

Adenosin deaminasa en la tripanosomiasis experimental: futuras implicaciones.

Mary Carmen Pérez-Aguilar y Rocío Rondón-Mercado.

Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP). Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.

Palabras clave: ADA; adenosina; nucleótidos de adenina; tripanosomiasis.

Resumen. La adenosin deaminasa representa un punto de control en la regulación de los niveles extracelulares de adenosina, desempeñando así un papel fundamental en la modulación de las respuestas purinérgicas a ciertos eventos patofisiológicos. Diversos estudios señalan que los niveles séricos y plasmáticos de la enzima se elevan en algunas enfermedades causadas por microorganismos, lo cual podría representar un mecanismo compensatorio como consecuencia de la elevación de las concentraciones de adenosina y la liberación de mediadores inflamatorios. Recientes investigaciones indican que la actividad de la adenosin deaminasa disminuye e influye en los parámetros hematológicos de animales infectados con *Trypanosoma evansi*, de manera que tales alteraciones podrían tener implicaciones en la patogénesis de la enfermedad. Adicionalmente, la enzima ha sido detectada en este parásito; lo que permite inferir que podría estar asociada a las funciones vitales del mismo, de manera similar a lo que ocurre en los mamíferos. Este conocimiento puede ser útil al asociar la quimioterapia con inhibidores específicos de la enzima en futuros estudios.

Adenosine deaminase in experimental trypanosomiasis: future implications.

Invest Clin 2015; 56(3): 308 - 319

Keywords: ADA; adenosine; adenine nucleotides; tripanosomiasis.

Abstract. The adenosine deaminase represents a control point in the regulation of extracellular adenosine levels, thus playing a critical role in the modulation of purinergic responses to certain pathophysiological events. Several studies have shown that serum and plasma enzyme levels are elevated in some diseases caused by microorganisms, which may represent a compensatory mechanism due to the elevated levels of adenosine and the release of inflammatory mediators. Recent research indicates that adenosine deaminase activity decreases and affects hematological parameters of infected animals with *Trypanosoma evansi*, so that such alterations could have implications in the pathogenesis of the disease. In addition, the enzyme has been detected in this parasite; allowing the inference that it could be associated with the vital functions of the same, similar to what occurs in mammals. This knowledge may be useful in the association of chemotherapy with specific inhibitors of the enzyme in future studies.

Recibido: 02-06-2014 Aceptado: 27-11-2014

INTRODUCCIÓN

La Adenosin Deaminasa (ADA), es una enzima polimórfica del catabolismo de las purinas que cataliza la desaminación de adenosina y 2'-deoxyadenosina para producir inosina y 2'-deoxyinosina respectivamente, con liberación de amonio en el proceso (1). Esta enzima está ampliamente distribuida en el organismo, con actividad ADA en prácticamente todos los tejidos; sin embargo, su mayor actividad se encuentra en las células linfoides (más elevada en las células T que en las células B) (2).

La enzima se localiza tanto en citoplasma donde mantiene su actividad hidrolasa, como en la superficie de diversas células; por lo que es considerada una ecto-enzima y mantiene su función incluso después de unirse a la glicoproteína CD26, la cual involucra la desaminación de la adenosina extracelular cuando se encuentra en elevados niveles que son tóxicos para los linfocitos (3). Por lo tanto, el control de las concentraciones extracelulares de adenosina, ejercido por la interacción ADA-CD26, puede ser

cuantitativamente importante en caso de descenso de la regulación, inactivación de los transportadores de nucleósidos o bajo estrés metabólico, además de proveer un importante mecanismo de balance en condiciones de un elevado recambio en el metabolismo del nucleótido adenina (4).

La ADA es considerada un marcador de inmunidad celular; puesto que su actividad plasmática y sérica se eleva en enfermedades que alteran la respuesta inmune mediada por células. El aumento de la actividad sérica de la ADA ha sido observado en los trastornos hipertensivos del embarazo, en el infarto agudo del miocardio y en diversas enfermedades infecciosas causadas principalmente por microorganismos con tropismo por los macrófagos (5-8). Adicionalmente, diversos estudios señalan que la actividad de la ADA en el plasma de pacientes con hipoxia crónica, es superior a la que se observa en los individuos sanos (1), lo que indica que la inducción de la actividad ADA es una adaptación metabólica natural a los elevados niveles de adenosina durante la hipoxia.

La ADA es un barril α/β de ocho hebras con el sitio activo en un bolsillo en el extremo C-terminal

del barril β , como en todas las enzimas con estructura de barril α/β conocidas. Un ion zinc esencial desde el punto de vista de la catálisis está unido en la parte más profunda del bolsillo del sitio activo (9).

Las mutaciones que afectan el sitio activo de la ADA destruyen selectivamente los linfocitos, lo que causa el Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa (10). Las consideraciones bioquímicas aportan una explicación plausible de la etiología de la enfermedad. En ausencia de ADA activa, la desoxiadenosina se fosforila para generar niveles de dATP que resultan cincuenta veces más altos de lo normal. Esta concentración elevada de dATP inhibe la ribonucleótido reductasa y evita así la síntesis de los otros dNTP, lo que suprime la síntesis de ADN y por lo tanto la proliferación celular.

La actividad de la ADA puede cuantificarse por el método descrito por Galanti y Giusti (11), el cual se basa en una modificación de la reacción de Berthelot, en la que el amoníaco liberado reacciona con hipoclorito de sodio y fenol en medio alcalino para formar el indofenol, que es un compuesto de color azul, cuya densidad óptica se lee a una densidad óptica de 628 nm. Como catalizador de la reacción se utiliza el nitroprusiato de sodio y la reacción que cataliza la ADA se detiene tras un período de incubación por la adición de fenol-nitroprusiato. Otro método ampliamente utilizado es el propuesto por Blake y Berman. (12), basado en la reacción del amoníaco con el α -cetoglutarato y la NADPH para generar glutamato y NADP. Esta reacción es catalizada por la glutamato deshidrogenasa, midiendo la variación de absorción a 340 nm de longitud de onda, debida a la desaparición de NADPH.

Catabolismo de las purinas.

El metabolismo de todas las moléculas presentes en la célula consiste de un continuo proceso de síntesis y degradación. En el hombre y otros animales, los nucleótidos de purina se degradan a ácido úrico y se excretan. Para ello, el AMP se desamina de forma hidrolítica a IMP por la acción de la adenilato aminohidrolasa (AMP desaminasa) y la 5-nucleotidasa convierte el IMP en inosina, con la eliminación del grupo fosfato (13). En

muchos organismos aparece un segundo tipo de aminohidrolasa que actúa como catalizador en una ruta alternativa que conduce desde el AMP hasta la inosina. En ellos el AMP se transforma en adenosina por una hidrólisis catalizada por la 5-nucleotidasa. Entonces, la adenosina aminohidrolasa (Adenosin deaminasa) cataliza la hidrólisis de la adenosina para generar inosina con liberación de amoníaco (14).

Las dos rutas que parten del AMP convergen en la formación de inosina, esta sufre la eliminación de un grupo fosforilo por la purina nucleósido fosforilasa, para generar la base púrica hipoxantina y liberar ribosa 1 fosfato (13). A continuación la hipoxantina se oxida formando xantina en una reacción catalizada por la xantina oxidasa (Fig 1). En este punto es donde convergen las rutas que parten de AMP, GMP y XMP.

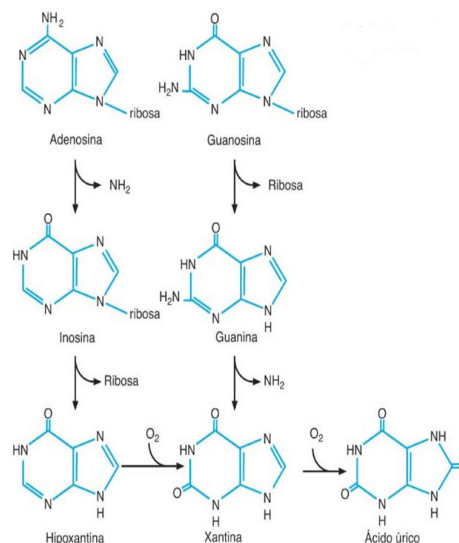


Fig 1. Degradación de las purinas

Las rutas que convierten el GMP y el XMP en ácido úrico comienzan con una reacción paralela catalizada por la 5-nucleotidasa, que genera guanosina y xantosina respectivamente. En ambas reacciones se libera fosfato inorgánico. La guanosina se transforma en xantina en dos etapas, la primera de las cuales que produce guanina es similar a la reacción que conduce de la xantosina a la xantina en la ruta de XMP. La

guanina formada se desamina a xantina por la acción de la guanina aminohidrolasa (guanina desaminasa). El ácido úrico generado por la acción de la xantina oxidasa es el producto final de la degradación enzimática en el hombre y otros primates, en las aves y en los reptiles terrestres. Cerca del 90% de la hipoxantina y de la guanina que se produce en estas rutas catabólicas se reconvierte en nucleótidos de purina por las rutas de recuperación descritas anteriormente, el resto se transforma en ácido úrico y se excreta (15).

Al igual que los peroxisomas, los glicosomas también poseen enzimas involucradas en el

metabolismo de las purinas. No obstante, los parásitos protozoarios no pueden sintetizar *de novo* el anillo de purina como sucede en las células de los mamíferos. Como una consecuencia de la completa dependencia de las purinas del hospedador, los protozoarios están equipados con diversas rutas de rescate de purinas (16). Para los tripanosomatídeos las vías de rescate de purinas consiste en una reacción única catalizada por la enzima fosforibosiltransferasa (PRT) en la cual las diferentes purinas reaccionan con 5-fosforibosil-1 pirofosfato (PRPP) para generar las correspondientes purinas (Fig 2).

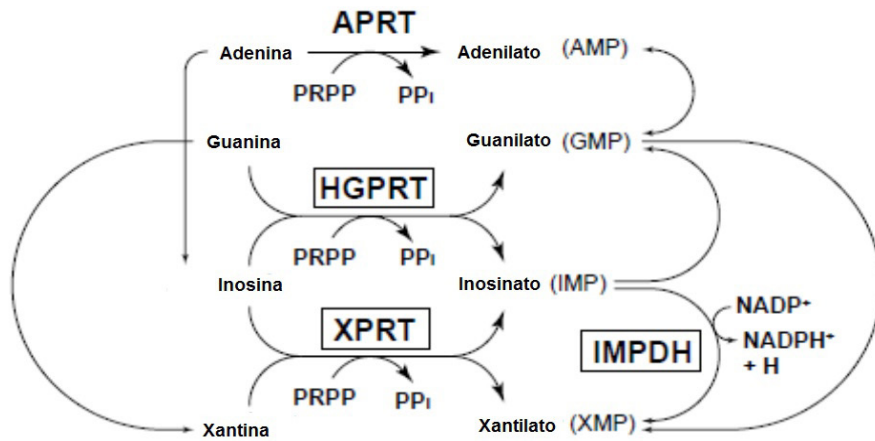


Fig 2. Vía de rescate de purinas en tripanosomatídeos
 APRT (adenina fosforibosiltransferasas); HGPRT (fosforibosiltransferasa de hipoxantina-guanina);
 IMPDH, (inosinato deshidrogenasa); XPRT (xantinafosforibosiltransferasa).

Las enzimas PRT involucradas en la conversión de adenina, guanina, hipoxantina y xantina han sido descritas en *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. Han sido reportados datos relacionados con estas enzimas para *L. donovani*, mientras que han sido caracterizados tres genes diferentes que codifican para las PRT: PRT hipoxantina-guanina (HGPRT),

la cual puede utilizar hipoxantina y guanina como sustratos, xantina PRT (XPRT) que convierte la xantina y la hipoxantina en xantilato e inosinato respectivamente y la adenina PRT (APRT) que es específica para la adenina (17).

Han sido caracterizados los genes HGPRT de *T. brucei* y *T. cruzi* (18,19). HGPRT y XPRT fueron localizados exclusivamente en glicosomas. Todas

estas enzimas tienen un motivo C-terminal de direccionamiento a glicosoma con excepción de la HGPRT de *T. brucei* y la APRT de *L. donovani* (20). Adicionalmente, una enzima implicada en la interconversión de los nucleótidos de purina, la IMP deshidrogenasa (IMPDH) la cual reduce el inosinato a xantilato, también posee señal de transporte a glicosoma (21).

ADA y colinesterasas en la tripanosomiasis experimental.

Da Silva y col. (22), estudiaron la actividad de las colinesterasas y la ADA en sangre y suero de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi* y encontraron un incremento significativo de la actividad de Acetilcolinesterasa (AChE) en la sangre de las ratas infectadas a los 60 y 120 días post-inoculación (PI). En contraste, los niveles de butirilcolinesterasa (BChE) disminuyeron significativamente en el suero de los animales infectados en el mismo período de tiempo. La actividad ADA a los 120 días, fue menor en los animales infectados en comparación con los no infectados.

El aumento en la actividad de la AChE en sangre, puede ser debido a la respuesta inflamatoria causada por el parásito tal como está descrito en la literatura (23). Cuando aumenta la AChE, se produce una rápida degradación de acetilcolina (ACh), el cual es un neurotransmisor con acción anti-inflamatoria que se une a los receptores nicotínicos expresados en la superficie de muchos tipos celulares, entre ellos los linfocitos (24); inhibe así la proliferación de citoquinas, serotonina, histamina, óxido nítrico, enzimas lisosomales, prostaglandinas y leucotrienos, que son mediadores de procesos inflamatorios (25).

La disminución de la actividad BChE en la infección causada por *T. cruzi* podría estar relacionada con lesiones hepáticas, pero la posibilidad de que esta inhibición puede estar relacionada con procesos inflamatorios no puede ser ignorada, ya que esta enzima puede participar en la regulación de la respuesta inmune (24). La

reducción de la actividad ADA podría causar un aumento en la concentración extracelular de adenosina la cual se convierte en inosina.

La reducción en los niveles de la ADA daría lugar a la interacción de la adenosina con los receptores de adenosina expresados en muchos tipos de células con posibles efectos anti-inflamatorios, entre ellos la inhibición de la respuesta inmune Th1. En la infección aguda causada por *T. cruzi* hay una polarización de la respuesta inmune celular hacia el patrón Th1, con la producción de IFN- γ (26). Sin embargo, la inhibición de esta respuesta por la acción de la unión de la adenosina extracelular a los receptores purinérgicos podría ser un efecto compensatorio, para atenuar la inflamación y el daño tisular. Por lo tanto, la acción anti-inflamatoria de la adenosina como una alternativa para conservar las células y los tejidos es una hipótesis probable en la infección por *T. cruzi* (26).

La actividad de la ADA ha sido detectada en la superficie de las células hematopoyéticas (27). Chottiner y col. (28), describieron que la anemia hemolítica está asociada a un notable aumento de la actividad de la ADA en eritrocitos pero con niveles normales de la enzima en otras células sanguíneas, como los linfocitos. Las causas de la anemia causada por *T. evansi* no son completamente comprendidas (29). En la infección por este protozoo, se producen cambios en los leucocitos tales como neutropenia, neutrofilia, monocitosis, linfopenia y/o linfocitosis (30).

Dada las funciones de la ADA en leucocitos y el sistema hematopoyético, Da Silva y col. (31), llevaron a cabo un estudio que tuvo como objetivo evaluar la actividad de esta enzima en suero, eritrocitos y linfocitos de ratas infectadas con *T. evansi*. La reducción del hematocrito y el aumento en el número de linfocitos se correlacionaron con la actividad ADA en eritrocitos y linfocitos.

Los autores observaron una disminución de la actividad de dicha enzima en el suero y eritrocitos de las ratas infectadas con *T. evansi* en comparación con las ratas no infectadas ($P < 0,05$). Diversos investigadores han señalado que

los glóbulos rojos poseen niveles significativos de la ADA (32), basados en esta información los autores infieren que la actividad ADA fue baja en suero y/o plasma como consecuencia de la disminución de las células sanguíneas debido a un proceso hemolítico, lo que causa anemia en la tripanosomiasis. Sin embargo, a pesar de la correlación positiva entre los niveles de hematocrito y la actividad de la ADA en los eritrocitos, son necesarios más estudios para confirmar el papel de la enzima en la anemia causada por *T. evansi* en ratas.

La actividad de la ADA puede ser un marcador sensible para determinar la gravedad de las infecciones y para el seguimiento de la evolución de las mismas. Se ha reportado aumento en los niveles de la ADA en el suero de hospedadores con tuberculosis, teileriosis, malaria y leishmaniasis visceral (33-35). No obstante, ningún estudio ha demostrado una relación entre la infección por *T. evansi* con la actividad de ADA en el Sistema Nervioso Central. Por esta razón, Da Silva y col. (36), se propusieron determinar si la infección por *T. evansi* induce cambios en la actividad de ADA en tejidos del cerebro de ratas adultas. La actividad de la ADA se estimó en el cerebelo, la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo, sin embargo; no se observaron diferencias en el cerebelo de los animales infectados y los no infectados ($P > 0,05$).

En la corteza cerebral y en el hipocampo de ratas en fase aguda de la infección se produjo una reducción significativa en la actividad de la ADA (al 4 día post-infección; PI), en cambio aumento en las ratas en fase crónica (20 días PI). Los parásitos se detectaron en sangre periférica y cerebro a través de examen microscópico y PCR respectivamente, en ratas en fase aguda y crónica (36). La reducción de la actividad de ADA en el cerebro estuvo asociada con altos niveles de parasitemia y anemia en la infección aguda. De tal forma que las alteraciones en la actividad de la enzima en cerebro de ratas infectadas con *T. evansi* podría tener implicaciones para la patogénesis de la enfermedad.

Papel de las nucleotidasas y los nucleótidos de adenina en la infección por *T. cruzi* y *T. evansi*

El sistema de señalización purinérgica cumple importantes funciones: regulador en la inflamación, la activación celular, el flujo sanguíneo y la trombosis vascular por biomoléculas extracelulares, tales como nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) y de adenosina (37). Como una consecuencia de la infección, los eritrocitos, leucocitos y las plaquetas secretan altas concentraciones de adenosina al medio extracelular (38). Estos nucleótidos ejercen sus funciones a través de tres purinoceptores P2 en plaquetas: P2X1 (receptor ionotrópico que provoca una rápida entrada de calcio hacia el citosol), P2Y1 (receptor metabotrópico que moviliza el calcio desde las cisternas internas) y P2Y12 (receptor acoplado a la proteína G α_i que estabiliza la agregación plaquetaria) (39-41).

Después de ejercer sus funciones, los nucleótidos son hidrolizados por un sistema multienzimático con el fin de mantener los niveles extracelulares en concentración fisiológica y evitar la desensibilización de los receptores purinérgicos. Estas enzimas se encuentran en la superficie de prácticamente todos los tipos de células de mamíferos e incluyen ecto-nucleotidasas de diversas familias tales como la E-NTPDasa, la E-NPP y la E-5'-NT. Las ectonucleotidasas son responsables de la hidrólisis de ATP, ADP, AMP y la formación de la adenosina (42). El nucleósido adenosina inhibe la agregación de plaquetas y actúa como un vasodilatador potente, que ejerce una función protectora en el corazón por disminución de las demandas metabólicas del miocardio y por aumento del flujo sanguíneo coronario (43). Sus efectos antiagregantes son mediados a través de receptores de adenosina acoplados a proteína G (purinoceptores P1), específicamente los subtipos de receptores A2A y A2B (44,45). Goncalves Souza y col. (46), reportaron un incremento del 21% en la actividad E-NPP y del 30% en la actividad E-5'-NT en pacientes chagásicos ($P < 0,05$), sin embargo; una

disminución del 34% en la actividad de E-ADA se determinó en el mismo grupo ($P < 0,001$). Adicionalmente, una disminución significativa en la agregación de plaquetas a dos concentraciones diferentes de ADP (5 y 10 μM) fue detectada ($P < 0,05$). El incremento en las actividades E-NPP y E-5'-NT así como la disminución de la actividad E-ADA en plaquetas de los pacientes chagásicos contribuyeron a disminuir la agregación plaquetaria, lo que sugiere que el sistema purinérgico está involucrado en el proceso de regulación de trombos en estos pacientes, ya que la adenosina (el producto final de la hidrólisis de ATP) tiene efectos cardioprotectores y vasodilatadores que impiden el progreso clínico de la enfermedad.

Da Silva y col. (47), llevaron a cabo un estudio con el objetivo de evaluar la concentración de adenosina y nucleótidos de adenina en el suero y la corteza cerebral de ratas infectadas con *T. evansi*. A los 4 y 20 días post-infección (PI) se tomaron muestras de sangre y corteza cerebral para medir los niveles de ATP, ADP, AMP y adenosina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En el suero se detectó un aumento significativo en las concentraciones de ATP, AMP y adenosina a los 4 y 20 días PI. Adicionalmente, en la corteza cerebral se observó un aumento significativo en las concentraciones de ATP, AMP y disminución de los niveles de adenosina al 4 día PI. Al día 20 PI sólo se observó un aumento en las concentraciones de adenosina y AMP en la corteza cerebral de las ratas infectadas. No se observó ninguna diferencia entre la concentración de ADP en el suero y el cerebro a los 4 y 20 días PI. Tampoco se evidenciaron cambios histológicos en la corteza cerebral de los animales infectados. Dichos resultados permiten sugerir que la infección con *T. evansi* en ratas provoca un aumento en las concentraciones de ATP, AMP y de adenosina en el suero y la corteza cerebral en los períodos de tiempo evaluados. Estas alteraciones se produjeron como resultado de la infección por *T. evansi* e implican el deterioro de la neurotransmisión, la neuromodulación y de la

respuesta inmune confirmando así la importancia del sistema purinérgico en esta patología.

Las enzimas que degradan nucleótidos y nucleósidos: la NTPDasa, la 5-nucleotidasa y la adenosin deaminasa (ADA) están presentes en la superficie de la membrana de las plaquetas las cuales participan en los trastornos de coagulación de animales infectados con *T. evansi*. Oliveira y col. (48), evaluaron las actividades de estas enzimas en las plaquetas de ratas infectadas experimentalmente con el parásito. Para ello, los animales se dividieron en cuatro grupos, de acuerdo con el nivel de parasitemia: (grupo A: comienzo de la parasitemia), (grupo B: alta parasitemia) y (grupo C: infección crónica), las muestras de sangre fueron tomadas a los 3, 5 y 15 días PI respectivamente. El Grupo D (control) estuvo conformado por animales no infectados. En todos se realizaron recuento de plaquetas y los ensayos enzimáticos.

Los animales de los grupos A y B mostraron una marcada trombocitopenia, pero el recuento de plaquetas no se vio afectado en los animales en fase crónica. Las actividades de la NTPDasa, 5-Nucleotidasa y la ADA disminuyeron en las plaquetas de las ratas de los grupos A y B, en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$). En el grupo C, sólo la actividad de NTPDasa y de 5-nucleótidasa disminuyó ($p < 0,001$). Las correlaciones entre el recuento de plaquetas y la hidrólisis de nucleótidos/nucleósidos fueron positivas y estadísticamente significativas en los grupos A y B ($p < 0,05$). La agregación de plaquetas se redujo en todos los grupos infectados, en comparación con el grupo control ($p < 0,05$). Las alteraciones observadas en la actividad de las enzimas antes mencionadas en los animales infectados con *T. evansi* pudiesen estar relacionadas con la trombocitopenia la cual genera una menor liberación de ATP y ADP. Otra posibilidad es que se produzcan cambios en las membranas de estas células lo que pudiese llevar a la disminución en la expresión de estas enzimas en la superficie celular.

Expresión de ADA en *T. evansi* y uso de inhibidores de la enzima en el tratamiento de la tripanosomiasis.

Las investigaciones para determinar la expresión de ADA en tripanosomatidos y el uso de inhibidores de dicha enzima están en su etapa inicial. Da Silva y col. (49), es el primer grupo de investigación que ha realizado un estudio bioquímico con la finalidad de detectar la ADA en *T. evansi* y adaptar un ensayo para la medición de su actividad en tripomastigotes. Para ello, los parásitos se separaron de la sangre de ratones infectados con una columna de DEAE-celulosa. La actividad ADA en tripomastigotes se evaluó a concentraciones de 0,1, 0,2, 0,5, 0,6 y 0,8 mg de proteína por espectrofotometría y se detectó en todas las concentraciones ensayadas. Por lo tanto, la enzima ADA se expresa en *T. evansi* y es posible detectarla por métodos bioquímicos. Dicha enzima podría estar asociada a las funciones vitales del parásito, similar a lo que ocurre en los mamíferos.

Rottemberg y col. (50), demostraron que la inyección intraperitoneal de cordicepina, un análogo de adenosina (3-desoxiadenosina) junto con el inhibidor de ADA (coformicina o desoxicoformicina) cura la infección por *T. brucei brucei* en ratones. El tratamiento también fue efectivo en la etapa en la que los tripanosomas habían penetrado en el parénquima cerebral, según lo evidenciado por el inmunomarcaje de parásitos y células endoteliales de los vasos cerebrales. En esta etapa, no solo se eliminaron los parásitos, sino que también se observó una reducción en el número de células inflamatorias CD45+. La incubación *in vitro* con cordicepina redujo el crecimiento de *T. brucei brucei* y *T. cruzi*, así como de *L. major* y *L. amazonensis*. Adicionalmente, la administración de cordicepina junto con desoxicoformicina a ratones infectados con *T. cruzi* redujo significativamente la parasitemia. En consecuencia, se propone la utilización de análogos de nucleósidos resistentes a la ADA como candidatos para el tratamiento

de la fase tardía de la Tripanosomiasis Africana Humana (HAT).

Dalla-Rosa y col. (51), evaluaron el efecto de la 3-desoxiadenosina y la desoxicoformicina en los parámetros hematológicos y la actividad de la ADA en plasma y cerebro de ratones infectados con *T. evansi*. Para ello los autores trabajaron con siete grupos de animales: control sano (A), tratados con 3-desoxiadenosina (B), tratados con desoxicoformicina (C), infectados (D), infectados y tratados con 3-desoxiadenosina (E), infectados y tratados con desoxicoformicina (F), infectados y tratados con una combinación de 3-desoxiadenosina y desoxicoformicina (G). Los animales de los grupos B y C no mostraron variación en los valores de hematocrito, eritrocitos totales, hemoglobina y leucocitos totales cuando fueron comparados con el grupo A. Adicionalmente, en el grupo D y F se detectó una disminución en los valores de hematocrito, eritrocitos totales y la concentración de hemoglobina al 8 día PI. El número de leucocitos totales se incrementó de manera significativa en los animales del grupo D al 4 y 8 día PI, en comparación con los otros grupos, con excepción de los grupos E y F en los cuales hubo un aumento similar de leucocitos al día 8 PI.

Con respecto a la actividad de la ADA, los animales del grupo B (tratados con 3-desoxiadenosina) no mostraron variaciones significativas en los niveles de la enzima en plasma y cerebro cuando fueron comparados con el grupo A. El tratamiento con desoxicoformicina en los animales del grupo C redujo de forma significativa la actividad ADA en plasma y cerebro entre los días 4 y 8 PI. En los animales infectados con *T. evansi* (D) hubo una reducción en la actividad de la ADA en plasma sólo al día 8 PI, mientras que los animales del grupo E (infectados y tratados con 3-desoxiadenosina) tuvieron un aumento. En los grupos F y G la actividad ADA en plasma y cerebro se redujo significativamente al ser comparados con el control negativo.

Los inhibidores de la ADA disponibles en la industria farmacéutica presentan un número de inconvenientes para su uso clínico, tales como problemas en su farmacocinética, alto costo y/o efectos tóxicos graves (51). La desoxicoformicina por su parte, promueve la acumulación intracelular de los nucleótidos de adenina y desoxiadenosina, bloquea la síntesis de ADN mediante la inhibición de la ribonucleótido reductasa, mientras que la desoxiadenosina inactiva a la S-adenosil homocisteína hidrolasa y promueve la acumulación de S-adenosil cisteína la cual es tóxica para los linfocitos (52).

Los autores del trabajo mencionado anteriormente (52), indicaron que los resultados eran preocupantes porque a pesar de que el protocolo terapéutico es eficaz en el control de la tripanosomiasis causa interferencia en el sistema purinérgico. Debido a que ADA y adenosina participan en la respuesta inmune, el sistema inmune puede verse afectado por el tratamiento empleado. Por lo tanto, deben llevarse a cabo más estudios antes de recomendar dicho tratamiento para la tripanosomiasis.

CONCLUSIONES

Es evidente que las investigaciones bioquímicas y moleculares en tripanosomatídeos se han incrementado en los últimos años. Algunas tienen el propósito de identificar las proteínas clave que podrían ser utilizadas en la terapia contra estos parásitos. Es por esta razón que es de gran importancia llevar a cabo otros estudios más complejos, entre ellos la clonación, secuenciación y expresión de la enzima recombinante para analizar sus propiedades cinéticas (K_m y $V_{máx}$) y compararlas con las de la enzima natural. Estos hallazgos podrían contribuir a una comprensión de las diferencias o semejanzas entre la ADA de tripanosomatídeos y la de humanos para no generar daños colaterales y así evaluar si puede ser propuesta como un blanco quimioterapéutico.

REFERENCIAS

1. **Eltzschig HK.** Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology* 2009; 111:904-915.
2. **Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R.** Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev* 2001; 21:105-128.
3. **Cordero OJ, Salgado FJ, Fernández-Alonso CM, Herrera C, Lluís C, Franco R, Nogueira M.** Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001; 70:920-930.
4. **Pérez-Aguilar MC, Goncalves L, Ibarra A, Bonfante-Cabarcas R.** Adenosin deaminasa como molécula coestimuladora y marcador de inmunidad celular. *Invest Clin* 2010; 51:561-571.
5. **Vilchez D, Pérez-Aguilar MC, Saba S, Bonfante-Cabarcas R.** Los niveles séricos de adenosin deaminasa y ácido úrico se correlacionan en pacientes gestantes con trastornos hipertensivos. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2009; 74:217-224.
6. **Torrellas Y, Pérez-Aguilar MC, Ramos B, Franco-Useche A, Ibarra A, Rodríguez-Bonfante C, Bonfante-Cabarcas R.** Increased adenosine deaminase serum activity in patients with acute myocardial infarction. *Rev Latinoam Hipertens* 2010; 5:38-42.
7. **Khambu B, Mehta KD, Rijal S, Lamsal M, Majhi S, Baral N.** Serum nitrite level and adenosine deaminase activity is altered in visceral leishmaniasis. *Nepal Med Coll J* 2007; 9:40-43.
8. **Jadhav AA, Jain A.** Sputum adenosine deaminase and alkaline phosphatase activity in pulmonary tuberculosis. *Arch Physiol Biochem* 2012; 118:6-9.
9. **Hitchcock DS, Fan H, Kim J, Vetting M, Hillerich B, Seidel RD, Almo SC, Shoichet BK, Sali A, Raushel FM.** Structure-guided discovery of new deaminase enzymes. *J Am Chem Soc* 2013; 135:13927-13933.
10. **Pérez-Aguilar MC, Goncalves L, Rafael Bonfante-Cabarcas.** Adenosin deaminasa en el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa. *Invest Clin* 2012; 53:315-324.

11. **Galanti B, Giusti G.** Direct colorimetric method for the determination of adenosine deaminase and 5-AMP deaminase in the blood. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1966; 15:1316-1320.
12. **Blake J, Berman P.** The use of adenosine deaminase assays in the diagnosis of tuberculosis. *S Afr Med J* 1982; 3:19-21.
13. **Contreras J.** Errores innatos del metabolismo de las purinas y otras enfermedades relacionadas. *Rev Cubana Pediatr* 2012; 84:197-200.
14. **Di Virgilio F.** Purines, purinergic receptors and cancer. *Cancer Research* 2012; 72:1-7.
15. **Chaudhary K, Malhotra K, Sowers J, Aroor A.** Uric acid: key ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome. *Cardiorenal Med* 2013; 3:208-220.
16. **Michels PA, Hannaert V, Bringaud F.** Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae: New Data and Views. *Parasitol Today* 2000; 11:482-489.
17. **Boitz JM, Ullman B.** Amplification of adenine phosphoribosyltransferase suppresses the conditionally lethal growth and virulence phenotype of *Leishmania donovani* mutants lacking both hypoxanthine-guanine and xanthine phosphoribosyltransferases. *J Biol Chem* 2010; 285:18555-18564.
18. **Allen T, Ullman B.** Cloning and expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:5431-5438.
19. **Soeiro MN, de Castro SL.** *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13:105-121.
20. **Zarella-Boitz JM, Rager N, Jardim A, Ullman B.** Subcellular localization of adenine and xanthine phosphoribosyltransferases in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 134:43-51.
21. **Dobie F, Berg A, Boitz JM, Jardim A.** Kinetic characterization of inosine monophosphate dehydrogenase of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 152:11-21.
22. **Da Silva AS, Pimentel VC, Fiorenza AM, Franca RT, Tonin AA, Jaques JA, Leal CA, Da Silva CB, Morsch V, Schetinger MR, Lopes ST, Monteiro SG.** Activity of cholinesterases and adenosine deaminase in blood and serum of rats experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 2011a; 105: 385-391.
23. **Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT.** Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2001; 159:1723-1733.
24. **Das UN.** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 2007; 13:214-221.
25. **Nizri E, Hamra-Amitay Y, Sicsic C, Lavon I, Brenner T.** Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 2006; 50:540-547.
26. **Kumar S, Tarleton RL.** Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 2001; 166:4596-4603.
27. **Zavialov AV, Gracia E, Glaichenhaus N, Franco R, Zavialov AV, Lauvau G.** Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 2010; 88:279-290.
28. **Chottiner EG, Ginsburg D, Tartaglia AP, Mitchell BS.** Erythrocyte adenosine deaminase overproduction in hereditary hemolytic anemia. *Blood* 1989; 74:448-453.
29. **Aquino LP, Machado RZ, Alessi AC, Marques LC, Castro MB, Malheiros EB.** Aspectos hematológicos, bioquímicos e anatomopatológicos da infecção de *Trypanosoma evansi* em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2002; 54:8-18.
30. **Wolkmer P, Da Silva AS, Carnelutti JF, Paim FC, Traesel C, Lopes STA, Monteiro SG.** Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol* 2009; 165:41-46.
31. **Da Silva AS, Bellé LP, Bitencourt PE, Souza VCG, Costa MM, Oliveira CB, Jaques JA, Leal DB, Moretto MB, Mazzanti CM, Lopes ST, Monteiro SG.** Activity of the enzyme adenosine deaminase in serum, erythrocytes and

- lymphocytes of rats infected with *Trypanosoma evansi*. Parasitology 2011b; 138:201-208.
32. **Conlon BA, Law WR.** Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. Clin Exp Immunol 2004; 138:14-20.
 33. **Melo FAF, Afione JB, Santos ML, Castelo-Filho A.** Diagnóstico da tuberculose pleural pela ADA, isolada ou combinada a outras variáveis, inclusive em HIV-positivos. Folha Med 2000; 119:9-21.
 34. **Khambu B, Mehta KD, Rijal S, Lamsal M, Majhi S, Baral N.** Serum nitrite level and adenosine deaminase activity is altered in visceral Leishmaniasis. Nepal Medi Coll J 2007; 9:40-43.
 35. **Altug N, Yükses N, Agaoglu ZT, Keles I.** Determination of adenosine deaminase activity in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. Trop Anim Health Prod 2008; 40:449-456.
 36. **Da Silva AS, Bellé LP, Bitencourt PER, Garcia-Perez HAC, Thomé GR, Costa MM, Oliveira CB, Teixeira MMG, Moretto MB, Mazzanti CM, Lopes STA, Monteiro SG.** *Trypanosoma evansi*: Adenosine deaminase activity in the brain of infected rats. Exp Parasitol 2011; 127:173-177.
 37. **Fietto JLC, DeMarco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TMU, Souza W, Almeida SV.** Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Res Commun 2004; 316: 454-460.
 38. **Atkinson B, Dwyer K, Enyoji K, Robson SC.** Ectonucleotidases of the cd-39/ntpdase family modulated platelet activation on thrombus formation: potential as therapeutic targets. Blood Cells Mol Dis 2006; 36:217-222.
 39. **Fung CY, Jones S, Ntrakwah A, Naseem KM, Fardale RW, Mahaut-Smith MP.** Platelet Ca (2+) responses coupled to glycoprotein VI and Toll-like receptors persist in the presence of endothelial-derived inhibitors: roles for secondary activation of P2X1 receptors and release from intracellular Ca(2+) stores. Blood 2012; 119:3613-3621.
 40. **Kalwa H, Sartoretto JL, Martinelli R, Romero N, Steinhorn BS, Tao M, Ozaki CK, Carman CV, Michel T.** Central role for hydrogen peroxide in P2Y1 ADP receptor-mediated cellular responses in vascular endothelium. Proc Natl Acad Sci USA 2014; 111:3383-3388.
 41. **Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB.** Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. Nature 2001; 409:202-207.
 42. **Zimmermann H.** Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol 2000; 362:299-309.
 43. **Ralevic V, Burnstock G.** Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. Drug News Perspect 2003; 16:133-140.
 44. **Yang D, Chen H, Koupenova M, Carroll SH, Eliades A, Freedman JE, Toselli P, Ravid K.** A new role for the A2b adenosine receptor in regulating platelet function. J Thromb Haemost 2010; 8:817-827.
 45. **Johnston-Cox HA, Yang D, Ravid K.** Physiological implications of adenosine receptor-mediated platelet aggregation. J Cell Physiol 2011; 226:46-51.
 46. **Gonçalves Souza VC, Schlemmer KB, Noal CB, Jaques JAS, Bagatini MD, Pimentel VC, Carli LFD, Leal CAM, Fleck J, Moretto MB, Schetinger MRC, Leal DBR.** Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. Purinergic Signal 2012; 8:753-762.
 47. **Da Silva AS, Oliveira CB, Rosa LD, Leal CA, Da Cruz RC, Thomé GR, Athayde ML, Schetinger MRC, Monteiro SG, Lopes STA.** Influence of *Trypanosoma evansi* in adenine nucleotides and nucleoside concentration in serum and cerebral cortex of infected rats. Exp Parasitol 2012; 131:80-84.
 48. **Oliveira CB, Da Silva AS, Vargas LB, Bitencourt PER, Souza VCG, Costa MM, Leala CAM, Moretto MB, Leal DBR, Lopes STA, Monteiro SG.** Activities of adenine nucleotide and nucleoside degradation enzymes in platelets of rats infected by *Trypanosoma evansi*. Vet Parasitol 2011; 178:9-14.
 49. **Da Silva AS, Pimentel VC, Jaques JAS,**

- Wolkmer P, Tavares KCS, Lazzarotto CR, Miletto LC, Schetinger MRC, Mazzanti CM, Lopes STA, Monteiro SG.** Biochemical detection of adenosine deaminase in *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol* 2011d; 128:298-300.
50. **Rottenberg ME, Masocha W, Ferella M, Petitto-Assis F, Goto H, Kristensson K, McCaffrey R, Wigzell H.** Treatment of african trypanosomiasis with cordycepin and adenosine deaminase inhibitors in a mouse model. *J Infect Dis* 2005; 192:1658-1665.
51. **Dalla-Rosa L, Da Silva AS, Ruchel JB, Gressler LT, Oliveira CB, França RT, Lopes ST, Leal DB, Monteiro SG.** Influence of treatment with 3'-deoxyadenosine associated deoxy-coformycin on hematological parameters and activity of adenosine deaminase in infected mice with *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol* 2013; 135:357-362.
52. **Zimmermann SC, Sadler JM, O'Daniel PI, Kim NT, Seley-Radtke KL.** Reverse carboxylic fleximers: synthesis of a new class of adenosine deaminase inhibitors. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2013; 32:137-154.