrolysis were determined. Intact trophozoites of *T. gallinae* (10^6 trichomonads/mL) were added to the reaction mixture containing 50 mM Tris buffer (pH 7.2) and 1.0 mM CaCl_2 . The samples were preincubated for 5 min at 37 °C in the reaction mixture. The reaction was initiated by the addition of substrate ATP or ADP to a final concentration of 1.0 mM. After 15 min, the reaction was stopped by adding 200 μL 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice before assaying for the release of inorganic phosphate (Chan et al., 1986), using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Incubation times and parasite density were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. Controls included intact organisms added to the reaction mixtures containing TCA in order to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates, and the averages of control values were subtracted from the test samples. All enzyme assays were run in triplicate. Specific activity is expressed as nmol of Pi/min/ 10^6 trichomonads.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted by Student's *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was considered as $P < 0.05$.

Results

Extracellular nucleotide hydrolysis has been described in various sources, including the parasite surface (Sarkis and Saltó, 1991; Zimmermann, 1996; Matos et al., 2001; Tasca et al., 2003). Intact trophozoites of *T. gallinae* demonstrated the ability to hydrolyze ATP and ADP. The time course for ATP and ADP hydrolysis was linear up to 15 min in the presence of Ca^{2+} and the product formation increased as a function of parasite density in the range of $0.8\text{-}2.0 \times 10^6$ trichomonads/mL (data not shown).

Like other NTPDases, the enzyme was divalent cation-activated and Ca^{2+} was considered the best activator of ATP and ADP hydrolysis (Fig. 1), although Mn^{2+} and Mg^{2+} were also able to promote a stimulatory effect on NTPDase activity (data not shown). Considering these results, a concentration of 1.0 mM Ca^{2+} was selected for subsequent enzyme assays. Cation-activation was confirmed by a significant decrease in ATP and ADP hydrolysis in the absence of Ca^{2+} or in the presence of Ca^{2+} plus 10 mM EGTA, a cations chelator (Fig 1). To evaluate the optimum pH of these enzyme activities, Ca^{2+} -ATP and Ca^{2+} -ADP were used as substrates in a medium containing 50 mM Tris-Histidine (pH 6.0, 6.5, 7.2, 8.0, 9.0). The maximum rate of nucleotide hydrolysis was observed at pH 7.2 (data not shown).

We also investigated the ability of the enzyme to hydrolyze others di- and triphosphate nucleosides, once NTPDases have been described as enzymes with a broad substrate specificity (Sarkis and Saltó, 1991; Pilla et al, 1996; Zimmermann, 2001). All nucleotides tested were hydrolyzed by intact trophozoites of *T. gallinae* (Table 1). The high rate of AMP hydrolysis was probably due to an ecto-5'-nucleotidase activity present in the parasite surface. The low rate of pyrophosphate and cyclic AMP hydrolysis excludes the presence of non-specific pyrophosphatases

and phosphodiesterases as contaminant enzymes participating in ATP or ADP hydrolysis in *T. gallinae*.

To eliminate the possibility that the ATP hydrolysis was due to other possible contaminant enzymes, different inhibitors were tested (Table 2). No significant inhibition was observed with 1.0 mM ouabain ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ inhibitor), 5.0 mM sodium azide or 2.0 $\mu\text{g/mL}$ oligomycin (inhibitors of mitochondrial ATPase). Levamisole (1.0 mM), a specific alkaline phosphatase inhibitor, also did not inhibit the NTPDase activity. However, in the presence of 20 mM sodium azide, significant inhibition of ATP hydrolysis was observed (38%). When 0.1 mM sodium orthovanadate was tested, ATPase and ADPase activities were strongly inhibited (24% and 78%, respectively).

To show that a single active site is involved in ATP and ADP hydrolysis in the enzyme from intact trophozoites of *T. gallinae*, the competition plot described by Sarkis and Saltó (1991) was used. Intact organisms were incubated in the standard reaction medium containing 1.0 mM ATP, 1.0 mM ADP or a mixture containing 1.0 mM ATP and ADP at the same time (Fig 2). The activities obtained with each individual nucleotide were 0.14 ± 0.01 nmolPi/min/ 10^6 trichomonads and 0.49 ± 0.05 nmolPi/min/ 10^6 trichomonads for ATP and ADP, respectively. In the presence of a mixture containing both substrates at a final concentration of 1.0 mM, the specific activity was 0.39 ± 0.05 nmolPi/min/ 10^6 trichomonads. This value approximately corresponds to the arithmetic mean of the activities observed with each individual nucleotide, indicating that a single enzyme is involved in ATP and ADP hydrolysis (Fig.2).

ATP and ADP hydrolysis were determined at substrate concentrations in the range of 100 – 2000 μM (Fig 3). The enzyme activity increased with increasing

concentrations of the nucleotide in the presence of 1.0 mM Ca^{2+} . K_M and V_{\max} values for ATP and ADP hydrolysis were estimated from the Lineweaver-Burk plots. The apparent K_M (Michaelis constant) values were $65.62 \pm 15.55 \mu\text{M}$ for ATP and $122.66 \pm 3.51 \mu\text{M}$ for ADP. V_{\max} (maximum velocity) values were $0.20 \pm 0.03 \text{ nmolPi/min}/10^6$ trichomonads and $0.70 \pm 0.09 \text{ nmolPi/min}/10^6$ trichomonads for ATP and ADP, respectively.

Discussion

During the least two decades, considerable progress has been achieved in the study of ecto-nucleotidases in general (Zimmermann, 1996). Apyrases or NTPDases are enzymes which have been described in various sources, including the parasite surface (Sarkis et al, 1986; Sarkis and Saltó, 1991; Vasconcelos et al, 1993; Plesner, 1995). In this paper, we demonstrated that intact trophozoites of *Trichomonas gallinae* hydrolyzes adenine nucleotides, such as ATP, ADP and others di and triphosphate nucleotides, suggesting the presence of an NTPDase. A number of biochemical properties was determined for the *T. gallinae* NTPDase, including effects of divalent cations and inhibitors, pH optimum, substrate specificity and kinetic constants. The enzyme described has the following general properties which characterize the NTPDases: activation by divalent cations; insensitivity to classical ATPases inhibitors; inhibition by orthovanadate and sodium azide at high concentrations (20 mM).

It is known that nucleotides are released from dying or destroyed cells into the blood circulation under physiological conditions, after massive injury or traumatic shock (Trams, 1980). Previous studies have shown that extracellular ATP may act as

a signaling compound in cytolytic mechanisms (Steinberg and Di Virgilio, 1991). Filippini et al. (1991) have shown that ATP can kill different cells, with the exception of cells that express a high level of ATP-breakdown activity on their surface.

The presence of enzymes performing ATP, ADP and others nucleotides have been described in some protozoa. An ecto-ATP diphosphohydrolase on the surface of *S. mansoni* was characterized and purified (Vasconcelos et al, 1993; 1996). The authors suggested that this enzyme might be involved in an escape mechanism allowing the parasite to split ATP or ADP released in the environment. Barros et al. (2000) described the ability of living trophozoites of *Entamoeba histolytica* to hydrolyze extracellular ATP. The enzyme activity was stimulated by Mg^{2+} and others divalents cations, such Mn^{2+} and Ca^{2+} and several inhibitors had no effect on the ATPase activities. In some parasites, this enzyme activity has been associated with virulence and the evasion of parasites from the host defense mechanisms (Barros et al., 2000; Berrêdo-Pinho et al., 2001). Matos et al. (2001) reported the enzymatic properties of an apyrase in *Trichomonas vaginalis*. This Ca^{2+} -dependent enzyme hydrolyzes purine and pyrimidine nucleoside 5'-di and 5'-triphosphates and the activity is insensitive to classical ATPase inhibitors, such ouabain, orthovanadate and sodium azide (at low concentration). ADP hydrolysis was significantly inhibited in the presence of 20 mM sodium azide, an inhibitor of ATP diphosphohydrolase. In agreement to these findings, our results have shown that the ecto-enzyme from *T. gallinae* was inhibited by 20 mM sodium azide. Furthermore, orthovanadate at low concentration (0.1 mM) inhibited ATP and ADP hydrolysis from *T. gallinae*. Orthovanadate is known to inhibit transport ATPases, but this compound has been also described as an inhibitor of NTPDase from rat and human placenta (Traverso-Cori et al., 1970), salivary gland, mammary gland and rat uterus (Valenzuela et al.,

1989), and human platelets (Pilla et al., 1996). Jesus et al (2002) characterized an ecto-ATPase in living trophozoites of *Tritrichomonas foetus*. The ecto-ATPase was stimulated by Mg^{2+} , Mn^{2+} and Ca^{2+} . ATP was the best substrate for this enzyme, although other triphosphate nucleotides also produced high reaction rates. ADP was not a substrate for this enzyme. In *T. gallinae*, we reported an enzyme able to hydrolyze di and triphosphate nucleotides (ADP>UTP>CTP>GTP>UDP=GDP>ATP), but has a 3-fold preference for the hydrolysis of ADP over ATP. To exclude the possibility that the nucleotide hydrolysis were promoted by secreted soluble enzymes (Bermudes et al., 1994; Smith and Kirley, 1997), the parasite suspension was centrifuged and the supernatant was assayed in the conditions described in Materials and Methods. However, no ATP neither ADP hydrolysis were detected using this sample. Therefore, considering these findings and the viability of the intact organisms tested, we suggest an ecto-localization of the enzyme here described. The apyrase characterized in *Trichomonas vaginalis* (Matos et al., 2001) demonstrated broad substrate specificity and higher preference for ADP when compared to ATP, similar to the present findings in *T. gallinae*. The high rate of AMP hydrolysis observed was due to a 5'-nucleotidase activity probably in the surface of the parasite. Studies are in progress in our laboratory in order to characterize this enzyme activity in *T. gallinae*.

The presence of enzymes performing ATP, ADP and AMP hydrolysis in this parasite may be important for the modulation of nucleotide concentration in the extracellular medium. Different functions in host-cell infection attributed to these enzymes have been proposed, such as involvement in cellular adhesion and cancer metastasis (Kosolova et al., 2005), modulation of apoptosis, regulation of P2 receptors, neurotransmission and signal transduction (Dubyak and El-Moatassin, 1993). In some parasites, the level of ATP-breakdown activity on their surfaces is

associated with virulence and evasion of parasites, escaping of the host defense mechanisms (Barros et al, 2000; Berrêdo-Pinho et al, 2001). Considering that *T. gallinae* is a serious pathogen of birds causing a variety of pathological manifestations including lesions in various organs due to access into blood circulation, the presence of enzyme activity that inactivates extracellular ATP is a defense mechanism for the parasite to escape from cytolytic effects and to acquire success in parasitism. Furthermore, modulation of nucleotide concentration may have an important role during inflammation, since extracellular ATP is an immunomodulatory molecule, involved in lymphocytes function regulation through stimulation of cytokines interleukin-2 (IL-2) and γ -interferon (IFN- γ) (Langston et al., 2003). On the other side, adenosine may act as an anti-inflammatory agent and, through interaction with specific receptors, this compound regulates the consequences of inflammation (Cronstein et al., 1992; Haskó and Cronstein, 2004). In addition, trichomonads lack the ability to synthesize purines and pyrimidines *de novo* and their growth and survival depend of salvage pathways to generate nucleotides (Heyworth et al., 1982, 1984). Munagala and Wang (2003) showed that adenosine is the primary precursor of the entire purine nucleotide pool in *T. vaginalis* and they identified adenosine deaminase, IMP dehydrogenase, and GMP synthetase activities in the parasite lysate, suggesting a pathway capable of converting adenine to GMP via adenosine. Then, it is strongly suggested that the presence of ecto-nucleotidases in trichomonads protects the parasite from the cytolytic effects of nucleotides and provides the adenosine required for parasite growth.

Acknowledgements

Grateful thanks to Dra. Flávia Valadão Thiesen, Pharmacy School (PUCRS) Chairwoman for her support and to Bárbara Gottardi, Cristiane Stuepp and Anne Brandolt Larré for technical assistance. This work was partially supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

References

- Baker, J.R.** (1986). Trichomoniasis, a major cause of vomiting in budgerigars. *Veterinary Record* **118**, 447-449.
- Barros, F.S., De Menezes, L.F., Pinheiro, A.A.S., Silva, E.F., Lopes, A.H.C.S., De Souza, W., Meyer-Fernandes, J.R.** (2000). Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **375**, 304-314.
- Bermudes, O., Peck, K.R., Afifi, M.A., Beckers, C.J.M., Joiner, K.A.** (1994). Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry* **269**(46):29252-60.
- Berrêdo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C.E., Chrispim, P.P.M., Belmont-Firpo, R., Lemos, A. P., Martiny, A., Vannier-Santos, M.A., Meyer-Fernandes, J. R.** (2001). A Mg-Dependent Ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and Its Possible Role in Adenosine Acquisition and Virulence. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **391**, 16-24.

- Bigonnesse, F., Levesque, S.A., Kukulski, F., Lecka, J., Robson, S.C., Fernandes, M.J., Sevigny, J.** (2004). Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*. **43**, 5511-5519.
- Bodin, P., Burnstock, G.** (1996). ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. **27** (6), 872-875.
- BonDurant, R. H., Honigberg, B. M.**(1994). Trichomonads of veterinary importance In *Parasitic Protozoa* (ed.Kreier, J.), pp. 111-206. Academic Press, New York, N.Y.
- Chan, K., Delfert, D., Junguer, K. D.** (1986). A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Analytical Biochemistry*. **157**, 375-380.
- Cooper, J.E., Petty, S.J.** (1988). Trichomoniasis in free-living goshawks (*Accipiter gentilis gentilis*) from Great Britain. *Journal of Wildlife Diseases*. **24**, 80-87.
- Cronstein, B.N., Levin, R.I., Philips, M., Hirschhorn, R., Abramson, S.B., Weissmann G.** (1992) Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *Journal of Immunology* **148**, 2201-6.
- De Carli, G. A., Pansera, M. C. G., Guerrero, J.** (1979). *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878) Stabler, 1938, from the upper digestive tract of the common pigeon, *Columba livia*, in the state of Rio Grande do Sul, Brasil - First register. *Acta Biologica Leopoldensia* **1**, 85-95.
- Diamond, L.S.** (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology* **43**, 488-490.
- Dombrowski, K., Ke, Y., Brewer, K.A., Kapp, J.A.** (1998). Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunology Reviews* **161**, 111-118.

- Dubyak, G.R., El-Motassin, C.** (1993). Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *American Journal of Physiology* **265**, C577-606.
- Dubyak, G.R.** (2000). Purinergic signaling at immunological synapses. *Journal of the Autonomic Nervous System*. **81**(1-3), 64-68.
- Filippini, A., Taffs, R.E., Agui, T., Sitkovsky, M.V.** (1990). Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 334-340.
- Furuya, T., Zhong, L., Meyer-Fernandes, J.R., Lu, H.G., Moreno, S.N.J., Docampo, R.** (1998). Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **92**(2):339-48.
- Gordon, J. L.** (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochemical Journal*. **233**, 309-319.
- Hantgan, R.R.** (1984). A study of the kinetics of ADP-tiggered platelet shape change. *Blood*. **64**, 896-906.
- Hasko, G., Cronstein, B.N.**(2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology* **25**, 33-9.
- Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E., Ginger, C.D.** (1982). Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters* **141**, 106-110.
- Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E., Ginger, C.D.** (1984). Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters* **176**, 55-60.
- Honigberg, B. M., Faris, V. K., Livingston, M. C.** (1965). Preservation of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* in liquid nitrogen. Prog. Protozool., International. Conference on Protozoology., 2nd Excerpta Medica Foundation. International. Congress. Ser. No. **91**, p. 199.

- Jesus, J. B., Lopes, A. H. C. S., Meyer-Fernandes, J. R.** (2002). Characterization of an ecto-ATPase of *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Parasitology* **103**, 29-42.
- Kolosova, I.A., Mirzapoiiazova, T., Adyshev, D., Usatyuk, P., Romer, L.H., Jacobson, J.R., Natarajan, V., Pearse, D.B., Garcia, J.G., Verin, A.D.** (2005) Signaling pathways involved in adenosine triphosphate-induced endothelial cell barrier enhancement. *Circulation Research* **97**, 115-24.
- Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA.** (2003) Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *Journal of Immunology* **170**, 2962-70.
- Matos, J.A.A., Borges, F.P., Tasca, T., Bogo, M.R., De Carli, G.A., Fauth, M.G., Dias, R. D., Bonan, C.D.** (2001). Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology* **31**, 770-775.
- Meyer-Fernandes, J.R., Dutra, P.M.L., Rodrigues, C.O., Saad-Nehme, J., Lopes, A.H.C.S.** (1997). Mg-Dependent Ecto-ATPase Activity in *Leishmania tropica*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **341**, 40-46.
- Munagala, N.R., Wang, C.C.** (2003). Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **127**, 143-149.
- Pilla, C., Emanuelli, T. Frassetto, S. S., Battastini, A. M. O., Dias, R. D., Sarkis, J.J.F.** (1996). ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E C 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* **7**, 225-230.
- Plesner, L.** (1995). Ecto-ATPases: Identities and functions. *International Reviews on Cytology* **158**, 141-214.

- Sarkis, J.J.F., Guimarães, J.A., Ribeiro, J.M.C.** (1986). Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and Purification. *Biochemical Journal* **233**, 885-91.
- Sarkis, J.J.F., Saltó, C.** (1991). Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Research Bulletin* **26**, 871-76.
- Smith, T.M., Kirley, T.L., Henessey, T.M.** (1997). A soluble ecto-ATPase from *Tetrahymena thermophyla*: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **337**, 351-359.
- Stabler, R.M.** (1954). *Trichomonas gallinae*: a review. *Experimental Parasitology* **3**, 368-402.
- Stabler, R.M., Honigberg, B.M., King, V. M.** (1964). Effect of certain laboratory procedures on virulence of the Jone's Barn strain of *Trichomonas gallinae* for pigeons. *Journal of Parasitology* **50**, 36-41.
- Steinberg, T.H., Di Virgilio, F.** (1991). Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. *Current Opinion in Immunology* **3**, 71-75.
- Tasca, T., De Carli, G.A.** (1999). Hemolytic activity of fresh isolates and clones of *Trichomonas gallinae*. *Parasitologia al Día*. **23**, 69-73.
- Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M.O., Sarkis, J.J.F.** (2003). Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology*. **105**, 167-173.
- Trams, E.G.** (1980). A proposal for the role of ecto-enzymes and adenylates in traumatic shock. *Journal of Theoretical Biology* **87**(3):609-21.
- Traverso-Cori, A., Traverso, S., heyses, H.** (1970). Different molecular forms of potato apyrase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **137**, 133-142.

- Turner, A. C., Lushbaugh, W. B.** (1991). Three aspecific ATPases in *Trichomonas vaginalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **B 100**, 691-6.
- Valenzuela, M.A., López, J., Depix M., Mancilla, M., Kettlun, A.M., Catalan, L., Chiong, M., Garrido, J., Traverso-Cori, A.** (1989). Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plants sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **93B**, 911-9.
- Vasconcelos, E.G., Nascimento, P.S., Meirelles, M.N.L., Verjovski-Almeida, S., Ferreira, S.T.** (1993). Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of tegument of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **58**, 205-214.
- Vasconcelos, E.G., Ferreira, S.T., Carvalho, T.M.U., De Souza, W., Kettlun, A.M., Mancilla, M., Valenzuela, M.A., Verjovski-Almeida, S.** (1996). Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* **36**, 22139-22145.
- Zimmermann, H.** (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Progress in Neurobiology* **49**, 589-618.
- Zimmermann, H., Braun, N.** (1999). Ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties and functional roles in the nervous system. *Progress in Brain Research*. **120**, 371-385.
- Zimmermann, H.** (2001). Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Development Research* **52**, 44-56.

Legend to Figures

Fig. 1. Effect of CaCl_2 concentration on NTPDase activity in intact cells of *T. gallinae*. Closed and open bars represent ATPase and ADPase activity in presence of CaCl_2 , respectively. Incubation conditions were described in Materials and Methods. The control group was assayed without the addition of cation. Bars represent the means \pm SD for three experiments, using different cells suspensions. * Significant difference from activity in the presence of 1.0 mM CaCl_2 ($P < 0.05$).

Fig 2. Incubation of intact cells of *T. gallinae* in the presence of 1.0 mM ATP, 1.0 mM ADP or a mixture of 1.0 mM ATP and ADP simultaneously. The specific activity was approximately the arithmetic mean of the activities obtained with each individual nucleotide. Bars represent the means \pm SD for three experiments, using different cells suspensions.

Fig. 3. : Effect of different concentrations of substrate (100-2000 μM) on ATP and ADP hydrolysis in intact cells of *T. gallinae*. All experiments used fixed 1.0 mM Ca^{2+} with variable concentrations of nucleotide. Data represent mean \pm S.D. of three different experiments, each in triplicate.

Fig.1

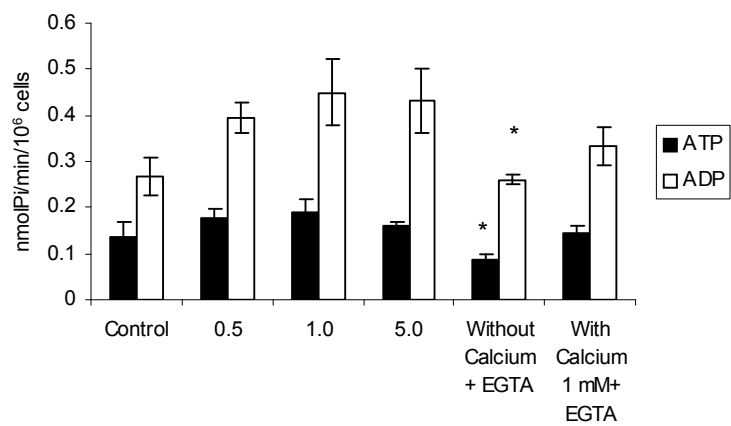


Fig. 2

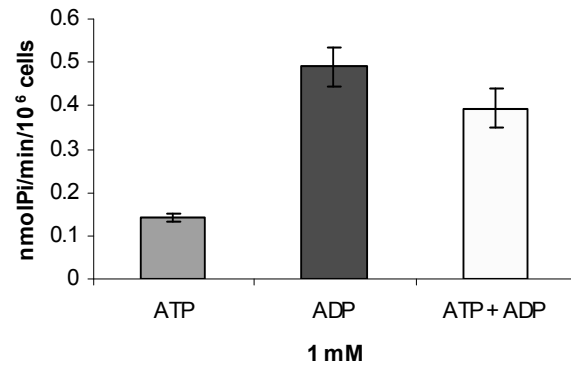


Fig.3.

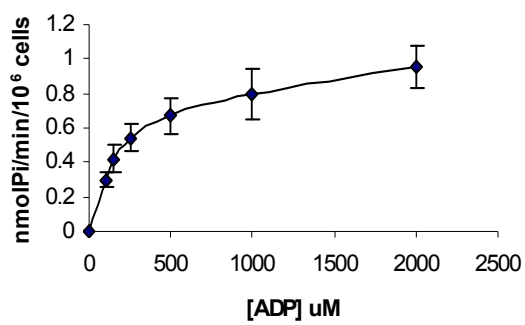
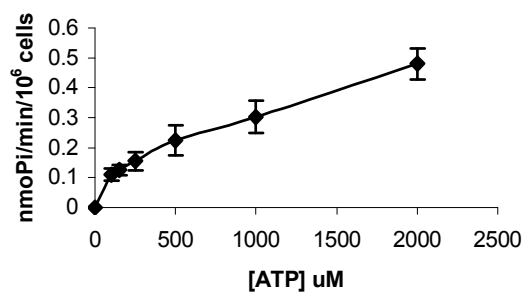


Table 1

Substrate specificity of NTPDase from intact cells of *T. gallinae*

Substrate	Relative activity
ATP	1.00
GTP	1.47 ± 0.29
GDP	1.35 ± 0.06
CTP	1.76 ± 0.23
UTP	1.94 ± 0.41
UDP	1.35 ± 0.29
ADP	2.8 ± 0.58
AMP	5.5 ± 1.00
Ppi	0.53 ± 0.07
AMPc	0.11 ± 0.03

Data represents means ± S.D. of at least three experiments. Control ATPase activity was 0.17 ± 0.05 nmolPi/min/ 10^6 cells. Results were expressed as relative activity (ATP hydrolysis – 1.00). The substrates were used at 1.0 mM (except AMP – 3.0 mM), with 1.0 mM CaCl₂.

Table 2

Table 2: Effect of inhibitors on NTPDase hydrolysis from intact cells of *T. gallinae*

Inhibitor	Concentration	% control enzyme activity	
		ATP	ADP
Orthovanadate	0.1 mM	76 ± 10*	22 ± 3*
Azide	5 mM	85 ± 20	94 ± 3
	20 mM	62 ± 14*	89 ± 12
Levamisole	1 mM	123 ± 10	115 ± 2
Oligomycin	2 µg/mL	81 ± 19	83 ± 7
Ouabain	1 mM	104 ± 24	87 ± 3

Results were expressed as percentage of control activity (100%). Control NTPDase activity was 0.21 ± 0.02 and 0.58 ± 0.12 nmolPi/min/ 10^6 cells for ATP and ADP, respectively. ATP and ADP were used at 1.0 mM, in the presence of CaCl₂ 1.0 mM. Data represent the means ± S.D. for at least three determinations. * Significant difference from control activity (100%) by Student's *t* test ($P < 0.05$)

II. 2. Capítulo 2

Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact trophozoites of *Trichomonas gallinae*

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Veterinary Parasitology

Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact trophozoites of *Trichomonas gallinae*

Fernanda Pires Borges^{a,b}, Bárbara Gottardi^b, Cristiane Stuepp^b, Anne Brandolt Larré^b, Tiana Tasca^c, Geraldo Attilio De Carli^b, Carla Denise Bonan^{d,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

^bLaboratório de Parasitologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil

^cCentro Universitário Metodista IPA, RS, Brazil

^dFaculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil

* Corresponding author:

Carla Denise Bonan, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681 – Prédio 12, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3320 3500/ Ext. 4158

Fax: + 55 51 3320 3612

e-mail: cbonan@pucrs.br

Running Title: Ecto5'-nucleotidase in *T. gallinae*

Abstract

This study describes the enzymatic properties of an ecto-5'-nucleotidase in *Trichomonas gallinae*. The enzyme hydrolyzes nucleoside monophosphates at pH 7.2 and is activated by divalent cations, such as magnesium. Ecto-5'-nucleotidase activity was insensitive to levamisole, tetramisole (alkaline phosphatase inhibitors), and AMPCP (adenosine 5'-[α,β -methylene]diphosphate), an ecto-5'-nucleotidase inhibitor, whereas 0.1 mM ammonium molybdate (considered a potent inhibitor of 5'-nucleotidase activity) completely inhibited the enzyme activity. The apparent K_M (Michaelis constant) and V_{max} (maximum velocity) values for Mg^{2+} -AMP were $466 \pm 57 \mu M$ and $3.7 \pm 0.59 \text{ nmolPi/min}/10^6$ trichomonads, respectively. Considering that trichomonads lack the ability to synthesize purines and pyrimidines *de novo*, the presence of an ecto-5'-nucleotidase in intact trophozoites of *Trichomonas gallinae* could be important in regulating the extracellular nucleotide levels and generating adenosine, essential for the survival strategies of the parasite.

Keywords: adenosine, ecto-5'-nucleotidase, extracellular nucleotides, *Trichomonas gallinae*

1. Introduction

Purine nucleosides and nucleotides are mostly released from cells which are stressed or anoxic, injured and metabolically active (Chow et al. 1997). There is evidence that purines have cytotoxic properties (Steinberg and Di Virgilio 1991). Extracellular ATP may act as a signaling compound in cytolytic mechanisms (Fillipini et al, 1990) and it is hydrolyzed to adenosine by a group of ecto-enzymes named ecto-nucleotidases, which includes NTPDases (nucleoside triphosphate diphosphohydrolases) and ecto-5'-nucleotidase. NTPDase1 (CD39, apyrase, ATP diphosphohydrolase) dephosphorylates ATP to AMP, which is hydrolyzed by the ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), resulting in adenosine (Zimmerman, 1996; 2001).

Nucleoside monophosphate phosphohydrolases or 5'- nucleotidase, also known as CD73, is a glycosylated protein bound to the outer surface of the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor (Misumi et al, 1990). This enzyme acts on a variety of non-cyclic nucleoside monophosphates, such as AMP, CMP, UMP, IMP and GMP, inactivating them to the respective nucleosides and inorganic phosphate (Bianchi and Spychala, 2003). Although the 5'-nucleotidase has broad substrate specificity, AMP is considered to be the major physiological substrate with K_M values in the micromolar range (Zimmermann, 1992; Zimmerman, 1996). The enzyme is variably expressed in a wide number of cells types under physiological and pathological conditions (Zimmermann, 1992).

The presence of ecto-nucleotidases has been reported on the surface of various parasites. Vasconcelos et al (1993, 1996) demonstrated the presence of an ATP diphosphohydrolase in *Schistosoma mansoni*. A Mg-dependent ecto-ATPase activity was described in *Leishmania tropica* (Meyer-Fernandes et al, 1997) and *L.*

amazonensis (Bêrredo-Pinho et al, 2001). Furthermore, an ATP diphosphohydrolase and an ecto-5'-nucleotidase were described in *Trichomonas vaginalis* (Matos et al, 2001; Tasca et al, 2003). The ecto-5'-nucleotidase activity detected in intact trophozoites of two *T. vaginalis* isolates hydrolyzes nucleoside monophosphates and is activated by divalent cations, such as Mg^{2+} and Ca^{2+} . The presence of an enzyme that hydrolyses AMP to adenosine provides the nucleoside required for parasite growth, due to the lack of *de novo* purine nucleotide synthesis among all trichomonad species (Heyworth et al., 1982; 1984; Wang, 1990; Munagala and Wang, 2003).

Trichomonas gallinae is a flagellated protozoan which parasitizes a variety of birds all over the world. The domestic pigeon, *Columba livia*, is the primary host of this parasite. This trichomonad occurs in the upper digestive tract and in various organs of different avian groups (Stabler, 1954; De Carli et al, 1979). The normal sites of *T. gallinae* are the mouth, pharynx, esophagus and crop, where they cause the formation of caseous lesions. In pigeons, trichomonosis is mainly a disease of young birds, causing serious losses among these birds. The protozoan is the causative agent of canker in pigeons, causing a variety of pathologic manifestations depending on the parasite isolate and the infected bird species (Baker, 1986; Cooper and Petty, 1988). The virulent isolates may cause lesions in the upper digestive tract of birds, which allow the pathogen to enter the circulatory system, gain access to the liver, lungs, heart and pancreas, leading to host death. Indeed, avian trichomonosis has been considered a significant economic loss in chickens and turkeys.

Taking into account that *T. gallinae* is a serious veterinary disease pathogen, it is important to investigate the biochemical aspects of this parasite that contribute to understanding features related to host-parasite interaction. The present study

describes the properties of an ecto-5'-nucleotidase activity in intact trophozoites of *T. gallinae*.

2. Materials and methods

Parasite culture

The *T. gallinae* isolate, TG7, from the upper digestive tract of domestic pigeons, *C. livia*, was used in this study. Trichomonads were axenically cultured *in vitro* in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium (Diamond, 1957) without agar (pH 7.2) supplemented with 10% (v/v) inactivated bovine serum, without antibiotics (Stabler et al., 1964; Tasca and De Carli., 1999), at 37 °C. The isolates were kept alive in liquid nitrogen (-196 °C) with 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Honigberg et al., 1965). Trichomonads from the logarithmic phase of growth were collected by centrifugation at 750 x g for 5 min. The parasites were then washed 3 times with 0.9% (w/v) NaCl solution, counted with a haemocytometer and adjusted to a density of 4×10^6 organisms/mL. All samples were run in triplicate, with results achieved in at least three different parasites suspensions. All organisms were viable based on motility, assessed before and after incubations. The viability was not affected by incubation conditions.

Enzyme assays

After preparing the parasite samples, the optimum conditions for nucleotide hydrolysis were determined. Intact trophozoites of *T. gallinae* (10^6 trichomonads/mL) were added to the reaction mixture containing 50 mM Tris buffer (pH 7.2) and 3.0 mM MgCl₂. The samples were preincubated for 5 min at 37 °C in the reaction mixture.

The reaction was initiated by the addition of substrate AMP to a final concentration of 3.0 mM. After 15 min, the reaction was stopped by adding 200 μ L 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice before assaying for the release of inorganic phosphate (Chan et al., 1986). Incubation times and parasite density were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. Controls included intact organisms added to the reaction mixtures containing TCA in order to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates, and the averages of control values were subtracted from the test samples. All enzyme assays were run in triplicate. Specific activity is expressed as nmol of Pi/min/ 10^6 trichomonads.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted by Student's *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA), considering a level of significance of 5%.

3. Results

5'-nucleotidase activity has been described in bacteria, plant cells and in various vertebrate tissues (Zimmerman, 1992). In this study, an enzyme with characteristics of an ecto-5'-nucleotidase was detected in intact trophozoites of *T. gallinae*. The time course for AMP hydrolysis was linear up to 15 min in the presence of Mg^{2+} . The product formation was linear in the range of $0.8 - 2.0 \times 10^6$ trichomonads/mL (data not shown).

AMP hydrolysis was activated in the presence of divalent cations (Fig. 1) at the concentrations of 3.0, 5.0 and 8.0 mM. In the presence of Mg^{2+} plus 5.0 mM EDTA, there was a significant decrease of AMP hydrolysis. The concentration of 3.0

mM magnesium, which is a classical activator of 5'-nucleotidase, was chosen for subsequent enzyme assays.

Ecto-5'-nucleotidase is an enzyme with a broad substrate specificity for nucleoside monophosphates, with preference for AMP (Zimmerman, 1996). Intact trophozoites of *T. gallinae* hydrolyzed all nucleoside monophosphates tested (CMP, GMP, UMP) at a lower rate than AMP (Table 1). To avoid the influence of pyrophosphatase, pyrophosphate, which is a substrate for this enzyme, was incubated with the intact organisms. The presence of pyrophosphatase can be excluded because there is no significant hydrolysis of pyrophosphate in these assay conditions (Table 1).

AMP hydrolysis was determined at substrate concentrations in the range of 200-3000 μM . Enzyme activity increased with increasing concentrations of the nucleotide (Mg^{2+} fixed at 3.0 mM with different concentrations of AMP) (Fig.2). K_M (Michaelis constant) and V_{max} (maximum velocity) values in intact trophozoites of *T. gallinae* were estimated from the Lineweaver-Burk plots with three different enzyme preparations (Fig 2). The apparent K_M and V_{max} values for Mg^{2+} -AMP were 466 ± 57 μM (mean \pm S.D.) and 3.7 ± 0.59 nmolPi/min/ 10^6 trichomonads (mean \pm S.D.), respectively.

To discard the influence of alkaline phosphatase on AMP hydrolysis the classical inhibitors of this enzyme, levamisole and tetramisole, were tested. Both compounds, tested a final concentration of 1.0 mM, had no effect upon AMP hydrolysis in intact trichomonads (Table 2). AMPCP (adenosine 5'-[α,β -methylene]diphosphate) and ammonium molybdate, which are known 5'-nucleotidase inhibitors, were also tested. The enzyme activity was dramatically inhibited in the presence of 1.0 mM ammonium molybdate. However, AMPCP did not promote

significant changes on AMP hydrolysis. These results suggest that AMP hydrolysis is due to an ecto-5'-nucleotidase in intact trophozoites of *T. gallinae*.

4. Discussion

The proteins on the cell surface of trichomonads play a major role in cytoadhesion, host-parasite interaction, nutrient acquisition and in the protection from the cytolytic effects (Petrin et al, 1998). The results of the present study demonstrate an ecto-5'-nucleotidase in intact trophozoites of *T. gallinae*. This enzyme was not dependent of divalent cations, but the activity was increased by the addition of millimolar concentrations of Mg^{2+} (Zimmerman, 1992). The broad substrate specificity for nucleoside monophosphates of ecto-5'-nucleotidase was also observed, with a preference for AMP. K_M values vary between cell type and preparation, generally they are in the lower micromolar range (Zimmermann, 1996). The influence of contaminating enzymes on AMP hydrolysis was discarded, since 1.0 mM levamisole or tetramisole did not affect the AMP hydrolysis. The possibility of a pyrophosphatase was excluded, since no significant enzyme activity was observed when 1.0 mM pyrophosphate (Ppi) was used as substrate instead AMP.

Extracellular nucleotides can be hydrolyzed by a variety of enzymes that are located on the cell surface or may also be soluble in the interstitial medium (Zimmermann, 2001). Extracellular ATP can be hydrolyzed by NTPDase1, forming AMP, being the 5'-nucleotidase the final step of the enzymatic chain.

The ecto-5'-nucleotidase is present in various animals tissues, but not on all cell types. Seven human 5'-nucleotidases with different subcellular localization have been cloned (Bianchi and Spychala, 2003). This enzyme plays an important role in

the formation of adenosine from extracellular AMP and the subsequent activation of P1 adenosine receptors (Zimmermann, 2001). Adenosine induces vasodilation and inhibition of the immune and inflammatory response (Cronstein et al., 1992; Haskó & Cronstein, 2004). In addition, trichomonads lack the ability to synthesize purines and pyrimidines *de novo*. Then, the salvage pathways to generate nucleotides are essential for parasite survival (Heyworth et al, 1982, 1984). Munagala and Wang (2003) demonstrated incorporation of external adenine and guanine into the purine nucleotides of *T. vaginalis*. The purine salvage system in *T. vaginalis* consists of a single pathway of two enzymes: PNP (purine nucleoside phosphorylase) and PNK (purine nucleoside kinase). PNP catalyses inter-conversion between purine bases and purine nucleosides and PNK convert the nucleosides to nucleotides (Heyworth et al, 1982; Miller and Lindstead, 1983). The use of formycin A, specific inhibitor of bacterial PNP, inhibited *T. vaginalis in vitro* growth. Furthermore, lysed epithelial cells during trichomonal infection release a broad concentration of purine nucleotides (90% are adenine nucleotides) (Mandel, 1964). Adenosine is the primary precursor of the entire purine nucleotide pool in *T. vaginalis* and adenosine deaminase, IMP dehydrogenase, and GMP synthetase activities were identified in the parasite lysate, suggesting a pathway capable of converting adenine to GMP via adenosine (Munagala and Wang, 2003). Considering the close phylogeny between *T. vaginalis* and *T. gallinae*, it can be suggested that the hydrolysis of adenine nucleotides to nucleoside adenosine by a 5'-nucleotidase provides the primary precursor of the purine nucleotides in the parasites, cooperating to survival and success parasitism.

In addition, the enzymatic chain present in *T. gallinae* may contribute to escape mechanisms of the parasite by breaking down ATP and providing adenosine. The 5'-nucleotidase activity has been demonstrated in some protozoan. Tasca et al (2003)

described an ecto-5'-nucleotidase in two *T. vaginalis* isolates. These authors have shown that the enzyme hydrolyzes nucleoside monophosphates and it is activated by divalent cations, such Mg^{2+} and Ca^{2+} . The enzyme activities were insensitive to levamisole and tetramisole (inhibitors of alkaline phosphatases), whereas AMPCP inhibited the enzymatic activities in both isolates. Furthermore, Tasca et al (2003) have shown different K_M values for both isolates (111 μM and 420 μM for 30236 and 30238 isolates, respectively). In the present report, the ecto-5'-nucleotidase characterized in intact trophozoites of *T. gallinae* was not inhibited by AMPCP, but presented a similar K_M value when compared to 30238 isolate of *T. vaginalis*. In contrast, the enzyme was strongly inhibited by ammonium molybdate, a 5'-nucleotidase inhibitor (Gottlieb and Dwyer, 1983; Reilly and Calcutt, 2004; Barros et al, 2000). Gottlieb and Dwyer (1983) described a 5'-nucleotidase activity in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. The enzyme was inhibited by ammonium molybdate, as observed in the present findings of this paper. Corte-Real et al (1993) applied enzyme cytochemistry and immunological labeling techniques to characterize a 5'-nucleotidase in promastigote forms of four *Leishmania* species. Our results have shown an enzyme in intact trophozoites of *T.gallinae* that shares kinetic properties with an ecto-5'-nucleotidase.

The identification of the physiological significance of this enzyme could contribute to understanding biochemical aspects of *T. gallinae* and mechanisms involved in specific host-parasite interactions. Adenosine, a precursor of nucleotides in trichomonads, is a product of the 5'-nucleotidase activity. Thus, this enzyme could be considered a target for anti-trichomonad drugs in further studies.

Acknowledgements

Grateful thanks to Dra. Flávia Valadão Thiesen, Pharmacy School (PUCRS) Chairwoman for her support and to Patrícia de Brum Vieira for technical assistance. This work was partially supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

References

- Baker, J.R., 1986. Trichomoniasis, a major cause of vomiting in budgerigars. *Vet. Rec.* 118, 447-449.
- Barros, F.S., De Menezes, L.F., Pinheiro, A.A.S., Silva, E.F., Lopes, A.H.C.S., De Souza, W., Meyer-Fernandes, J.R., 2000. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. *Arch.Biochem.Biophys* 375, 304-314.
- Berrêdo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C.E., Chrispim, P.P.M., Belmont-Firpo, R., Lemos, A. P., Martiny, A., Vannier-Santos, M.A, Meyer-Fernandes, J.R, 2001. A Mg-Dependent Ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and Its Possible Role in Adenosine Acquisition and Virulence. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 391, 16-24.
- Bianchi, V., Spychala, J., 2003. Mammalian 5'-nucleotidases. *J. Biol. Chem.* 278, 46195-46198.
- Chan, K., Delfert, D., Junguer, K. D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.
- Chow, S.C., Kass, G.E., Orrenius, S. 1997 Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacol.* 36(9),1149-56.

- Cooper, J.E., Petty, S.J., 1988. Trichomoniasis in free-living goshawks (*Accipiter gentilis gentilis*) from Great Britain. *J.Wildlife Dis.* 24, 80-87.
- Corte-Real, S., de Nazareth, M., de Meirelles, L., 1993. Immunogold labeling and cerium cytochemistry of the enzyme ecto-5'-nucleotidase in promastigote forms of *Leishmania* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 88(3): 407-412.
- Cronstein, B.N., Levin, R.I., Philips, M., Hirschhorn, R., Abramson, S.B., Weissman, G, 1992. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J. Immunol* 148: 2201-2206.
- De Carli, G. A., Pansera, M. C. G., Guerrero, J., 1979. *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878) Stabler, 1938, from the upper digestive tract of the common pigeon, *Columba livia*, in the state of Rio Grande do Sul, Brasil - First register. *Acta Biol. Leopoldensia* 1, 85-95.
- Diamond, L.S., 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J.Parasitol.* 43, 488-490.
- Filippini, A., Taffs, R.E., Agui, T., Sitkovsky, M.V., 1990. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J. Biol. Chem.* 265, 334-340.
- Gottlieb, M., Dwyer, D.M., 1983. Evidence for distinct 5'-and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 7(4), 303-17.
- Hasko, G., Cronstein, B.N., 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25, 33-9.
- Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E., Ginger, C.D., 1982. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters* 141, 106-110.

- Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E., Ginger, C.D., 1984. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. FEBS Letters 176, 55-60.
- Honigberg, B. M., Faris, V. K., Livingston, M. C., 1965. Preservation of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* in liquid nitrogen. Prog. Protozool., Int. Conf. Protozool., 2nd Excerpta Mod. Found. Int. Congr. Ser. N° 91, p. 199.
- Matos, J.A.A., Borges, F.P., Tasca, T., Bogo, M.R., De Carli, G.A., Fauth, M.G., Dias, R. D., Bonan, C.D., 2001. Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. Int. J. Parasitol.31, 770-775.
- Mandel, P., 1964. Free nucleotides in animal tissues. Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 3, 299-334.
- Meyer-Fernandes, J.R., Dutra, P.M.L., Rodrigues, C.O., Saad-Nehme, J., Lopes, A.H.C.S., 1997. Mg-Dependent Ecto-ATPase Activity in *Leishmania tropica*. Arch. Biochem. Biophys. 341, 40-46.
- Miller, R.L., Lindstead, D., 1983. Purine and pyrimidine metabolizing activities in *Trichomonas vaginalis* extracts. Mol. Biochem. Parasitol. 7, 41-51.
- Misumi, Y., Ogata, S., Ohkubo, K., Hirose, S., Ikehara, Y., 1990. Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. Eur. J. Biochem. 191, 563-569.
- Munagala, N.R., Wang, C.C., 2003. Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. Mol. Biochem. Parasitol. 127, 143-149.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Galber, G., 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol. Rev. 11, 300-317.
- Reilly, T. J., Calcutt, M.J., 2004. The class C acid phosphatase of *Helicobacter pylori* is a 5' nucleotidase. Protein Expr Purif. 33(1):48-56.

- Stabler, R.M., 1954. *Trichomonas gallinae*: a review. *Exp. Parasitol.* 3, 368-402.
- Stabler, R.M., Honigberg, B.M., King, V. M., 1964. Effect of certain laboratory procedures on virulence of the Jone's Barn strain of *Trichomonas gallinae* for pigeons. *J. Parasitol.* 50, 36-41.
- Steinberg, T.H., Di Virgilio, F., 1991. Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. *Curr. Op. Immunol.* 3, 71-75.
- Tasca, T., De Carli, G.A., 1999. Hemolytic activity of fresh isolates and clones of *Trichomonas gallinae*. *Parasitol al Día.* 23, 69-73.
- Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M.O., Sarkis, J.J.F., 2003. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Exp.Parasitol.* 105, 167-173.
- Vasconcelos, E.G., Nascimento, P.S., Meirelles, M.N.L., Verjovski-Almeida, S., Ferreira, S.T., 1993. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 205-214.
- Vasconcelos, E.G., Ferreira, S.T., Carvalho, T.M.U., De Souza, W., Kettlun, A.M., Mancilla, M., Valenzuela, M.A., Verjovski-Almeida, S., 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 36, 22139-22145.
- Wang, C.C. 1990. Nucleic acid metabolism in *Trichomonas vaginalis*. In: Honigberg, B.M. (Ed.), *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York, pp. 84-90.
- Zimmermann, H., 1992. 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285, 345-365.

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

Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52, 44-56.

Legend to Figures

Fig. 1. Effect of $MgCl_2$ and $CaCl_2$ concentration on ecto-5'-nucleotidase activity in intact cells of *T. gallinae*. Closed bars and open bars represent 5'-nucleotidase activity in presence of $MgCl_2$ and $CaCl_2$, respectively. Incubation conditions were described in Materials and Methods. The control group was incubated without the addition of cation. Bars represent the means \pm SD for three experiments, using different cells suspensions. ** Significant difference from activity in the presence of $MgCl_2$ 3 mM ($p < 0.01$). * Significant difference from activity in the presence of $CaCl_2$ 3 mM ($p < 0.05$).

Fig. 2. : Effect of different concentrations of substrate (200-3000 μM) on AMP hydrolysis in intact cells of *T. gallinae*. All experiments used fixed 3 mM Mg^{2+} with variable concentrations of nucleotide. Data represent mean \pm S.D. of three different experiments, each in triplicate.

Fig.1

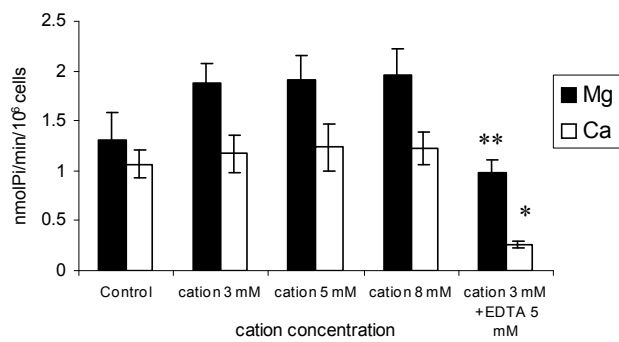


Fig. 2

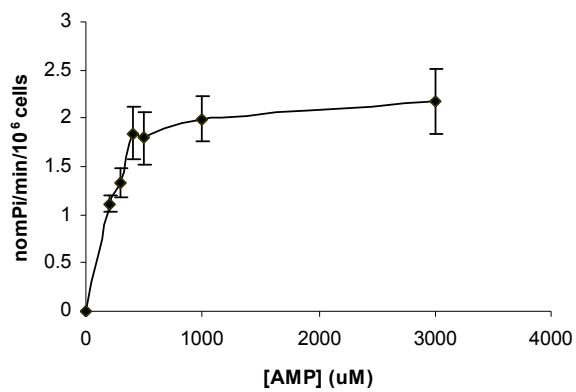


Table 1

Substrate specificity of ecto-5'-nucleotidase from intact cells of *T. gallinae*

Substrate	Relative Activity
AMP	1.00 ± 0.02
CMP	0.87 ± 0.14
GMP	0.68 ± 0.10
UMP	0.60 ± 0.05
PPi	0.058 ± 0.009

Data represents means ± S.D. of at least three experiments. Control AMP hydrolysis was 1.99 ± 0.04 nmolPi/min/ 10^6 cells. Results were expressed as percentage of control activity. The substrates were used at 3 mM, with MgCl₂ 3 mM.

Table 2: Effect of inhibitors on AMP hydrolysis from intact cells of *T. gallinae*

Inhibitor	Concentration (mM)	% Control enzyme activity
Levamisole	1	102.3 ± 7.6
Tetramisole	1	102 ± 4
AMPCP	0.1	106 ± 6
Molybdate	1	1.6 ± 0.05*

Results were expressed as percentage of control activity (100%). Control 5'-nucleotidase activity was 1.83 ± 0.14 nmolPi/min/ 10^6 cells. AMP was used at 3 mM, in the presence of MgCl₂ 3 mM. Data represent the means ± S.D. for at least three determinations. * Significant difference from control activity (100%) by Student's *t* test ($P < 0.05$)

PARTE III

III. 1. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo caracterizaram a presença de uma cadeia enzimática, composta por uma NTPDase (nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase) e uma ecto-5'-nucleotidase, em trofozoítos intactos de *Trichomonas gallinae*.

No capítulo 1, a presença de uma enzima que hidrolisa nucleotídeos di e trifosfatados foi caracterizada. A enzima apresentou uma ativação na presença de cátions divalentes, sendo o íon Ca^{2+} o melhor ativador da enzima. A presença de quelantes de cátions, tais como o EGTA, reduziu significativamente a atividade específica quando comparada com o grupo controle, o qual foi incubado na presença de 1,0 mM de CaCl_2 . Para descartar a presença de outras enzimas contaminantes, como ATPases do tipo P, V ou F, fosfatases alcalinas e fosfodiesterases, foram utilizados no meio de incubação diversos inibidores para essas enzimas. Na presença de ortovanadato de sódio, ambas hidrólises do ATP e do ADP sofreram uma diminuição significativa quando comparadas com o controle (ausência de inibidor). Na presença de azida sódica em altas concentrações (20 mM), a hidrólise do ATP também foi inibida, não havendo alteração na hidrólise de ADP. Levamisole, oligomicina e ouabaína não foram capazes de inibir a atividade enzimática, podendo-se descartar a interferência de fosfatases alcalinas, ATPase mitocondrial e Na^+ , K^+ -ATPase. Para verificar se as hidrólises de ATP e ADP foram devidas a uma única enzima, foi realizado o protocolo da mistura de substratos, de acordo com Sarkis and Saltó, (1991). A hidrólise dos substratos, quando misturados, resultou na média da atividade obtida com cada nucleotídeo incubado individualmente. Este resultado indica que uma única enzima, apresentando um

único sítio ativo, está envolvida na hidrólise de ambos os substratos. Outras propriedades bioquímicas foram determinadas neste estudo, como os valores do K_M e velocidade máxima e a preferência por pH alcalino. Os valores de K_M encontraram-se na faixa micromolar. Assim, todas as propriedades bioquímicas descritas neste estudo caracterizam uma enzima pertencente à família das NTPDases.

A presença destas enzimas que hidrolisam ATP, ADP e outros nucleotídeos di e trifosfatados tem sido descrita em uma variedade de parasitos. Uma ecto-ATP difosfohidrolase na superfície de *Shistosoma mansoni* foi caracterizada e purificada por Vasconcelos e colaboradores (1993, 1996). Os autores sugerem que essa enzima pode estar envolvida em mecanismos de escape do parasito, hidrolisando os nucleotídeos liberados pelas células do hospedeiro. Barros e colaboradores (2000) descreveram uma ectonucleotídeo difosfohidrolase em trofozoítos vivos de *Entamoeba histolytica*, ativada por cátions divalentes e insensível a inibidores de outras ATPases. Os autores associam a virulência e a capacidade de evasão do parasito à atividade de hidrólise de nucleotídeos. A caracterização de uma ATP difosfohidrolase foi descrita por Matos e colaboradores (2001) em *Trichomonas vaginalis*. A enzima hidrolisa nucleotídeos da purina e pirimidina di e trifosfatados, é insensível a inibidores clássicos de ATPase e apresenta inibição da atividade enzimática na presença de azida sódica em altas concentrações (20 mM), a qual é conhecida como inibidor de ATP difosfohidrolase (Plesner, 1995; Sarkis et al., 1995). Nossos resultados também demonstraram que a enzima presente em *T. gallinae* sofreu inibição quando incubada na presença de altas concentrações deste inibidor. A inibição da atividade enzimática pela adição de ortovanadato de sódio no meio de incubação está de acordo com achados da literatura que classificam este composto

como inibidor de apirases (Traverso-Cori et al, 1970; Valenzuela et al, 1989; Pilla et al, 1996; Oses et al, 2004).

Jesus e colaboradores (2002) caracterizaram uma ecto-ATPase em *Tritrichomonas foetus* ativada por cátions divalentes. No presente estudo, trofozoítos intactos de *T. gallinae* foram capazes de hidrolisar todos os nucleotídeos di e trifosfatados testados, apresentando uma preferência pelo ADP (razão de hidrólise ATP:ADP igual a 1:3). Na caracterização de uma ATP difosfohidrolase em *T. vaginalis* também foi demonstrada uma preferência da enzima pelo ADP (Matos et al., 2003). Para descartar a possibilidade de uma enzima solúvel estar sendo secretada pelo parasito, os organismos foram centrifugados e o sobrenadante foi incubado no meio de reação. A insignificante taxa de hidrólise de nucleotídeos detectada nestas condições fortemente indica a ecto-localização da enzima.

A presença de enzimas localizadas na superfície das células desempenha importantes funções, tanto a nível fisiológico como imunológico, modulando a concentração dos nucleotídeos extracelulares. Diferentes funções têm sido atribuídas a essas enzimas, como adesão celular, modulação da apoptose, regulação dos receptores P2 e sinalização celular (Ralevic e Burnstock, 1998; Burnstock, 2004). Estudos demonstraram que a hidrólise do ATP está associada a mecanismos de virulência e evasão dos parasitos (Barros et al, 2000; Berrêdo-Pinho et al, 2001), através da proteção dos efeitos citolíticos deste nucleotídeo.

Além das inúmeras funções atribuídas às proteínas presentes na superfície de parasitos, pode-se destacar a participação de enzimas da família das NTPDases na formação de AMP. Este composto, por sua vez, é substrato para a enzima 5'-nucleotidase, sofrendo hidrólise e resultando na produção de adenosina.

Estudos demonstraram que inúmeros parasitos (*Giardia lamblia*, *E. histolytica*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp. e *Trichomonas* spp.) são incapazes de realizar a síntese *de novo* de purinas e pirimidinas, sendo seu crescimento dependente das vias de salvação para gerar nucleotídeos (Heyworth et al, 1982; 1984, Wang, 1990; Munagala and Wang, 2003). Munagala e Wang (2003) demonstraram a incorporação de adenina e guanina externas em nucleotídeos da purina em *T. vaginalis*. O uso de formicina A, um inibidor da enzima que catalisa a interconversão entre bases e nucleosídeos da purina, inibiu o crescimento *in vitro* do parasito. Assim, a hidrólise de AMP por uma 5'-nucleotidase resulta na formação do nucleosídeo adenosina, o qual é o precursor primário de todos os nucleotídeos da purina desse parasito (Munagala and Wang, 2003).

Levando em consideração estes dados, o segundo objetivo do nosso estudo foi caracterizar a presença de uma ecto-5'-nucleotidase em trofozoítos intactos de *T. gallinae* (Capítulo 2). A atividade de uma ecto-5'-nucleotidase foi caracterizada em trofozoítos intactos deste parasito. A enzima foi ativada por altas concentrações de cátions divalentes, principalmente Mg^{2+} , sendo este considerado clássico ativador dessa enzima (Zimmermann, 1992). Uma ampla especificidade por vários nucleotídeos monofosfatados também foi observada, ocorrendo hidrólise de todos os nucleotídeos testados, com uma preferência pelo AMP. A influência de enzimas contaminantes que poderiam estar degradando estes nucleotídeos foi excluída com o uso de inibidores. A atividade de uma fosfatase alcalina foi descartada, uma vez que a presença de levamisole e tetramisole no meio de incubação não foi capaz de inibir a atividade enzimática. A incubação de pirofosfato como substrato descartou a presença de uma pirofosfatase, uma vez que não houve significativa produção de fosfato inorgânico com a adição deste substrato. Inibidores específicos de 5'-

nucleotidades, tais como AMPCP e molibdato de amônio, foram testados. O AMPCP, considerado um inibidor específico de 5'-nucleotidase de mamíferos, não foi capaz de inibir a enzima em *T. gallinae*. No entanto, a presença de 1,0 mM de molibdato de amônio, considerado um potente inibidor desta enzima, causou uma drástica redução na atividade enzimática. Gottlieb e Dywer (1983) também descreveram a atividade de uma 5'-nucleotidase em *Leishmania donovani* inibida por molibdato.

A presença da ecto-5'-nucleotidase tem sido relatada em vários tecidos animais, porém, não em todos os tipos celulares. Bianchi and Sychala (2003) localizaram sete diferentes 5'-nucleotidases em humanos. Essa enzima é importante para a geração de adenosina a partir do ATP extracelular, hidrolisando o AMP formado. Após liberada, a adenosina ativa receptores específicos denominados receptores P1, desencadeando suas ações fisiológicas. (Zimmermann, 2001). A adenosina é um importante agente vasodilatador e inibidor da resposta imune e inflamatória, podendo desempenhar um importante papel nos processos de parasitismo.

A cadeia enzimática presente na superfície de *T. gallinae* pode contribuir para mecanismos de escape do parasito das defesas do hospedeiro. Tasca et al (2003) caracterizaram a presença de uma ecto-5'-nucleotidase em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*. A enzima foi ativada por Mg^{2+} e inibida por AMPCP, inibidor de 5'-nucleotidase em mamíferos. O K_M apresentou-se na faixa micromolar e a atividade máxima de hidrólise em pH alcalino, características semelhantes às encontradas no nosso estudo.

A presença de uma NTPDase e de uma ecto-5'-nucleotidase na superfície do *T. gallinae* pode contribuir para os mecanismos de escape do parasito da resposta

imune do hospedeiro, através da degradação do ATP. A NTPDase degrada o ATP, liberado pelas células lisadas, até AMP, o qual é seqüencialmente degradado pela ecto-5'-nucleotidase, fornecendo adenosina necessária para a sobrevivência e crescimento do parasito. Além disso, a cadeia enzimática presente em *T. gallinae* pode ser considerada como alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da tricomonose em aves.

III. 2. Conclusões gerais

As conclusões gerais deste estudo foram as seguintes:

1. Uma NTPDase foi caracterizada na superfície de trofozoítos intactos de *T. gallinae*. A enzima foi ativada por cálcio e apresentou uma preferência por pH alcalino. O uso de inibidores de possíveis enzimas contaminantes não interferiu na hidrólise dos nucleotídeos. Contudo, o ortovanadato de sódio e azida sódica em elevadas concentrações foram capazes de inibir a enzima. A enzima caracterizada neste estudo hidrolisou uma variedade de nucleotídeos di e trifosfatados usados como substratos. O K_M determinado apresentou-se na faixa micromolar.

2. A atividade de uma ecto-5'-nucleotidase foi caracterizada na superfície de trofozoítos intactos de *T. gallinae*. A enzima foi ativada por magnésio e apresentou ampla especificidade por nucleotídeos monofosfatados, sendo o AMP o substrato preferencial. A atividade da enzima não foi inibida quando utilizados inibidores de fosfatases alcalinas. A adição de molibdato de amônio, um inibidor de 5'-nucleotidase, no meio de reação reduziu drasticamente a atividade enzimática.

A presença de atividades enzimáticas na superfície do parasito pode representar um mecanismo de sobrevivência, modulando a concentração dos nucleotídeos no meio extracelular e protegendo contra os efeitos citolíticos do ATP. Além disso, essas enzimas contribuem para a produção do nucleosídeo adenosina, o qual é essencial para a via de salvação das purinas.

III. 3. Perspectivas

Considerando que o uso de antibióticos no meio de cultura do *T. gallinae* resulta na eliminação da patogenicidade do parasito (Stabler et al., 1964) e os mecanismos relacionados a esse efeito são pouco conhecidos e estudados, propomos os seguintes estudos futuros:

1. Avaliar a hidrólise dos nucleotídeos extracelulares em trofozoítos de *T. gallinae* após cultivo *in vitro* na presença de penicilina e estreptomicina;
2. Analisar as atividades ectonucleotidásicas e a morfologia do parasito após cultivos realizados em diferentes tempos na presença de antibiótico;
3. Testar diferentes concentrações de antibióticos e avaliar o efeito sobre as atividades ectonucleotidásicas e na morfologia celular;
4. Verificar o efeito de diferentes concentrações de antibióticos na viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

- Asai T, O'Sullivan WJ, Tatibana M.** A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. The Journal of Biological Chemistry. 258: 6816-6822, 1983.
- Asai T, Suzuki Y.** Remarkable activities of nucleoside triphosphate hydrolase in the tachyzoites of both virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. FEMS Microbiology Letters. 72: 89-92, 1990.
- Barros FS, De Menezes LF, Pinheiro AAS, Silva EF, Lopes AHCS, De Souza W, Meyer-Fernandes JR.** Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. Arch.Biochem.Biophys. 375: 304-314, 2000.
- Berrêdo-Pinho M, Peres-Sampaio CE, Chrispim PPM, Belmont-Firpo R, Lemos A P, Martiny, A, Vannier-Santos, MA, Meyer-Fernandes JR.** A Mg-Dependent Ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and Its Possible Role in Adenosine Acquisition and Virulence. Archives of Biochemistry and Biophysics. 391: 16-24, 2001.
- Betterton H, Almond C, Dowda H.** *Trichomonas gallinae*. Characterization and regulatory properties of lactic dehydrogenase. Experimental Parasitology. 40: 25-32, 1976.
- Bianchi V, Spychala J.** Mammalian 5'-nucleotidases. J. Biol. Chem. 278: 46195-46198, 2003.
- Biederbick A, Kosan C, Kunz J, Elsasser HP.** First apyrase splice variants have different enzymatic properties. The Journal of Biological Chemistry. 275: 19018-19024, 2000.

- Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sevigny J.** Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*. 43: 5511-5519, 2004.
- Bisaggio DF, Peres-Sampaio CE, Meyer-Fernandes JR, Padrón TS.** Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. *Parasitol Res*. 91:273-82, 2003.
- BonDurant RH, Honigberg BM.** Trichomonads of veterinary importance, In: Kreier J. (Ed.), *Parasitic Protozoa.*, Academic Press, New York, pp. 111-206, 1994.
- Burnstock G.** Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem*. 4(8):793-803, 2004.
- Butcher GD 2003.** Pigeon Canker. University of Florida. IFAS Extension. (<http://edis.ifas.ufl.edu>).
- Coimbra ES, Goncalves-da-Costa SC, Corte-Real S, De Freitas FGR, Duraõ AC, Souza CSF, Silva-Santos MI, Vasconcelos EG.** Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology*. 124: 137-143, 2002.
- Cooper JE, Petty SJ.** Trichomoniasis in free-living goshawks (*Accipiter gentilis gentilis*) from Great Britain. *Journal of Wildlife Diseases*. 24: 80-87, 1988.
- Daly JJ.** The maltose metabolism of *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878). I. Growth studies. *Journal Parasitology*. 56:833-888, 1970.
- Daly JJ, Mauhews HM, Koch WC., Bost JW.** The effect of different carbohydrates on the glycogen content and growth of *Trichomonas gallinae*. *Comp Biochem Physiol B*. 48(4):651-9, 1974.
- De Carli GA, Pansera MCG, Guerrero J.** *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878) Stabler, 1938, no trato digestivo superior de pombos domésticos, *Columba livia*, no Rio Grande do Sul – Primeiro Registro. *Acta Biol Leopoldensia*. 1:85-95, 1979.

- Diamond LS.** The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J.Parasitol.* 43: 488-490, 1957.
- Dombrowski K, Ke Y, Brewer KA., Kapp JA.** Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev.* 161:111-8, 1998.
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D.** ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 359: 144-147, 1992.
- Evans RJ, Derkach V, Suprenant A.** ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature.* 357: 503-505, 1992.
- Faudry E, Lozzi SP, Santana JM., D'Souza,-Ault, M, Kieffer S, Felix CR., Ricart CA., Sousa MV, Vernet T, Teixeira AR.** *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *The Journal of Biological Chemistry.* 279: 19607-19613, 2004.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Collo G, Buell G, Di Virgilio F.** ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacology.* 36: 1295-1301, 1997.
- Fietto JL, De Marco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TM, de Souza W, Bahia MT, Alves MJ, Verjovski-Almeida S.** Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 316: 454-60, 2004.
- Filippini A, Taffs RE, Agui T, Sitkovsky MV.** Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J. Biol. Chem.* 265: 334-340, 1990.
- Fredholm BB.** Purines and neutrophil leukocytes. *Gen Pharmacol.* 28(3):345-50, 1997.

- Gordon JL.** Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochemical Journal*. 233(2):309-19, 1986.
- Gottlieb M, Dwyer DM.** Evidence for distinct 5'- and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. (4):303-17, 1983.
- Grondal, EJM, Zimmermann, H** Purification, characterization and cellular localization of 5'-nucleotidase from Torpedo electric organ. *Biochem J*. 245(3):805-10, 1987.
- Handa M, Guidotti G.** Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 218: 916-923, 1996.
- Heyworth PG, Gutteridge WE, Ginger CD.** Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*. 141: 106-110, 1982.
- Heyworth PG, Gutteridge WE, Ginger CD.** Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*. 176: 55-60, 1984.
- Honigberg BM.** Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* to mice. I. Gross pathology, quantitative evaluation of virulence and same factors affecting pathogenicity. *J Parasitol*. 47: 545-571, 1961.
- Honigberg BM, Pierce D.** Utilization of carbohydrates by two strains of *Trichomonas gallinae*. *Journal of Protozoology*. 10 (Suppl):19. 1963.
- Inghelbrecht S, Vermeersch H, Ronsmans S, Remon JP, Debacker P, Vercruysse J.** Pharmacokinetics and anti-trichomonal efficacy of a dimetridazole tablet and water-soluble powder in homing pigeons (*Columba livia*). *J Vet Pharmacol Ther*. 19(1):62-7, 1996.

- Jesus JB, Lopes AHCS, Meyer-Fernandes JR.** Characterization of an ecto-ATPase of *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Parasitology*. 103: 29-42, 2002.
- Kirley TL.** Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase – homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 1076-1081, 1997.
- Kolosova IA, Mirzapoiiazova T, Adyshev D, Usatyuk P, Romer LH, Jacobson JR, Natarajan V, Pearse DB., Garcia JG, Verin AD.** Signaling pathways involved in adenosine triphosphate-induced endothelial cell barrier enhancement. *Circ Res*. 97(2):115-24, 2005.
- Krone O, Altenkamp R, Kenntner N.** Prevalence of *Trichomonas gallinae* in northern goshawks from the Berlin area of northeastern Germany. *J Wildl Dis*. (2):304-9, 2005.
- Kukulski F, Komoszynski M.** Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *European Journal of Biochemistry*. 270: 3447-3454, 2003.
- Lemmens R, Kupers L, Sévigny J, Beaudoin AR, Grondin G, Kittel A, Waelkens E, Vanduffel L.** Purification, characterization, and localization of an ATP diphosphohydrolase in porcine kidney. *American Journal of Physiology – Renal Physiology*. 278: F978-988, 2000.
- Levine ND** The trichomonads. In: Levine ND, ed. *Protozoan Parasites of Domestic Animals and of man*. 2nd edition. Minnesota, USA: Burgess Publishing Company, 88-110, 1973.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Olson KE, Islan N, Pinsky DJ, Levi R.** Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost*. 31(2):234-46, 2005.

- Matos JAA, Borges FP, Tasca T, Bogo MR, De Carli GA, Fauth MG, Dias RD, Bonan CD.** Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* 31: 770-775, 2001
- McKeon T, Dunsmore J, Raidal SR.** *Trichomonas gallinae* in budgerigars and columbid birds in Perth, Western Australia. *Australian Veterinary Journal*, 75: 652-655, 1997.
- Meyer-Fernandes JR, Dutra PML, Rodrigues CO, Saad-Nehme J, Lopes AHCS.** Mg-Dependent Ecto-ATPase Activity in *Leishmania tropica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 341: 40-46, 1997.
- Munagala NR, Wang CC.** Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 127: 143-149, 2003.
- Nadler AS, Honigberg BM.** Genetic differentiation and biochemical polymorphism among trichomonads. *The Journal of Parasitology.* 74: 797-804, 1988.
- Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kisrt IB, Rucker B, Furstenau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ.** Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci.* 74(26):3275-84, 2004.
- Pepler D, Oetle EE.** *Trichomonas gallinae* in wild raptors on the Cape Peninsula. *S Afr J Wildl Res.* 22:87-88, 1997.
- Pilla C, Emanuelli T Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJF.** ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E C 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets.* 7: 225-230, 1996.
- Plesner L.** Ecto-ATPases: Identities and functions. *International Reviews on Cytology.* 158: 141-214, 1995.

- Ralevic V, Burnstock G.** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacology Reviews*. 50: 413-492, 1998.
- Read CP.** Comparative studies on the physiology of trichomonad protozoa. *Journal of Parasitology*. 43: 385-394, 1957.
- Rosenfield RN, Bielefeldt J, Rosenfield LJ, Taft SJ, Murphy RK, Stewart AC.** Prevalence of *Trichomonas gallinae* in nestling Cooper's Hawks among three North American populations. *Wilson Bulletin*. 114: 145-147, 2002.
- Samour JH, Bailey TA, Cooper JE.** Trichomoniasis in birds of prey (order Falconiformes) in Bahrain. *Vet Rec*. 136(14):358-62, 1995.
- Sarkis JJF, Saltó C.** Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Research Bulletin*. 26: 871-76, 1991.
- Sarkis JJF, Battastini AMO, Oliveira EM, Frassetto SS, Dias RD.** ATP diphosphohydrolases: An overview. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 47: 131-136, 1995.
- Sévigny J, Picher M, Grondin G, Beaudoin AR.** Purification and immunohistochemical localization of the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. *American Journal of Physiology*. 272: L939-950, 1997.
- Shi JD, Kukar T, Wang C-Y, Li Q.-Z., Cruz PE., Davoodi-Semiromi A, Yang P, Yunrong G, Lian W, Wu DH., She JX.** Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 17474-17478, 2001.
- Smith TM, Kirley TL, Hennessey TM.** A soluble ecto-ATPase from *Tetrahyema thermophila*: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 337: 351-359, 1997.

- Smith TM, Kirley TL.** Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochimica and Biophysics Acta.* 1386: 65-78, 1998.
- Stabler RM.** *Trichomonas gallinae*: a review. *Experimental Parasitology.* 3: 368-402, 1954.
- Stabler RM, Honigberg BM, King VM.** Effect of certain laboratory procedures on virulence of the Jone's Barn strain of *Trichomonas gallinae* for pigeons. *J. Parasitol.* 50: 36-41, 1964.
- Tasca T, De Carli GA.** Prevalence of *Trichomonas gallinae* from the upper digestive tract of the common pigeon, *Columba livia* in the Southern Brazilian State, Rio Grande do Sul. *Parasitologia Al Dia.* 23: 42-43, 1999.
- Tasca T, De Carli GA.** Scanning electron microscopy study of *Trichomonas gallinae*. *Veterinary Parasitology.* 118:37-42, 2003.
- Tasca T, Bonan CD, De Carli GA, Battastini AMO, Sarkis JJF.** Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Exp.Parasitol.* 105: 167-173, 2003.
- Tasca T, De Carli GA.** *Trichomonas gallinae*. In: *Animal Health and Production Compendium* . Wallingford: CAB International, 2006 (no prelo).
- Traverso-Cori A, Traverso S, Heyses H.** Different molecular forms of potato apyrase. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 137: 133-142, 1970.
- Turner AC, Lushbaugh WB.** Three aspecific ATPases in *Trichomonas vaginalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. B* 100: 691-696, 1991.
- Valenzuela MA, López J, Depix M, Mancilla M, Ketlun AM., Catalan L, Chiong M, Garrido J, Traverso-Cori A.** Comparative subcellular distribution of apyrase from

animal and plants sources. Characterization of microsomal apyrase. Comparative. Biochemistry and Physiology. 93B: 911-9, 1989.

Vara F, Serrano R. Purification and characterization of a membrane-bound ATP diphosphohydrolase from *Cicer arietinum* (chick-pea) roots. Biochemistry Journal. 197: 637-643, 1981.

Vasconcelos EG, Nascimento PS, Meirelles MNL, Verjovski-Almeida S, Ferreira ST. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of tegument of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 58: 205-214, 1993.

Vasconcelos EG, Ferreira ST, Carvalho TMU, De Souza W, Kettlun AM, Mancilla M, Valenzuela MA, Verjovski-Almeida S. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. J. Biol. Chem. 36: 22139-22145, 1996.

Ventura S, Dewalagama RK, Lau LC. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is an excitatory cotransmitter with noradrenaline to the smooth muscle of the rat prostate gland. Br J Pharmacol. 138(7):1277-84, 2003.

Wang CC. Nucleic acid metabolism in *Trichomonas vaginalis*. In: Honigberg, B.M. (Ed.), Trichomonads parasitic in humans. Springer-Verlag, New York, pp. 84-90, 1990.

Wang TF, Guidotti G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. The Journal of Biological Chemistry. 271: 9898-9901, 1996.

Wang TF, Guidotti G. Golgi localization and functional expression of human udirine diphosphatase. The Journal of Biological Chemistry. 273: 11392-11399, 1998.

www.albertaclassic.net/trichomonas/trichomonas.php. Acesso em: janeiro/2006

- Yeung G, Mulero JJ, McGowan DW, Bajwa SS, Ford JE.** CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. *Biochemistry*. 39(42):12916-23, 2000.
- Zimmermann H.** 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285: 345-365, 1992.
- Zimmermann H.** Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Progress in Neurobiology*. 49: 589-618, 1996.
- Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P.** New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int.* 32(5-6):421-5, 1998.
- Zimmermann H, Braun N.** Ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties and functional roles in the nervous system. *Progress in Brain Research*. 120: 371-385, 1999.
- Zimmermann H.** Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Development Research*. 52: 44-56, 2001.

ANEXOS**Lista de Figuras**

Figura 1. Aspectos morfológicos do <i>T. gallinae</i>	7
Figura 2. Morfologia dos trofozoítos de <i>T. gallinae</i> observada por microscopia eletrônica de varredura.....	8
Figura 3. Características da infecção provocada por <i>T. gallinae</i>	11
Figura 4. Topografia de membrana das ectonucleotidases.....	15