

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ATIVIDADE DA NTPDASE1 EM LINFÓCITOS DE HUMANOS
IMUNOCOMPETENTES E IMUNODEPRIMIDOS**

DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2005

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha filha Júlia, meu verdadeiro tesouro.

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela corre por nossa conta.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Claudio, pelo apoio, pela paciência e pelo auxílio dado no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais, Antonio e Maudy, por torcerem sempre por mim e me apoiarem em momentos cruciais.

A minha orientadora, Maria Rosa, por me permitir aprender o verdadeiro sentido da pesquisa e saber que a orientação é semelhante à maternidade.

Aos meus bolsistas de iniciação científica, Tiago, e especialmente à Cris, pelas várias horas de trabalho acompanhadas por algumas dificuldades.

E, finalmente, agradeço a todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

PARTE I

RESUMO	01
ABSTRACT	02
INTRODUÇÃO	03
1 ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E RECEPTORES DE NUCLEOTÍDEOS	03
1.1 Funções do ATP extracelular.....	03
1.2 Enzimas que degradam nucleotídeos.....	04
1.3 Receptores de nucleotídeos.....	08
2 NTPDASE E SISTEMA IMUNE	10
2.1 Linfócitos e seus marcadores de superfície.....	10
2.2 Linfócitos e apoptose.....	11
2.3 Funções da NTPDase nas células linfóides.....	13
3 RESPOSTA IMUNE AO HIV	14
3.1 Infecção das células do sistema imune pelo HIV.....	15
3.2 Mecanismos de defesa do hospedeiro.....	15
3.3 Ativação crônica, apoptose e imunodeficiência.....	16
OBJETIVOS	18

PARTE II

CAPÍTULO 1	20
CAPÍTULO 2	28
CAPÍTULO 3	35

PARTE III

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	70

RESUMO

Os linfócitos humanos apresentam na sua superfície a enzima NTPDase1 (ecto-apirase, ecto-difosfoidrolase; CD39; EC 3.6.1.5), responsável pela hidrólise do ATP e ADP extracelular e/ou outros nucleotídeos di ou tri fosfatados. A determinação da atividade da enzima foi padronizada através de método colorimétrico, o qual quantifica o fosfato livre liberado durante a reação. A NTPDase1 foi caracterizada através da demonstração de condições ótimas de incubação, como dependência de cálcio, pH, tempo de incubação e temperatura ótimos, além da obtenção de parâmetros cinéticos. Os resultados obtidos foram confirmados por uma baixa expressão de CD39 nos linfócitos humanos, verificada por análise citométrica, com utilização de anticorpo monoclonal correspondente. Este fato indica um baixo estado de ativação dos linfócitos, uma vez que o CD39 é considerado um marcador de ativação destas células. Posteriormente, foi determinada a atividade da NTPDase1 em linfócitos de pacientes imunodeprimidos pela infecção causada pelo HIV, os quais são acompanhados pelo monitoramento de sua carga viral no plasma e contagem de células T CD4⁺. A infecção pelo HIV resulta em alterações nas células imunes e na secreção de citocinas importantes na resposta patógenos. Nesta situação pode haver alterações bioquímicas na resposta imune, como por exemplo, alterações na hidrólise de nucleotídeos, ou seja, na atividade das enzimas que degradam nucleotídeos extracelulares. Os linfócitos encontram-se em estado de ativação crônica, o que faz com que até mesmo células não-infectadas pelo vírus, possam sofrer apoptose por ativação de caspases efetoras. Através da determinação da atividade da NTPDase nos linfócitos imunodeprimidos, verificou-se um aumento de sua atividade, acompanhado por uma maior expressão de CD39 na superfície destas células. Estes resultados sugerem que a NTPDase1 é importante para a manutenção da resposta imune, mantendo concentrações adequadas de ATP extracelular, o qual é essencial para certas funções imunes, mas também pode ser prejudicial no momento que induz apoptose nos linfócitos, o que poderia aumentar o estado de imunodepressão. Devido ao fato de que muitos dos pacientes HIV-positivos recebem terapia anti-retroviral, foi necessário verificar *in vitro* possíveis efeitos destas drogas sobre a atividade da NTPDase1. Neste caso, observou-se que as concentrações terapêuticas destas drogas não afetaram a atividade da enzima. Sendo assim, a atividade aumentada da NTPDase1 nestes pacientes, não é devida à interferência da terapia anti-retroviral.

Palavras-chaves: NTPDase1; CD39; linfócitos; HIV-1.

ABSTRACT

Human lymphocytes have the NTPDase1 enzyme (ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) on their surface, which is responsible for the extracellular hydrolysis of ATP, ADP and/or other di or tri phosphatade nucleotides. The enzyme activity was standardized through a colorimetric assay, which measures free phosphate liberated during the reaction. NTPDase1 was characterized through the demonstration of incubation optimum conditions, such as calcium dependence, pH, incubation time and optimum temperature, besides calculating kinetic parameters. The results obtained were confirmed by a low expression of CD39 in human lymphocytes, verified by a cytometric analysis, with the utilization of the monoclonal antibody. This indicates a low activation state of lymphocytes, in that CD39 is considered an activation marker of these cells. Afterwards, NTPDase activity was determined in the lymphocytes of immune depressed patients with the HIV infection, which were monitored by viral load determination and CD4⁺ T cells count. The HIV infection results in alterations of the immune cells and a secretion of important cytokines in response to pathogens. In this situation, biochemical alterations in the nucleotide hydrolysis can occur, i.e., in the activity of enzymes that hydrolyze extracellular nucleotides. Lymphocytes are in a chronic activation state, which actually makes non-infected cells apt to apoptosis by caspase activation. Through NTPDase activity determination in immune depressed lymphocytes, an increase of enzymatic activity was verified, followed by enhanced CD39 expression. These results suggest that NTPDase1 is important for the maintenance of the immune response, keeping adequate concentrations of extracellular ATP that is essential for certain immune functions, but which can also be detrimental, in that it induces apoptosis in lymphocytes. This could increase the immune depression state. Due to the fact that very HIV-positive patients receive antiretroviral therapy, it was necessary to test any drugs *in vitro*, to verify possible effects under NTPDase activity. In this case, it was observed that the enzymatic activity was not affected by therapeutic doses of these drugs. Thus, the increased activity of NTPDase in these patients is not due to the interference of antiretroviral therapy.

Key words: NTPDase1; CD39; lymphocytes; HIV-1.

INTRODUÇÃO

1. ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E RECEPTORES DE NUCLEOTÍDEOS

1.1. FUNÇÕES DO ATP EXTRACELULAR

Vários nucleotídeos têm sido reconhecidos com moléculas sinalizadoras, incluindo ATP, ADP, UTP, UDP e polifosfatos de diadenosina (Ap4A a Ap5A) (Miras-Portugal et al., 1998). Os efeitos dos nucleotídeos extracelulares nas células sangüíneas são, agora, conhecidos e sabe-se que o ATP extracelular, por exemplo, quando em concentração micromolar, pode formar poros nas membranas celulares, resultando em mudanças osmóticas na célula. Na medula óssea e nos timócitos, o ATP estimula a síntese de DNA, mas inibe a sua síntese no baço, linfonodos e linfócitos sangüíneos periféricos. Este nucleotídeo também possui efeitos citostáticos e citotóxicos em algumas células tumorais, por mecanismo ainda desconhecido. Além disso, provoca a liberação de histamina de mastócitos e a secreção de grânulos de neutrófilos e monócitos, enquanto inibe a função de macrófagos e a citotoxicidade mediada por células NK (Natural Killer) (Dombrowski et al., 1997).

O ATP e, possivelmente, o UTP são freqüentemente liberados no meio extracelular através de mecanismos não líticos, sendo muitas vezes consequência de dano celular ou morte celular aguda. Uma vez liberado no meio pericelular, o ATP pode se ligar a receptores P2 e após ser rapidamente hidrolisado por ecto-ATPases ou ecto-nucleotidases (Di Virgilio et al., 2001).

A adenosina, que pode ser formada a partir do ATP hidrolisado, se liga a receptores ou entra na célula e participa da via de salvação das purinas (Zimmermann e

Braun, 1999). A adenosina tem efeitos protetores na injúria endotelial induzida por isquemia (Schetinger et al., 1998; Bonan et al., 2001), mantém a função da barreira endotelial (Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2005), causa vasodilatação e suprime a adesão leucocitária ao endotélio vascular (Cronstein, 1994; Ohta e Sitkovsky, 2001; Yegutkin et al., 2002).

1.2. ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS

As enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares são conhecidas como ecto-nucleotidases, pois estão ancoradas à superfície celular e possuem o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. As ecto-nucleotidases podem ser classificadas como família das E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), família E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), fosfatases alcalinas e ecto-5'-nucleotidase, sendo amplamente distribuídas nos tecidos (Zimmermann, 2000).

1.2.1. Família E-NTPDase

Nos mamíferos foram clonados e caracterizados funcionalmente oito membros desta família. Nem todos os membros desta família são ectoenzimas, pois além da sua localização extracelular, podem ser encontradas no Complexo de Golgi e retículo endoplasmático. As enzimas que fazem parte desta família possuem domínios de seqüência altamente conservada, que são conhecidos como “regiões conservadas da apirase” (ACRs) sendo estes relevantes para a atividade catalítica (Handa e Guidotti, 1996).

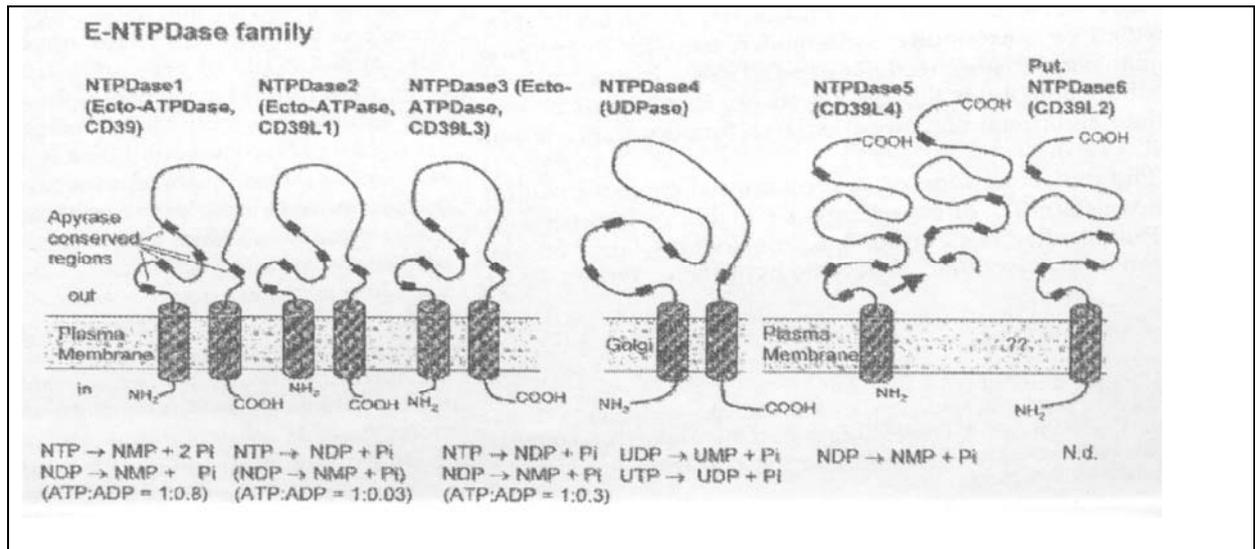


Figura 1. Topografia e propriedades catalíticas de membros da família E-NTPDase (Zimmermann, 2000).

1.2.1.1. NTPDase1 (EC 3.6.1.5), NTPDase2 e NTPDase3

A NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-difosfohidrolase) hidrolisa ATP e ADP em uma taxa molecular de aproximadamente 1:0,5 a 1:0,9 (Kacsmarek et al., 1996; Wang e Guidotti, 1996), o que foi observado para enzimas purificadas pertencentes a tecidos como placenta humana (Christoforidis et al., 1995), aorta bovina (Picher et al., 1996) e pâncreas suíno (LeBel et al., 1980), entre outros. A NTPDase1 hidrolisa nucleotídeos tri e/ou difosfatados, possui uma atividade catalítica máxima adaptada ao ambiente extracelular, necessitando da presença de cátions divalentes tais como cálcio e magnésio e de um pH alcalino. Na maioria dos casos, os valores de K_m estão em faixas micromolares. Na sua topografia na membrana possui um domínio transmembrana com regiões amino e carboxiterminais. Estas características também são comuns às enzimas NTPDase2 e NTPDase3 (Zimmermann, 2001).

NTPDase1 e NTPDase2 estão presentes em uma grande variedade de tecidos, incluindo coração, placenta, pulmão, fígado, musculatura esquelética, timo, rim, pâncreas, testículos, ovários, próstata, cólon e cérebro (Zimmermann e Braun, 1999). Altos níveis de atividade de ATPase estão associados com a vasculatura (endotélio,

músculo liso e cardíaco), linfócitos e plaquetas (Plesner, 1995). Também a NTPDase1 já foi caracterizada em células do sistema imune como linfócitos (Leal et al., 2005) e plaquetas (Pilla et al., 1996). NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) possui uma forte preferência pelo ATP com taxas moleculares de ATP/ADP de 1:0,03 ou menos (Mateo et al., 1999). A NTPDase3 (CD39L3, HB6) é um intermediário funcional que hidrolisa ATP em uma taxa molecular de aproximadamente 1:0,3 (Smith e Kirley, 1998).

1.2.1.2. NTPDase4

Sua estrutura é semelhante às enzimas anteriormente citadas, apresentando duas formas: uma forma está localizada no aparato de Golgi (UDPase) (Wang e Guidotti, 1998) e uma forma lisossomal está localizada nos vacúolos autofágicos (LALP70) (Biederbick et al., 1999). A NTPDase4 possui função de UDPase, hidrolisando UDP e outros nucleosídeos di e tri fosfatados, mas não é capaz de hidrolisar ATP e ADP (Zimmermann, 2000).

1.2.1.3. NTPDase5 e NTPDase6

Quando expressa em células COS-7, a NTPDase5 (CD39L4, ER-UDPase) é secretada e possui uma alta preferência por nucleosídeos 5'-difosfatados, especialmente UDP (Mulero et al., 1999). Uma suposta NTPDase6 (CD39L2), que ainda não foi funcionalmente caracterizada, está situada no aparato de Golgi e em pequena extensão na membrana plasmática (Zimmermann, 2001).

1.2.1.4. NTPDase7 e NTPDase8

A NTPDase7 (LALP1) foi clonada e caracterizada em humanos e ratos (Shi et al., 2001) e possui localização intracelular, sendo classificada como uma endo-apirase, com preferência pelos substratos UTP, GTP e CTP. Bigonnesse e colaboradores (2004)

clonaram e caracterizaram a NTPDase8 em ratos, a qual parece regular os níveis de nucleotídeos extracelulares de maneira distinta de outras ectonucleotidases.

1.2.2. Família E-NPP

Estas enzimas possuem ampla distribuição tecidual e revelam atividade de fosfodiesterase e pirofosfatase, as quais são propriedades da mesma molécula enzimática. São capazes de hidrolizar 3',5'-cAMP a AMP, ATP a AMP e P_{Pi}, ADP a AMP e P_i, ou NAD⁺ a AMP e nicotinamida mononucleotídeo. A hidrólise ocorre tanto com nucleotídeos purínicos quanto pirimidínicos e a família é formada pelas enzimas NPP1, NPP2, NPP3, NPP4 e NPP5 (Zimmermann, 2000; Goding et al., 2003). Há evidências que indicam que esta família pode modular a sinalização mediada por receptores P2 (Picher e Boucher, 2000).

1.2.3. Fosfatases alcalinas

Representam uma família de ecto-fosfomonoesterases não-específicas que degradam não somente nucleosídeos 5'-tri, di e monofosfatados, mas também liberam fosfato inorgânico de uma variedade de compostos orgânicos, incluindo proteínas (Whyte, 1996). Também hidrolisam P_{Pi} (Fernley, 1971; Coleman, 1992) e são similares a ecto-5'-nucleotidase, pois são ancoradas na membrana plasmática via GPI e possuem formas solúveis no soro (Zimmermann, 2001).

1.2.4. Ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5)

A ecto-5'-nucleotidase ancorada via GPI também é conhecida como a proteína de superfície de linfócito CD73 (Christensen, 1997), que representa um marcador de maturação de linfócitos B e linfócitos T. Uma forma solúvel desta enzima também já foi descrita. A enzima hidrolisa nucleosídeos 5'-monofosfatados ao seu respectivo

nucleosídeo e Pi, sendo a principal responsável pela formação de adenosina extracelular a partir de nucleotídeos da adenina, a qual interage com receptores de adenosina (P1) (Resta e Thompson, 1997; Airas, 1998; Resta et al., 1998; Zimmermann, 2000).

A 5'-nucleotidase em linfócitos pode ter um importante papel na regulação do sistema imune humano. Uma atividade diminuída em linfócitos B foi observada em pacientes com deficiência primária de imunoglobulinas (Edwards et al., 1978; Christensen et al., 1996) e em casos de leucemia linfocítica crônica de células B (Rosi et al., 2002). Receptores de adenosina são expressos numa variedade de tecidos e tipos celulares, incluindo linfócitos, e servem como mediadores muito importantes para respostas fisiológicas, como débito cardíaco e contratilidade, neurotransmissão, função renal, vasodilatação da musculatura lisa, agregação plaquetária, geração de ânion superóxido, lipólise e ativação de mastócitos (Rosi et al., 2002).

1.3. RECEPTORES DE NUCLEOTÍDEOS

Os nucleotídeos são moléculas de sinalização extracelular que possuem afinidade por receptores conhecidos como receptores P2, os quais, segundo sua estrutura molecular, são divididos em duas subfamílias: P2Y (acoplados à proteína G) e P2X (ligados a canais de íons). Em células de mamíferos foram clonados e caracterizados farmacologicamente 5 subtipos de receptores P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁) e 7 subtipos de receptores P2X (P2X₁₋₇) (Abbracchio e Burnstock, 1994; Barnard et al., 1994; Ravelic e Burnstock, 1998; Di Virgilio et al., 2001).

1.3.1. Receptores P2Y

Possuem uma porção amino terminal voltada para o ambiente extracelular e uma porção carboxi terminal intracelular. O sinal de transdução ocorre via ativação da

fosfolipase C e/ou estimulação/inibição da adenilato ciclase. Todos os receptores são ativados por ATP, mas em dois deles, P2Y₄ e P2Y₆, o UTP é mais potente. Já no subtipo P2Y₂, o ATP e o UTP possuem a mesma potência. No subtipo P2Y₁, o UTP é inativo e o ADP tem potência equivalente ao ATP ou pode ser até mais potente; contudo, no subtipo P2Y₁₁, o ATP é mais potente do que o ADP e o UTP é inativo (Di Virgilio et al., 2001).

1.3.2. Receptores P2X

Os receptores P2X são ligados a canais de íons que servem como mediadores nas mudanças de permeabilidade de cátions mono e divalentes (Brake et al., 1994; Valera et al., 1994). De fundamental importância são os receptores P2X₇, estruturas multiméricas, das quais 7 subunidades básicas já foram clonadas, possuindo dois domínios transmembrana. As porções amino e carboxiterminais se localizam no lado citoplasmático da membrana celular. O sinal de transdução ocorre via influxo de Na⁺ e Ca⁺⁺ e efluxo de K⁺, causando despolarização da membrana e um aumento do cálcio citoplasmático. O agonista destes receptores é o ATP, na forma bianiônica ou tetraaniônica (Chen et al., 1995; Evans et al., 1998; Di Virgilio et al., 2001).

1.3.3. Receptores P2 em linfócitos

Foi observado que o ATP suprime a proliferação de linfócitos periféricos, devido à produção de adenosina (Fishman et al., 1980) e posteriormente, que o ATP estimula a síntese de DNA em células linfóides do timo e a inibe no baço, linfonodos e sangue periférico (Ikehara et al., 1981). Logo após, começaram os estudos sobre os purino receptores nos linfócitos. Os linfócitos B expressam receptores P2Z, fazendo com que o ATP e outros nucleotídeos possam causar alterações nos estoques de cálcio intracelular. O receptor P2X₇ está presente, e uma vez que haja a ligação do ATP, há

formação de um poro transmembrana, que altera a permeabilidade aos íons mono e divalentes, aumentando assim o cálcio intracelular, tal como faz o receptor P2Z (North, 1996). Além disso, acredita-se que o papel dos receptores P2X no controle da proliferação de linfócitos seja mais complexo do que simplesmente as ações efetoras que levariam à morte celular (Di Virgilio et al., 2001)

2. NTPDASE E SISTEMA IMUNE

2.1. LINFÓCITOS E SEUS MARCADORES DE SUPERFÍCIE

As moléculas de superfícies celulares reconhecidas pelos anticorpos monoclonais são chamadas “antígenos”, uma vez que podem ser produzidos anticorpos contra elas, ou “marcadores”, porque identificam e discriminam diferentes populações celulares. Estes antígenos recebem a designação CD (*cluster differentiation*). Esta classificação dos antígenos tem permitido a identificação de células da resposta imune, seus tipos de resposta e funções efetoras. Estas moléculas têm funções como promover interações e adesão célula-a-célula e traduzir sinais que levem à ativação de linfócitos (Abbas et al., 2002).

Entre os CDs presentes nos linfócitos, podemos encontrar o CD39 (NTPDase1) e o CD73 (ecto-5'-nucleotidase). O CD39 foi originalmente identificado como um marcador de ativação linfóide expresso em linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, células NK e células endoteliais, tendo sido também reconhecido em plaquetas e megacariócitos (Kansas et al., 1991; Dombrowski et al., 1998; Koziack et al., 1999; Coppola et al., 2005). A molécula de CD73 é um antígeno de diferenciação leucocitário, expresso em linfócitos humanos T e B, o qual apresenta atividade de ecto-nucleotidase e representa um marcador de ativação de linfócito T (Christensen et al., 1996). Tanto o CD39 quanto o CD73 participam do metabolismo de nucleotídeos extracelulares.

2.2. LINFÓCITOS E APOPTOSE

A apoptose requer que a célula atingida seja metabolicamente ativa, pois proteínas ou inibidores da síntese de RNA podem bloquear o processo em vários tecidos (Wyllie et al., 1984; Connor et al., 1988). O aumento da concentração de cálcio citoplasmático nas células suscetíveis serve como um sinal precoce do início da apoptose (Orrenius et al., 1989). O ATP, e não outros nucleosídeos-5-trifosfatados, causa um aumento abrupto dos níveis citoplasmáticos de cálcio dentro da célula suscetível, seguido por condensação do citoplasma, tumefação celular, segmentação nuclear e fragmentação do DNA, culminando finalmente na morte celular. O principal marcador bioquímico ou celular de apoptose é a ativação da endonuclease, que causa fragmentação do DNA em múltiplos pedaços de aproximadamente 200 pares de bases (Zheng et al., 1991). O ATP não causa apoptose simplesmente pela formação do poro, visto que o tratamento da célula com perforina cria poros não seletivos com diâmetros de mais de 20nm, resultando em morte celular e não em apoptose (Podack et al., 1985; Young et al., 1986).

A indução da apoptose envolve a ativação de enzimas citosólicas chamadas caspases, que estão presentes na maioria das células, na forma de zimogênio. A primeira via de apoptose é a morte celular passiva (morte por negligência ou morte celular programada) como resultado da perda de estímulo para a sobrevivência. Nesse caso, há um aumento de permeabilidade das membranas nas mitocôndrias e liberação de citocromo *c* no citoplasma. O citocromo *c* funciona como um co-fator com uma proteína chamada fator-1 de ativação (Apaf-1), ativando a caspase 9 que, por sua vez, ativa as caspases efetoras (caspases 3, 6 e 10), levando à apoptose (Abbas et al., 2002; Silva e Mota, 2003).

A segunda via de indução da apoptose inclui a ativação do Fas (Apo-1, CD95), que é membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF). A ligação de

Fas a um ligante solúvel ou ligado à célula (FasL; CD95L) induz apoptose pela via de interação com proteínas intracelulares, contendo domínio de morte, como a FADD (domínio de morte associado ao Fas), e disparo da enzima conversora de interleucina- 1β (ICE; caspase-1) ou proteases ligadas a ICE (Nagata, 1995; Aries et al., 1998). O FADD liga-se ao pró-domínio da caspase 8 que também é capaz de desencadear as caspases efetoras e determinar a apoptose. Esta via é chamada morte celular induzida por ativação. Um dos mecanismos de regulação da apoptose pode ser realizado pela indução de expressão de proteínas antiapoptóticas da família Bcl, como por exemplo, o Bcl-2 (Bcl-2 oncogene ou gene 2 de leucemia/linfoma de células), o qual é capaz de inibir a ação das caspases (Abbas et al., 2002; Silva e Mota, 2003).

A interação do ATP extracelular com receptores $P2X_7$ também dispara um mecanismo que leva a alterações apoptóticas na célula. A ligação do ATP a receptores $P2X_7$ resulta em uma corrente transitória na membrana através de canais de cátions divalentes. Como já mencionado, há uma despolarização sustentada da membrana e um aumento do cálcio citosólico livre devido à abertura de um poro transmembrana; este, permeável a moléculas hidrofílicas de peso molecular acima de 900 Da. O receptor $P2X_7$ é responsável pela liberação de IL- β e indução da morte celular, a qual é controlada por uma família de proteases intracelulares conhecidas como caspases. O tratamento de células com ATP causa alterações necróticas típicas tais como a tumefação celular e a vacuolização do citoplasma. O núcleo das células tratadas com ATP, entretanto, revelou alterações apoptóticas como condensação da cromatina e marginalização. A inibição da atividade de caspase pelo inibidor zVAD não tem efeito sobre a morfologia citoplasmática, nem sobre a tumefação celular, nem sobre a vacuolização. Ao contrário, as alterações nucleares apoptóticas induzidas pelo ATP são completamente prevenidas por este inibidor (Ferrari et al., 1999).

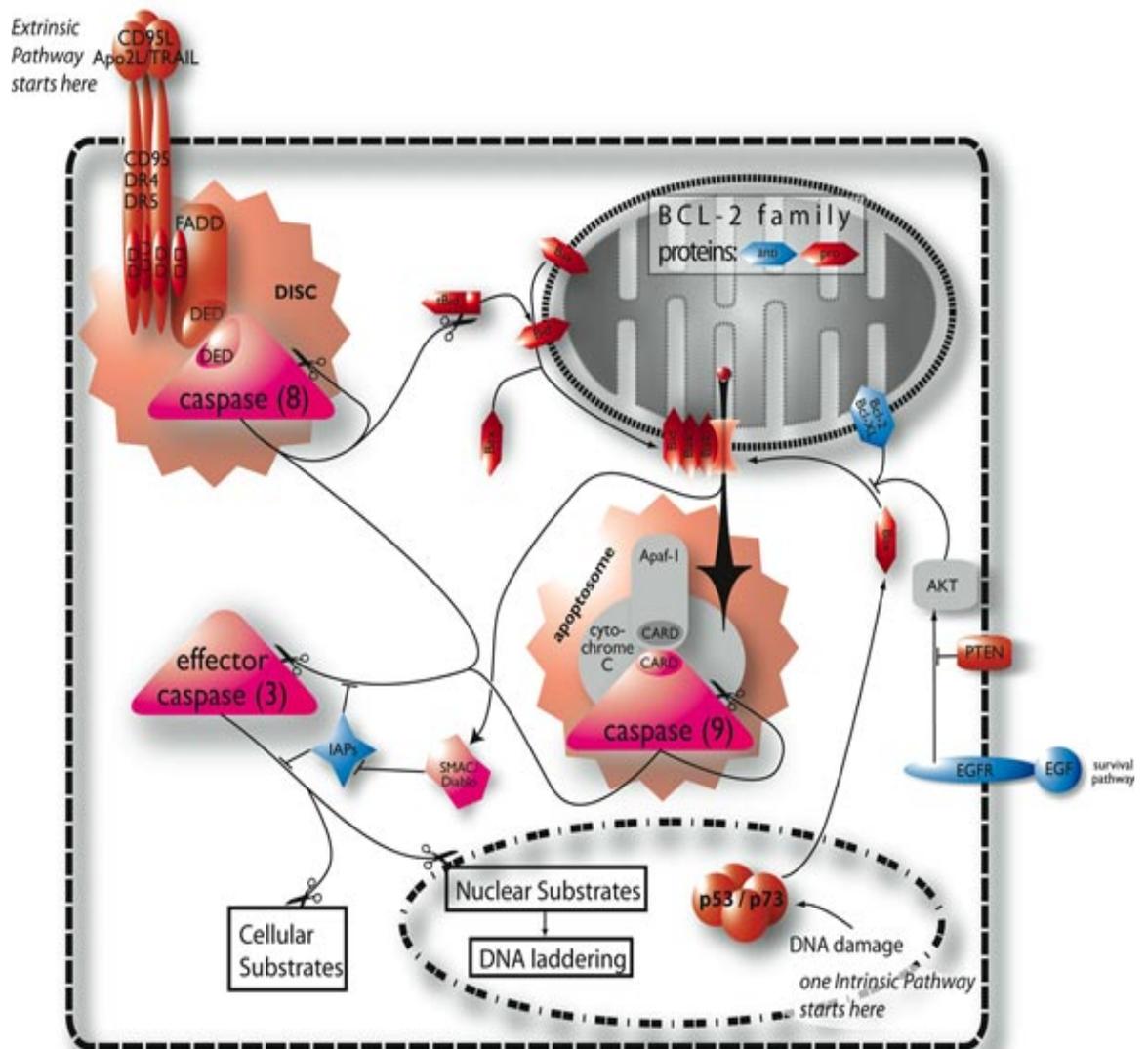


Figura 2. Vias de ativação da apoptose (<http://cancer.scienceboard.net/wp-media/2004>).

2.3. FUNÇÕES DA NTPDASE NAS CÉLULAS LINFÓIDES

A NTPDase1 é um membro da família E-NTPDase e foi identificada como o antígeno de superfície CD39 de células linfóides, sendo que o aumento de sua expressão leva a um aumento das atividades de ATPase e ADPase nestas células. O CD39 tem sido reconhecido como um marcador de ativação de linfócitos T (Kansas et al., 1991), e também como capaz de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (Maliszewski et al., 1994; Kacsmareck et al., 1996).

Tem sido sugerido que a NTPDase1 desempenha um importante papel no controle da função dos linfócitos (Filippini et al., 1990), incluindo reconhecimento do antígeno e/ou ativação de atividades efectoras das células T-citotóxicas. Alterações na atividade e distribuição desta enzima têm sido relatadas em várias condições patológicas (Bonan et al., 2001; Kittel et al., 2002; Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2005)

3. RESPOSTA IMUNE AO HIV

O HIV é um retrovírus conhecido como vírus da imunodeficiência humana, inicialmente isolado por Montagnier e colaboradores, em 1983-1984; foi denominado HIV-1, atualmente distribuído por todo o mundo (Sturm, 1988). Um outro vírus responsável pela SIDA ou AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) foi identificado em 1986; foi denominado HIV-2, tendo sido isolado na África Ocidental – Guiné Bissau, Costa do Marfim e Senegal, com alguns casos identificados nas Américas e Europa Ocidental (Clavel et al., 1986). Estudos epidemiológicos sugerem que o período de incubação da infecção pelo HIV-2 é maior do que para o HIV-1, havendo maior dificuldade de transmissão do HIV-2 quando comparado ao HIV-1 (Pepin et al., 1991).

Em 1987, apenas seis anos após o reconhecimento inicial da epidemia de SIDA e três anos após a identificação do agente etiológico, a zidovudina (2'-azido-3'-desoxitimidina [AZT]), o primeiro agente anti-retroviral, foi aprovado pela *US Food and Drug Administration* para tratamento da infecção pelo HIV. Tal infecção provoca um defeito adquirido na função imunológica, afetando particularmente a imunidade celular. Os indivíduos infectados podem ser assintomáticos ou apresentar doença progressiva associada a infecções oportunistas recorrentes, certos cânceres, acentuada perda de peso e degeneração do sistema nervoso central. Recentemente, houve mudança na

nomenclatura da doença associada ao HIV. Condições previamente descritas como *complexo relacionado à AIDS (ARC)* são, na atualidade, consideradas, em sua maior parte, sob a designação mais geral de infecção sintomática por HIV sem doença de definição de AIDS (Stites et al., 2000).

3.1. INFECÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE PELO HIV

As células que possuem o antígeno de superfície CD4 são suscetíveis à infecção pelo HIV-1, pois permitem a ligação da proteína de superfície viral gp120. Essa etapa é acompanhada pela ligação de moléculas co-receptoras importantes na célula (CCR5 ou CXCR4) e forma o domínio de fusão, permitindo a entrada do vírus na célula. Após sua entrada, o HIV perde seu envoltório, liberando seu RNA na célula. Este material nucléico pode sofrer processo de transcrição reversa e o cDNA, sintetizado e já duplicado, pode integrar-se ao DNA da célula. Quando esta célula é ativada, passa a produzir proteínas virais e, desta forma, novas partículas virais são liberadas da célula (Sturm, 1988; Stites et al., 2000; Ferreira e Ávila, 2001; Abbas et al., 2002).

3.2. MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO

Os mecanismos de defesa do hospedeiro incluem respostas celulares e humorais, sendo que a resposta imune adquirida inicial é caracterizada por uma expansão maciça de linfócitos T citotóxicos específicos para peptídeos derivados de proteínas do HIV, o que pode levar a uma redução da viremia. Há formação de anticorpos, principalmente contra glicoproteínas do envelope, mas estes anticorpos não são capazes de conter a ação do vírus (Abbas et al., 2002)

3.3. ATIVAÇÃO CRÔNICA, APOPTOSE E IMUNODEFICIÊNCIA

Durante alguns anos, acreditou-se que a imunodeficiência provocada pela infecção por HIV ocorria em função de uma depleção de célula T CD4⁺, devida ao efeito direto do vírus e associada a uma alta taxa de viremia. A proliferação compensatória de células T CD4⁺ não seria suficiente, o que comprometeria a função imune (Ho et al., 1995). No entanto, recentes observações sugerem que a depleção de células T CD4⁺ na AIDS está relacionada não só ao efeito direto do vírus, mas também à apoptose de um grande número de células T não infectadas chamadas “expectadoras – bystander”, que são atingidas por um estado de ativação crônica, processo conhecido como AICD (morte celular induzida por ativação) (Silvestri e Feinberg, 2003).

O HIV-1 é capaz de aumentar a expressão de Fas, mesmo em células CD4 não-infectadas, pela ligação cruzada das moléculas CD4 com suas proteínas do envelope viral gp120. Foi observado que durante oito semanas de terapia antirretroviral houve uma marcante redução da expressão de Fas em células T CD4⁺ e CD8⁺, não somente em pacientes que mostraram um aumento de células T CD4⁺, mas também em não-respondedores. Este fato pode ser resultante do declínio da quantidade de gp120 solúvel ou ligada à célula, a qual é associada com a apoptose de células T CD4⁺ em pacientes com infecção pelo HIV, provavelmente por uma regulação positiva da expressão do antígeno Fas e RNAm para Fas, mesmo em células T não infectadas. A regulação negativa da expressão de Fas depois do início da terapia anti-retroviral pode representar um decréscimo da ativação imune, ou por uma reduzida quantidade de antígenos virais ou por um aumento relativo de células T virgens (Aries et al., 1998).

A observação de que uma maior reposição de células T observada em indivíduos infectados pelo HIV pode refletir um aumento primário na proliferação de células T efetoras de memória, reforça o conceito de que a ativação imune crônica desempenha um importante papel na patogênese da AIDS e pode levar a algumas implicações.

Primeiro, a expansão de células efetoras de memória pode esgotar o estoque de células T virgens, o que reduziria a capacidade do sistema imune de gerar uma resposta primária a novos antígenos. Segundo, a expansão destas células de vida curta, não leva ao estabelecimento de um reservatório normal de células de memória verdadeiras, que poderiam proteger contra várias infecções (Wherry et al., 2003), inclusive contra a infecção pelo HIV. Terceiro, a expansão destas células efetoras pode gerar grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e pró-apoptóticas, que poderiam promover uma exagerada imunopatologia em células não-infectadas. E por último, a geração de grande quantidade de células T CD4⁺ ativadas fornece um fértil substrato para a replicação viral do HIV-1 (Migueles et al., 2002; Silvestri e Feinberg, 2003).

A enzima NTPDase1 é expressa na superfície de linfócitos, demonstrando seu estado de ativação e parece ser extremamente importante para as funções efetoras destas células. Uma vez que esta enzima está relacionada a funções exercidas por células que são responsáveis pela resposta imune, há necessidade de se estudar sua atividade em linfócitos humanos, durante o curso clínico de certas patologias que afetam a imunidade, tais como a infecção pelo HIV.

OBJETIVOS

Os nucleotídeos extracelulares desempenham importantes funções biológicas e estão sujeitos à hidrólise por ação de enzimas conhecidas como ecto-nucleotidases, tais como a NTPDase1. Vários trabalhos têm sido desenvolvidos com enzimas que degradam nucleotídeos e suas implicações em processos patológicos.

Sendo assim, este estudo teve por objetivos:

- I. Caracterizar a NTPDase1 em linfócitos humanos, determinando sua atividade através de um método simples, não-radioativo e de baixo custo.
- II. Determinar a atividade da NTPDase1 em linfócitos de pacientes imunodeprimidos por infecção pelo HIV-1 através de ensaio enzimático e verificar a expressão de CD39 na superfície de seus linfócitos, através de citometria de fluxo.
- III. Verificar o efeito das drogas anti-retrovirais sobre a atividade da NTPDase1 em linfócitos humanos, através de ensaios *in vitro*.

MANUSCRITOS

1. Artigo publicado

Artigo 1: Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes

Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects 1721 (2005) 9-15

2. Artigo publicado

Artigo 2: HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39 positive lymphocytes

Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Cell Research 1746 (2005) 129-134

3. Artigo submetido

Artigo 3: NTPDase1 activity in human lymphocytes is not affect by therapeutic doses of antiretroviral drugs

(Submetido à Clinica Chimica Acta)

Artigo 1: Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes

Daniela B.R. Leal, Cristiane A. Streher, Tiago N. Neu, Fábio P. Bittencourt, Claudio A.M.

Leal, José E.P. da Silva, Vera M. Morsch, Maria R.C. Schetinger

Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects 1721 (2005) 9-15

Artigo 2: HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39 positive lymphocytes

Daniela B.R. Leal, Cristiane A. Streher, Claudia de M. Bertoncheli, Luiz F.D. Carli, Claudio A.M. Leal, José E.P. da Silva, Vera M. Morsch, Maria R.C. Schetinger
(Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Cell Research 1746 (2005) 129-134)

Artigo 3: NTPDase1 activity in human lymphocytes is not affect by therapeutic doses of antiretroviral drugs

Daniela B R Leal, Cristiane A Streher, Claudio A M Leal, Claudia de M. Bertoncheli, Vera M Morsch, Maria R C Schetinger

(Submetido à Clinica Chimica Acta)

NTPDase activity in human lymphocytes is not affected by therapeutic doses of anti-HIV drugs

Daniela B R Leal^b, Cristiane A Streher^a, Claudio A M Leal^c, Claudia de M.

Bertoncheli^c, Vera M Morsch^a, Maria R C Schetinger^{a,*}

^a *Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil*

^b *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003. Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil*

* Corresponding author:

Maria Rosa Chitolina Schetinger

Fax: + 55-55322-08031

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil

e-mail: mariarosa@smail.ufsm.br

Keywords: NTPDase; anti-HIV drugs; human lymphocytes.

Type of paper: short communication

Abstract

Background: NTPDase-1 (EC 3.6.1.5) is an enzyme that hydrolyzes extracellular nucleoside tri- and/or diphosphates forming ATP that can serve as a substrate for an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) with liberation of adenosine, a modulator of vascular tone and inhibitor of platelet aggregation. Also occurs in lymphocytes playing important role in function immune. In this study was investigated if anti-HIV therapy could affect NTPDase activity in human lymphocytes.

Methods: Samples of lymphocytes were incubated with different concentrations of anti-HIV drugs and NTPDase activity was determined by colorimetric assay with quantification of inorganic phosphate liberated.

Results: There is not significant difference of NTPDase activity among samples with therapeutic doses of anti-HIV drugs tested when compared with controls.

Conclusions: NTPDase activity in peripheral human lymphocytes is not altered by anti-HIV therapy.

1. Introduction

Enzymes that hydrolyse extracellular nucleotides are known like ecto-nucleotidases, because they are anchored in cellular surface and their active site is turned to extracellular medium [1]. The NTPDase is an enzyme that hydrolyses extracellular nucleoside tri-and/or diphosphates (preferably ATP and ADP), showing Ca^{2+} or Mg^{2+} dependence, optimum activity in alkaline pH, and insensitivity to specific inhibitors of others ATPases and also to alkaline phosphatase and was previously determined by our group in different cells, as lymphocytes and platelets [2,3].

NTPDase activity occurs in lymphocytes from human peripheral blood, thymocytes and mouse spleen lymphocytes and its activity is higher in human B cells than in T cells [4]. Its possible association with immune diseases has been evaluated [5], taken in account that NTPDase activity could be used as an activation marker of lymphocytes during the immune response.

In the HIV infection, the immune response suffers severe disorders such as CD4 cell depletion as a consequence of an apoptotic process triggered by chronic cell activation that release ATP in the extracellular medium [6], which is substrate to NTPDase. Treatment of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) has become more promising, yet potentially more costly in recent years with the development of protease inhibitors. Such drug treatment protocols, together with reverse-transcriptase inhibitors have been found to suppress viral replication, increase production of CD4^+ cells, reduce morbidity, and prolong survival [7].

The aim of this study was to determine if anti-HIV drugs, which are used in protocols of treatment for patients infected with HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type 1), could affect NTPDase activity in human lymphocytes, in an attempt to use this activity, in the future, as a peripheral marker of immune function in HIV infection.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Nucleotides and Trizma base were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Patients

The sample consisted of healthy volunteers from the Hospital of the Federal University of Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil). All subjects gave written informed consent to participate in the study. The Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria approved the protocol under the number 13690. The group was carefully selected by clinical evaluation and consisted of individuals aged 35.1 ± 5.9 years, males and females who had not been submitted to any pharmacological treatment during the last thirty days. The volunteers were selected randomly for the different experiments, normally 3-5 subjects per experiment.

2.3. Isolation of mononuclear cells from human blood

Mononuclear leukocytes were isolated from human blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Hypaque density gradients as described by Böyum [8].

2.4. Preparation of drug solutions

Anti-HIV drug solutions were prepared according to individual dose administered to each 6 or 8 hours and concentration peak reached. The calculation was performed transforming the concentration peak in mM, which was considered as therapeutic dose, considering individual doses administered during the day and pharmacokinetic information. The drugs used were zidovudine, didanosine, lamivudine, nevirapine and

lopinavir. At therapeutic doses, the concentrations used were 2mM (zidovudine), 0.004mM (didanosine), 0.0065mM (lamivudine), 0.075mM (nevirapine) and 0.014mM (lopinavir). It was used an association of lopinavir and indinavir, but the calculation for solution was performed based only in lopinavir, because the indinavir function in low concentrations (in association) is to inhibit the lopinavir metabolism. In the curve, two concentrations above and two below the therapeutic dose were used.

2.5. Enzyme assays

After the isolation of mononuclear cells, NTPDase activity was determined by colorimetric assay in compliance with Leal et al. [2] The reaction medium contained 0.5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 at a final volume of 200 µL. Twenty microliters of intact mononuclear cells suspended on a saline solution were added to the reaction medium (2-4 µg protein) and preincubated for 10 min at 37°C. The reaction was started by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2 mM and stopped with 200 µL 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The samples were chilled on ice for 10 min before assaying for the release of inorganic phosphate (Pi) as described for Chan et al. [9], using malachite green as a colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. All samples were run in duplicate or triplicate and specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg protein according to our laboratory [2].

2.6. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard as described by Bradford [10].

2.7. Cellular integrity

The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was used as a marker of cell integrity. The measurement of LDH activity showed that most cells (approximately 85 %) were intact after the isolation procedure (data not shown). The integrity of the cells after incubation was confirmed by microscopic observations in control samples and samples with therapeutic doses (results not shown).

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test, considering a level of significance of 5%.

3. Results

ATP hydrolysis not was affected by the addition of zidovudine at any concentration tested. Also there were not significant alterations in the hydrolysis when didanosine or lamivudine were used. The same was observed in relation to ADP hydrolysis (data not shown).

Using concentrations of nevirapine, ATP hydrolysis was not significantly altered, but there is a tendency to an inhibition at higher concentration. Alterations were observed in ADP hydrolysis. Comparing with the control (29.5 nmol Pi/min/mg protein; SEM=2.6; n=6), the enzyme activity was significantly higher at a concentration of 0.06 mM nevirapine (42.1 nmol Pi/min/mg protein; SEM=8.0; n=6; $P<0.05$). The post-hoc of Tukey-Kramer revealed that this concentration is significantly different from the control and from the other concentrations tested. The same tendency can be observed in relation to ADP hydrolysis (Fig.1). Observing the addition of lopinavir to the reaction,

ATP hydrolysis was significantly higher at the higher concentration (1.4mM). The post-hoc of Tukey-Kramer showed that this group was different from the control (21.1 nmol Pi/min/mg protein; SEM=4.4; n=5 and 43.6 nmol Pi/min/mg protein; SEM=10.6; n=5; $P<0.05$, respectively). The same was observed with ADP hydrolysis when compared control and higher concentration (24.7 nmol Pi/min/mg protein; SEM=3.2; n=5 and 44.7 nmol Pi/min/mg protein; SEM=8.3; n=5; $P<0.05$, respectively) (Fig. 2).

4. Discussion

Our study shows that there is not significant alteration of NTPDase activity or ATP and ADP hydrolysis in human lymphocytes in the presence of therapeutic concentrations of anti-HIV drugs. The enzymatic determination was done through colorimetric assay standardized previously by our group [2] and the addition of drug solutions to the reaction medium. We believe that the enzymatic activity determined is an NTPDase-1 (EC 3.6.1.5; ecto-apyrase; CD39) due its properties in ATP and ADP hydrolysis rate and extracellular localization. Members of three groups used in anti-HIV protocols were tested: nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (zidovudine, didanosine and lamivudine), nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors (nevirapine) and protease inhibitors (lopinavir). The last two groups showed increased NTPDase1 activity at concentrations higher than those considered therapeutic. Probably, at high doses, these drugs facilitate the interaction between the substrate and the active site of the enzyme, once an increase in the enzymatic activity was observed.

These drugs, mainly protease inhibitors, have greater potency and are used when the viral load is high, CD4⁺ T cells are depleted and the patient has opportunist

infections, showing severe damage of the immune system. NTPDase activity is necessary for cytokine production, essential for the immune response to viral infections [11] and which can also indicate a chronic activation state of lymphocytes [12]. Once therapeutic doses of anti-HIV drugs did not alter NTPDase activity in lymphocytes, obtained from healthy subjects, we can suggest that, in the future, NTPDase could be used as a peripheral enzyme marker in patients treated with these anti-retroviral drugs.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- [1] Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001; 52:4-56.
- [2] Leal DBR, Streher CA, Neu TN et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1721:9-15.
- [3] Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2003; 2183:1-6.
- [4] Wang TF, Rosenberg PA, Guidotti G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol Brain Res* 1997; 47:295-302.
- [5] Leal DBR, Streher CA, Bertoncheli CM et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39 positive lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1746:129-134.
- [6] Canaday DH, Beigi R, Silver RF, Harding CV, Boom WH, Dubyak GR. ATP and control of intracellular growth of Mycobacteria by T cells. *Infect Immun* 2002; 70:6456-59.
- [7] Anderson KH, Mitchell JM. Differential access in the receipt of antiretroviral drugs for the treatment of AIDS and its implications for survival. *Arch Intern Med* 2000; 160:3114-20.
- [8] Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, Isolation on mononuclear cells by centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97:77-89.
- [9] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal Biochem* 1986, 157:375-380.

[10] Bradford MMA. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

[11] Kedzierska K, Crowe SM. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother* 2001; 12:133-50.

[12] Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution and biochemistry of human CD39: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol* 1991; 146:2235-44.

Figure Legends

Fig.1 Effect of different concentrations of nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors (nevirapine) on NTPDase activity from human lymphocytes with ATP (gray bar) or ADP (black bar) as substrate. Conditions are described in the Methods section. Data represent the mean of six different experiments. The activity was expressed as nmol Pi /min/mg protein. Points represent the mean \pm SEM for n=6 in triplicate. ^(a) Indicates a significant difference at $P<0.05$ between labeled column and control column (0 mM). ^(b) Indicates a significant difference between labeled column when compared to the column of nevirapine 0.6mM, ($P<0.05$ to 0.00006; $P<0.01$ to 0.06; $P<0.001$ to 0.0006 and 0.06).

Fig. 2. Effect of different concentrations of protease inhibitors (lopinavir) on NTPDase activity from human lymphocytes with ATP (gray bar) or ADP (black bar) as substrate. Conditions are described in the Methods section. Data represent the mean five different experiments. The activity was expressed as nmol Pi/min/mg protein. Points represent the mean \pm SEM for n=5 in triplicate. Indicates a significant difference between labeled columns when compared to the column of lopinavir 1.4mM ($P<0.01$ to 0.00014, 0.0014 and 0.014; $P<0.001$ to 0.14).

Fig. 1

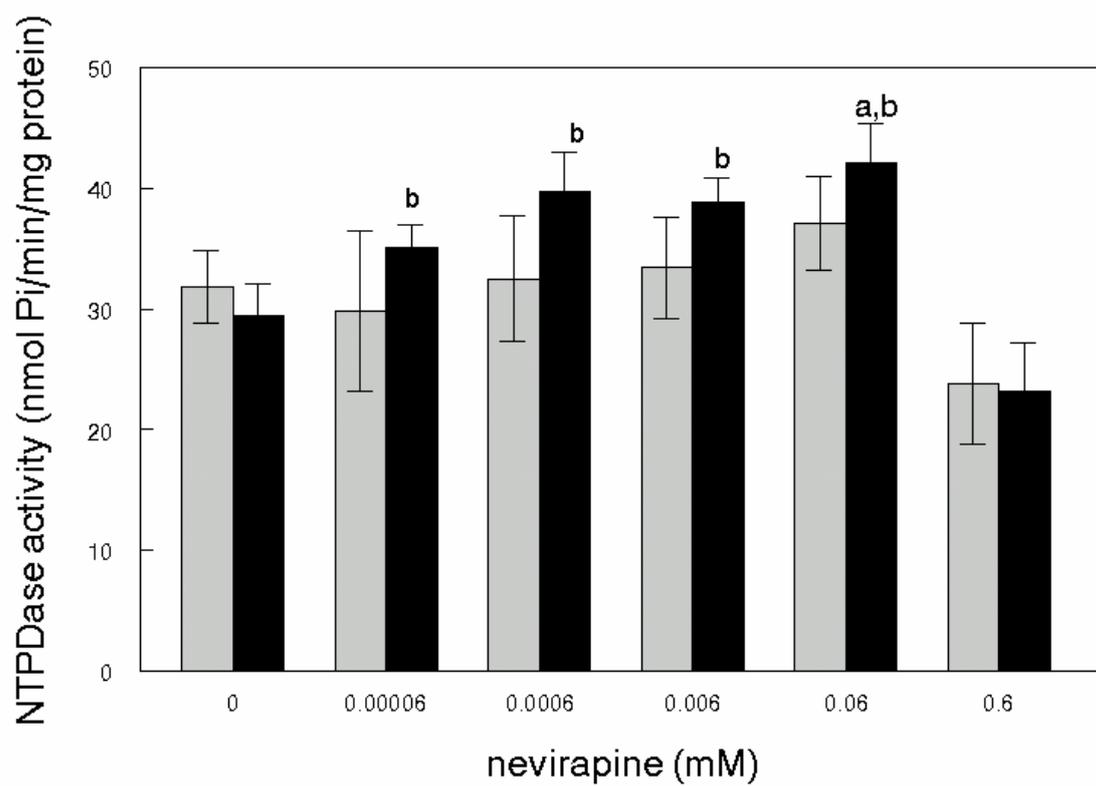
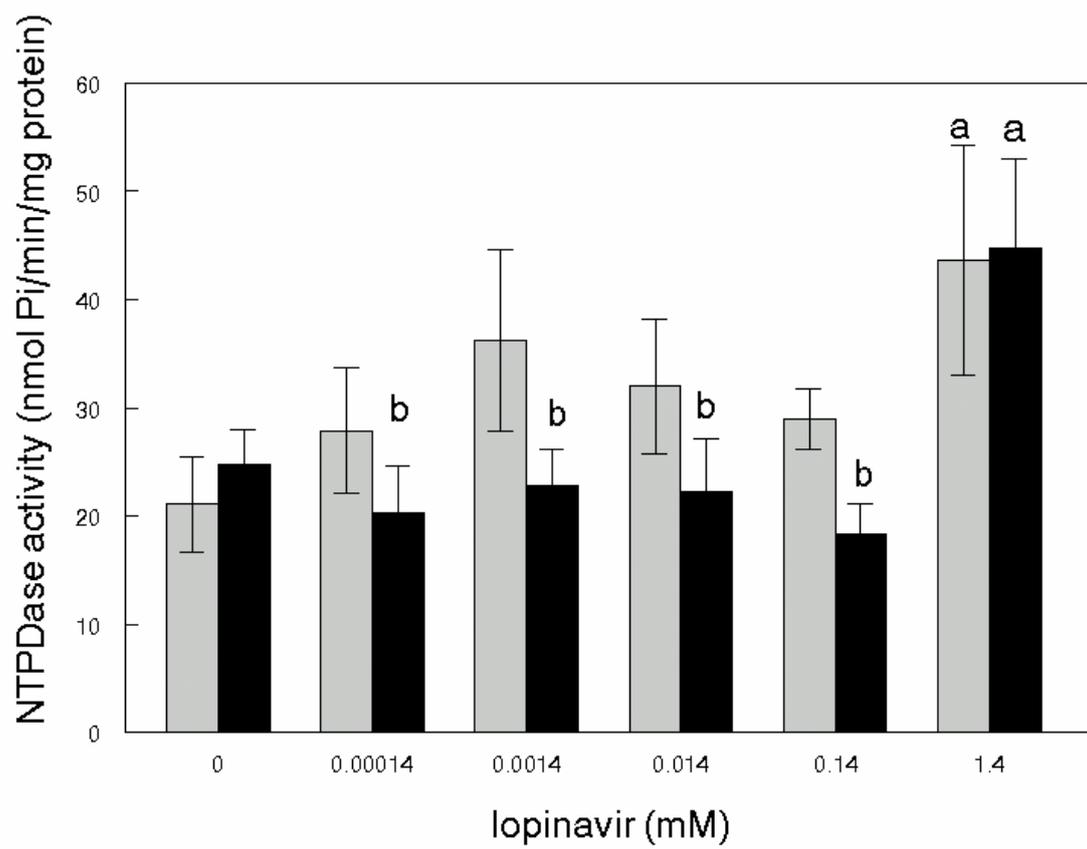


Fig.2



DISCUSSÃO

Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares possuem funções biológicas importantes mediadas pela ligação a receptores presentes nos tecidos. Os efeitos extracelulares de nucleotídeos foram inicialmente reconhecidos na contração da musculatura lisa, na neurotransmissão, na regulação da função cardíaca e na agregação plaquetária (Burnstock, 1997). Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma cascata enzimática que resulta na formação do respectivo nucleosídeo e liberação de um fosfato livre. Mais tarde, este nucleosídeo pode ser reciclado pelas células ao redor e novamente utilizado para ressíntese do nucleotídeo (Pastor-Anglada et al., 1998).

Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados ou podem ligar-se a purinoreceptores existentes na superfície das células, possuindo assim, propriedades biológicas, agindo na transdução de sinal e causando mudanças de permeabilidade da membrana em relação a cátions. A disponibilidade de anticorpos específicos para purinoreceptores tem permitido a investigação da modulação das respostas imune e inflamatória por purinas. O ATP extracelular, além de estar envolvido na morte celular, participa de respostas imunes como quimiotaxia, liberação de citocinas, fusão celular, proliferação, ativação de fatores de transcrição nucleares e morte de parasitas intracelulares (Di Virgilio et al., 2001b).

A interação do ATP extracelular com purinoreceptores do tipo P2X₇, por exemplo, é capaz de induzir a apoptose celular, formando um poro transmembrana e aumentando a concentração do cálcio intracelular. O receptor do subtipo P2X₇ tem características funcionais e farmacológicas semelhantes ao receptor previamente descrito como P2Z,

que é expresso em certos tipos de células transformadas desempenhando um importante papel na fagocitose pelos macrófagos, apoptose e degranulação de mastócitos (Weisman et al., 1997).

A enzima NTPDase1 tem sido caracterizada na superfície de vários tipos celulares humanos, incluindo células sanguíneas periféricas, como plaquetas, leucócitos e células endoteliais (Koziak et al., 1999). Há alguns anos tem sido identificada a atividade de enzimas que degradam nucleotídeos, na superfície de linfócitos, sendo observadas as atividades de ATPase, ADPase e AMPase nestas células. Sendo assim, a hidrólise de nucleotídeos parece ser essencial para a ativação e para as funções dos linfócitos (Dombrowski et al., 1998).

Primeiramente identificada como uma ATPase de linfócitos, na atualidade reconhece-se a presença de uma enzima capaz de hidrolisar tanto ATP quanto ADP. As pesquisas já realizadas demonstram que a hidrólise dos nucleotídeos por estas ectonucleotidases é essencial para várias funções imunes desempenhadas por estas células e para hidrolisar o ATP liberado no meio extracelular. O ATP extracelular pode levar à lise celular, fazendo com que várias células sanguíneas sejam destruídas. A presença deste nucleotídeo em altas concentrações pode induzir o início da cascata de reações bioquímicas que levariam à ativação de caspases com conseqüente apoptose celular. Os níveis séricos normais de ATP podem atingir concentrações micromolares, mas sob condições agudas, tais como o dano celular ou a secreção de linfócitos ativados, as concentrações locais podem atingir transitoriamente 1M, o que explicaria uma hidrólise aumentada deste nucleotídeo (Dombrowski et al., 1995).

No entanto, os linfócitos de rato, os clones de linfócitos T citotóxicos, os linfócitos de exudatos peritoniais e as células matadoras ativadas por linfocina podem ser insensíveis ao ATP. Neste caso, há especulações de uma possível participação de receptores de ATP na célula matadora, como uma rota alternativa ou paralela a de

perforina ou linfotóxina, o que sugere a participação do ATP na citotoxicidade mediada por células (Di Virgilio et al., 1989; Di Virgilio, 2001).

A NTPDase1, também reconhecida como CD39, marcador de superfície de linfócitos ativados, poderia estar relacionada à presença de outros marcadores celulares de ativação como CD69, CD25 e CD62L, sendo implicada no controle da função dos linfócitos, participando tanto da imunidade celular quanto da imunidade humoral. Constatou-se que a administração de IL-2 aumenta sua expressão em linfócitos, demonstrando o estado de ativação crônica destas células (Duesing et al., 1994). Os resultados aqui apresentados mostram uma maior expressão de CD39, com correspondente atividade de NTPDase aumentada em pacientes imunodeprimidos, quando comparadas com indivíduos imunocompetentes. O estado de ativação crônica destas células foi confirmado também pelo aumento na expressão de CD25, o que está de acordo com a literatura anteriormente citada.

Os linfócitos mantêm o ATP extracelular em níveis nanomolares, que representam um balanço entre ATP liberado e sua conseqüente hidrólise e/ou interconversão (Lazarowski et al., 2000; Yegutkin et al., 2002). Tem sido sugerido que este balanço pode ser mantido por duas vias opostas: a geração e o consumo de ATP, utilizando as enzimas NTPDase1, adenilato quinase (EC 2.7.4.3) e ecto-NDP quinase (EC 2.7.4.6), conjuntamente (Yegutkin et al., 2002).

O método aqui padronizado permitiu determinar a atividade da NTPDase1 em linfócitos humanos através da identificação colorimétrica do fósforo inorgânico liberado na reação, o que o torna um método de fácil realização e de baixo custo, que pode ser amplamente utilizado para pesquisa. Também foi demonstrado que, neste caso, a hidrólise de ATP e ADP pela enzima possui uma taxa molecular de aproximadamente 1:1, o que é coerente com a presença da NTPDase1. Todas as condições ideais de incubação estabelecidas e as propriedades cinéticas encontradas confirmam este fato.

Sua dependência de cátions como Ca^{2+} e Mg^{2+} foi confirmada pela inibição com EDTA e condições ótimas de incubação foram estabelecidas como pH alcalino de 8.0 e temperatura de incubação de 37°C , o que está de acordo com relatos anteriores de NTPDases em outros tecidos (LeBel et al., 1980; Battastini et al., 1991; Vieira et al., 2001). As associações enzimáticas foram excluídas pelo uso de inibidores de outras ATPases e foi demonstrada sua preferência por ATP e ADP como substrato. O fato de que um único sítio ativo da enzima está envolvido na reação foi confirmado por um experimento de competição, utilizando ATP e ADP como substrato em concentrações variáveis.

A hidrólise de ATP pela NTPDase é necessária para a secreção de citocinas de tipo 1 pelo linfócito T CD4^{+} , como IL-2 e $\text{IFN-}\gamma$, indispensáveis à continuidade da resposta imune celular e da ativação da resposta humoral. A redução da secreção de $\text{IFN-}\gamma$ se correlaciona positivamente com a contagem de linfócitos T CD4^{+} e negativamente com a carga viral em pacientes HIV-positivos (Bailer et al., 1999). A terapia anti-retroviral, incluindo inibidores da protease, aumenta significativamente a produção de $\text{IFN-}\gamma$, quando comparados a pacientes não tratados (Kelleher et al., 1999). Uma inversão do quadro onde há predomínio da secreção de citocinas do tipo 1 levaria à produção aumentada de citocinas tipo 2, como IL-4 e IL-10, que atuam na resposta humoral, além de produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e $\text{TNF-}\alpha$, as quais ativam a replicação do HIV-1, o que agravaria a imunossupressão (Kedzierska e Crowe, 2001).

A deficiência da produção de IL-2 é um dos primeiros defeitos imunológicos que podem ser demonstrados em indivíduos infectados pelo HIV (Kinter e Fauci, 1996). No caso da infecção pelo HIV, torna-se importante uma adequada resposta celular citotóxica, uma vez que os anticorpos produzidos não conseguem acompanhar as mutações deste retrovírus. A resposta mais importante ocorre em nível de linfócitos T

CD8⁺, que precisam ser ativadas pelas citocinas do tipo 1. A atividade desta célula citotóxica pode, com a evolução da infecção, se tornar falha, devido à perda de perforina e persistente expressão de CD27, indicando uma imaturidade celular, o que tornaria a célula incapaz de combater a infecção (Appay et al., 2000).

A patogênese da infecção pelo HIV implica em uma troca de secreção de citocinas Th1 para citocinas Th2, ou seja, a infecção pelo HIV em todos os estágios da doença está associada a um estado de ativação imune crônica e uma disfunção na produção de citocinas. Alguns autores (Zack et al., 1990; Esser et al., 1991; Sonza et al., 1996) sugeriram que citocinas e fatores de crescimento, que promovem diferenciação de células do sistema imune, podem modular tanto a infecção quanto à replicação do HIV-1. Os achados imunológicos, durante a infecção, incluem a depleção de linfócitos T CD4⁺ (a relação CD4:CD8 torna-se invertida), as respostas anormais de hipersensibilidade tipo tardia, o comprometimento das respostas proliferativas de células T e das respostas dos linfócitos citotóxicos (linfócitos T CD8⁺ ou células NK), que podem estar quantitativamente deficientes. Além disso, as respostas de células B originam baixos títulos de anticorpos neutralizantes, há formação de auto-anticorpos e um comprometimento moderado das respostas dos monócitos-macrófagos, os quais servem como reservatório viral (Stites et al., 2000).

Apesar de ser tóxico para as células, o ATP também é necessário para a manutenção da resposta imune, citotoxicidade como resposta ao vírus e produção de importantes citocinas do tipo 1, secretadas por linfócitos T CD4⁺ (Langston et al., 2003), relacionadas à resposta celular. Dessa forma, pode-se sugerir que o ATP extracelular deve ser mantido em uma faixa muito estreita de concentração, para manter as funções imunes dos linfócitos. Este equilíbrio deve ser mantido por duas vias opostas de consumo e geração de ATP. O consumo de ATP seria realizado pela hidrólise por parte da NTPDase1, com geração final de AMP. A hidrólise do ATP pela E-NTPDase é

necessária para a secreção de citocinas tipo 1 (IFN- γ , IL-2) pelo linfócito T CD4⁺, além do fato de que pode estar envolvida direta ou indiretamente na regulação do fluxo de cálcio, a qual é induzida pela ligação do antígeno aos receptores de células T. A adesão de células T e antígeno apresentado pela APC (célula apresentadora de antígeno) é suficiente para iniciar a ativação da célula T, mas a atividade da E-NTPDase é necessária para a secreção de citocinas pelo linfócito, como por exemplo, IFN- γ e IL-2 (Langston et al., 2003).

Como a atividade da 5'-ectonucleotidase não foi detectada por método colorimétrico em nossos experimentos, acredita-se que ela possa ter uma baixa atividade nestes pacientes, em concordância com relatos de Salazar-Gonzales e colaboradores (1985). Além disso, os efeitos da adenosina liberada por ação da 5'-ectonucleotidase neste tipo de infecção poderiam agravar o quadro, causando um decréscimo de IL-12, aumento de IL-10 e inversão de resposta Th1 para Th2.

Uma via oposta, sugerida por Yegutkin e colaboradores (2002), poderia estar sendo utilizada, regenerando o ATP através das enzimas adenilato quinase e NDP quinase. Dessa forma, sugere-se que a baixa atividade da 5'-ectonucleotidase em pacientes HIV-positivos, impediria a geração de adenosina, que também é tóxica para a célula por ligar-se em receptores purinérgicos P1, e que diminui a produção de citocinas importantes para a resposta celular, o que contribuiria para o estado de imunossupressão, devido à inversão na secreção de citocinas de Th1 para Th2.

Estas hipóteses sugerem que o ATP mantém as funções imunes dos linfócitos, desde que em concentrações adequadas, mesmo em pacientes imunodeprimidos, devido ao aumento de atividade da NTPDase1 aqui observado, indicando também seu estado crônico de ativação, com aumento de apoptose das células. O aumento desta atividade já foi verificado também em células B transformadas por Epstein Barr Vírus (Wang e Guidotti, 1996). Esta atividade aumentada foi confirmada neste trabalho pela

citometria de fluxo, a qual mostrou uma maior expressão de CD39 na superfície de linfócitos periféricos de pacientes HIV-positivos, quando comparados a indivíduos saudáveis.

Os pacientes imunodeprimidos pela infecção causada pelo HIV possuem sérias alterações no metabolismo das células imunes, incluindo alterações bioquímicas. Tem sido sugerido que a indução inapropriada de apoptose de células T está envolvida na perda contínua de células T CD4⁺ durante a infecção pelo HIV-1 (Samuelsson et al., 1997). O vírus provoca uma ativação imune extensiva e prepara os linfócitos para a apoptose. Um modelo no qual a presença de uma grande quantidade de vírus promove uma ativação imune contínua é também confirmado por estudos que mostram uma correlação positiva entre níveis de RNA do HIV-1 e marcadores de ativação imune, CD30, TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), e receptores para TNF- α (Bilello et al., 1996; Rizzardi et al., 1996)

O metabolismo dos nucleotídeos parece estar envolvido na resposta imune, o que provoca alterações ao nível de hidrólise destes nucleotídeos pela atividade de ectonucleotidases. O estado de ativação crônica dos linfócitos em resposta ao vírus HIV provoca apoptose dos linfócitos por ativação de caspases, com conseqüente liberação de ATP para o meio extracelular. Este ATP pode ligar-se a receptores P2X₇, desencadeando também a morte celular (apoptose). Evidências indicam que a apoptose insuficiente pode manifestar-se como câncer ou auto-imunidade, enquanto a morte celular acelerada é evidente em doenças degenerativas agudas ou crônicas, imunodeficiências e infertilidade (Danial e Korsmeyer, 2004). A morte programada da célula ou apoptose é um processo de deleção celular ativo, envolvido no desenvolvimento e manutenção da homeostasia de tecidos e órgãos (Samuelsson et al., 1997).

Dessa forma, sugerimos que a atividade aumentada da NTPDase1 em pacientes infectados pelo HIV seria um mecanismo de contenção das concentrações extracelulares de ATP, uma vez que o aumento da hidrólise do ATP poderia evitar mais danos em um sistema imune já comprometido. Além disso, serviria como um marcador de ativação crônica de linfócitos e este fato poderia levar à verificação de sua expressão em diferentes estágios da infecção, numa tentativa de validá-lo como marcador prognóstico.

A partir dos resultados encontrados de uma atividade aumentada de NTPDase1 em linfócitos de pacientes HIV-positivos, foi necessário verificar possíveis efeitos das drogas anti-retrovirais sobre a hidrólise de ATP e ADP, como por exemplo, uma ativação enzimática, uma vez que estes pacientes têm atividade maior que indivíduos saudáveis. Os experimentos *in vitro*, utilizando concentrações terapêuticas das drogas, mostraram que a atividade da enzima não é afetada pelos anti-retrovirais testados. Um aumento significativo de atividade só foi observado quando utilizadas algumas drogas inibidoras da transcriptase reversa, não análogas a nucleosídeos, e inibidores da protease, em concentrações consideradas como tóxicas. Nenhum efeito inibitório foi observado nos experimentos e drogas inibidoras da transcriptase reversa, análogas a nucleosídeos, não afetaram a atividade da NTPDase-1. Estes resultados reforçam a possibilidade de utilização da NTPDase-1 como um possível marcador prognóstico da infecção pelo HIV, desde que observados os estágios da infecção, a existência de infecções oportunistas e as condições do sistema imune.

CONCLUSÕES

I - Através dos experimentos aqui descritos, foi possível identificar a NTPDase1 (CD39) presente na superfície de linfócitos humanos e padronizar um método colorimétrico de baixo custo e fácil realização para a quantificação de sua atividade. Propriedades como hidrólise do ATP e ADP em taxas equivalentes, pH alcalino, dependência de cátions divalentes como cálcio e magnésio e uma baixa suscetibilidade a inibidores de ATPases, reforçam a constatação da existência desta enzima, já identificada em outros tecidos humanos. Além disso, a presença desta enzima em linfócitos humanos periféricos foi confirmada através de citometria de fluxo, a qual verificou uma baixa expressão de CD39 na superfície dos linfócitos de indivíduos saudáveis, o que deve estar relacionado a um baixo estado de ativação celular.

II - A enzima NTPase1 foi encontrada com sua atividade aumentada nos pacientes infectados pelo HIV; um aumento em torno de 40%, possivelmente com o objetivo de hidrolisar o ATP extracelular em excesso, evitando a morte celular por ativação de caspases em células não-infectadas. Esta observação foi confirmada pelo aumento na porcentagem de linfócitos que expressam em sua superfície CD39, verificado por citometria de fluxo, quando comparados aos de indivíduos saudáveis.

III - A verificação dos efeitos *in vitro* de algumas drogas anti-retrovirais, bastante utilizadas nos protocolos de tratamento, mostrou que o aumento da atividade da NTPDase1 em linfócitos de pacientes HIV-positivos não é devido a um efeito destas drogas, quando utilizadas em suas doses terapêuticas.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 2ªed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994; 64:445-75.

Airas L. Purinergic signaling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 1998; 78:113-45.

Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A et al. HIV-specific CD8⁺ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000; 192:63-75.

Araújo MC, Morsch A, Zanin R, Bauchspiess R, Rocha JB, Morsch VM et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740:421-426.

Aries SP, Weyrich K, Schaaf B, Hansen F, Dennin RH, Dalhoff, K. Early T-cell apoptosis and Fas expression during antiretroviral therapy in individuals infected with human immunodeficiency virus-1. *Scand J Immunol* 1998; 48:86-91.

Bailer R, Holloway A, Sun J, Margolick J, Martin M, Kostman J et al. IL-13 and IFN-gamma secretion by activated T cells in HIV-infection associated with viral suppression and a lack of disease progression. *J Immunol* 1999; 162:7534-42.

Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:67-70.

Battastini AM, Rocha JB, Barcellos CK, Dias RD, Sarkis JJ. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res* 1991; 16:1303-10.

Biederbick A, Rose S, Elsässer HP. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 1999; 112:273-84.

Bigonnesse F, Lévesque SA, Kulkuski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, et al. cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 2004; 43:5511-19.

Bilello JA, Stellrecht K, Drusano GL, Stein DS. Soluble tumor necrosis factor-alpha receptor type II (sTNF-alpha-RII) correlates with human immunodeficiency virus (HIV) RNA copy number in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 1996; 173:464-67.

Bonan CD, Schetinger MR, Battastini AM, Sarkis JJ. Ectonucleotidases and synaptic plasticity: implications in physiological and pathological conditions. *Drug Dev Res* 2001; 52:57-65.

Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 1994; 371:519-23.

Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signaling molecules. *Neuropharmacology* 1997; 36:1127-39.

Chen C-C, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 1995; 377:428-31.

Christensen LD, Andersen V, Ryder L. Decreased number of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) molecules on lymphocytes from patients with primary immunoglobulin deficiencies. Correlation between number of CD73 molecules and T-lymphocyte function in vitro. *Scand J Immunol* 1996; 44:62-70.

Christensen LD. CD73 (ecto-5'-nucleotidase) on blood mononuclear cells. Regulation of ecto-5'-nucleotidase activity and antigenic heterogeneity of CD73 on blood mononuclear cells from healthy donors and from patients with immunodeficiency. *APMIS* 1997; 105:5-28.

Christoforidis S, Papamarcaki T, Galaris D, Kellner R, Tsolas O. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur J Biochem* 1995; 234: 66-74.

Clavel F, Guetard F, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MJ et al. Isolation of new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233:343-6.

Coleman JE. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992; 21:41-83.

Connor J, Sawczuk IS, Benson MC, Tomashefsky P, O'Toole KM, Olsson CA et al. Calcium channel antagonists delay regression of androgen-dependent tissues and suppress gene activity associated with cell death. *Prostate* 1988; 13:119-30.

Coppola A, Coppola L, dalla Mora L, Limongelli FM, Grassia A, Mastrolorenzo L et al. Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. *J Appl Physiol* 2005; 98:1414-19.

Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994; 76:5-13.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-19.

Di Virgilio F, Bronte V, Collavo D, Zanovello P. Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *J Immunol* 1989; 143:1955-60.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97:587-600.

Di Virgilio F, Borea PA, Illes P. P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol Sci* 2001b; 22:5-7.

Dombrowski K, Ke Y, Brewer KA, Kapp JA. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev* 1998; 161:111-18

Dombrowski KE, Ke Y, Kapp JA. Role of ecto-ATPase in lymphocyte function. *Ecto-ATPases*. Edited by Plesner et al., Plenum Press, New York, 1997.

Dombrowski KE, Ke Y, Thompson JA, Kapp JA. Antigen recognition by CTL is dependent upon ectoATPase activity. *J Immunol* 1995; 154:6227-37.

Duensing S, Kirshner H, Atzpodien J. CD39 as a novel marker of in vivo immune activation. *Blood* 1994; 83:3826-27.

Edwards NL, Magilavy DB, Cassidy JT, Fox LH. Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase deficiency in agammaglobulinemia. *Science* 1978; 201:628-30.

Esser R, von Briesen H, Brugger M, Ceska M, Glienke W, Muller S et al. Secretory repertoire of HIV-infected human monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1991; 59:219-22.

Evans RJ, Surprenant A, North RA. P2X receptors. In: Turner JT, Weisman GA, Fedan JS, editors. *The P2 Nucleotide Receptors*. Totowa, NJ: Humana Press; 1998; p.43-61.

Fernley HN. Mammalian alkaline phosphatases. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*. Academic Press, New York, 1971, p. 417-47.

Ferrari D, Los M, Bauer MK, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett*. 1999; 47:71-75.

Ferreira AW, De Ávila SL. Diagnóstico laboratorial: avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes. Correlação clínico-laboratorial. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Filippini A, Taffs RE, Sitkovsky MV. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. Proc Natl Acad Sci 1990; 87:8267-71.

Fishman RF, Rubin AL, Novogrodsky A, Stenzel KH. Selective suppression of blastogenesis induced by different mitogens: effect of noncyclic adenosine-containing compounds. Cell Immunol 1980; 54:129-39.

Goding JW, Grobber B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. Biochim Biophys Acta 2003; 1638:1-19.

Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). Biochem Biophys Res Commun 1996; 218:916-23.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature 1995; 373:123-6.

Ikehara S, Pahwa RN, Lunzer DG, Good RA, Modak MJ. Adenosine 5'-triphosphate (ATP)-mediated stimulation and suppression of DNA synthesis in lymphoid cells, I: characterization of ATP responsive cells in mouse lymphoid organs. J Immunol 1981; 127:1834-38.

Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR et al. Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. J Biol Chem 1996; 271:33116-22.

Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution and biochemistry of human CD39: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol* 1991; 16:2235-44.

Kedzierska K, Crowe SM. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother* 2001; 12:133-50.

Kelleher A, Sewell W, Cooper D. Effect of protease therapy on cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:147-52.

Kinter A, Fauci A. Interleukine-2 and human immunodeficiency virus infection: pathogenic mechanisms and potential for immunologic enhancement. *Immunol Res* 1996; 15:1-15.

Kittel A, Garrido M, Varga G. Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:549-55.

Koziak K, Sévigny J, Robson SC, Siegel JB, Kacsmarek E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost* 1999; 82:1538-44.

Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp J. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 2003; 170:2962-70.

Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem* 2000; 275:31061-68.

Leal DB, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CA, Silva JE et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5.) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1721:9-15.

LeBel D, Poirier GG, Phaneuf S, St-Jean P, Laliberté JF, Beaudoin AR. Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. *J Biol Chem* 1980; 255:1227-33.

Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch VM, Mazzanti CM et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2003; 2183:1-6.

Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* 1994; 153:3574-83.

Mateo J, Harden TK, Boyer JL. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br J Pharmacol* 1999; 128:396-402.

Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian M, Rabin R, Hallahan CW et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 2002; 3:1061-68.

Miras-Portugal MT, Gualix J, Pintor J. The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. *FEBS Lett* 1998; 430:78-82.

Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST, Ford JE. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J Biol Chem* 1999; 274:20064-67.

Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267:1449-56.

North RA. Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8:474-83.

Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414:916-20.

Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10:281-5.

Pastor-Anglada M, Felipe A, Casado FJ. Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19:424-30.

Pepin J, Morgan G, Dunn D, Gevao S, Mendy M, Gaye I et al. HIV-2 induce immunosuppression among asymptomatic West African prostitutes: evidence that HIV-2 is pathogenic but less so than HIV-1. *AIDS* 1991; 5:1165-72.

Picher M, Boucher RC. Biochemical evidence for an ecto alkaline phosphodiesterase I in human airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:255-61.

Picher M, Sévigny J, D'Orléans-Juste P, Beaudoin AR. Hydrolysis of P_2 -ourinoceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:1453-60.

Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996; 6:225-30.

Plesner L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 1995; 158:11-214.

Podack ER, Young J, Cohn ZA. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T cell granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:8629-33.

Ravelic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50:413-92.

Resta R, Thompson LF. T cell signalling through CD73. *Cell Signal* 1997; 9:131-9.

Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 1998; 161:95-109.

Rizzardi GP, Barcellini W, Tambussi G, Lillo F. Plasma levels of soluble CD30, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors during primary HIV-infection – correlation with HIV-1 RNA and clinical outcome. *AIDS* 1996; 10:45-50.

Rosi F, Carlucci F, Marinello E, Tabucchi A. Ecto-5'-nucleotidase in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Pharmacother* 2002; 56:100-4.

Salazar-Gonzales JF, Moody DJ, Giorgi JV, Martinez-Maza O, Mitsuyasu RT, Fahey JL. Reduced ecto-5'-nucleotidase activity and enhanced OKT10 and HLA-DR expression on CD8 (T suppressor/cytotoxic) lymphocytes in the Acquired Immune Deficiency Syndrome: evidence of CD8 cell immaturity. *J Immunol* 1985; 135:1778-85.

Samuelsson A, Broström C, van Dijk N, sonnerborg A, Chiodi F. Apoptosis of CD4+ and CD19+ cells during human immunodeficiency virus type 1 infection – correlation with clinical progression, viral load and loss of humoral immunity. *Virology* 1997; 238:180-188.

Schetingner MR, Bonan CD, Schierholt R, Webber A, Arteni N, Emanuelli T et al. Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: a possible link between preconditioning and adenosine production. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 1998; 7:281-6.

Shi JD, Kukar T, Wang CM, Li QZ, Cruz PE, Davoodi-Semironi A et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J Biol Chem* 2001; 276:17474-78.

Silva WD, Mota I. Bier: *Imunologia Básica e Aplicada*. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

Silvestri G, Feinberg, MB. Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J Clin Invest* 2003; 112:821-24.

Smith TM, Kirley TL. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1386:65-78.

Sonza S, Maerz A, Deacon N, Meanger J, Millis J, Crowe S. Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol* 1996; 70:3863-69.

Stites DP, Terr, AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

Sturm J. HIV serology: a review. *Rev Bra Pat Clin* 1988; 24:127-41.

Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A et al. A new class of ligand-gated ion channels defined by P2X receptors for extracellular ATP. *Nature* 1994; 371:516-19.

Vieira VP, Rocha JB, Stefanello FM, Balz D, Morsch VM, Schetinger MR. Heparin and chondroitin sulfate inhibit adenine nucleotide hydrolysis in liver and kidney membrane enriched fractions. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 1193-1201.

Wang TF, Guidotti G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase. *J Biol Chem* 1996; 271:9898-9901.

Wang TF, Guidotti G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J Biol Chem* 1998; 273:11392-99.

Weisman GA, Turner JT, Clarke LL, Gonzales FA, Otero M, Garrad RC et al. P2 nucleotide receptor structure and function. In: *Ecto-ATPases: recent progress on structure and function*. Edited by Plesner et al. Plenum Press, New York, 1997.

Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TL, Masopust D, Kaech SM, Antia R et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 2003; 4:225-34.

White MP. Hypophosphatasia: nature's window on alkaline phosphatase function in man. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. *Principles of Bone Biology*. San Diego, 1996: Academic Press. p.951-68.

Wyllie AH, Morris RG, Smith A, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142:67-77.

Yegutkin GG, Henttinen T, Samburski SS, Spychala J, Jalkanen S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J* 2002; 367:121-128.

Young JD, Hengartner H, Podack ER, Cohn ZA. Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* 1986; 44:849-59.

Zack J, Arrigo S, Weitsman S, Go A, Haislip A, Chen I. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990; 61:213-22.

Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, Young JD. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* 1991; 112:279-88.

Zimmermann H, Braun N. Ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res* 1999; 120: 371-85.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001; 52:44-56.

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol 2000; 362:299-309.

ANEXOS

ANEXO 1**LISTA DE TABELAS****PARTE II – CAPÍTULO 1**

Tabela 1.1-Effects of inhibitors on ATP and ADP hydrolysis by human lymphocytes.....	24
Tabela 1.2-Specificity of NTPDase from human lymphocytes.....	24

ANEXO 2**LISTA DE FIGURAS****PARTE I – INTRODUÇÃO**

Figura 1. Topografia das ectonucleotidases	05
Figura 2. Vias de ativação da apoptose.....	13

PARTE II - CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Effect of temperature on NTPDase activity from human lymphocytes with ATP or ADP as substrate.....	23
Figura 1.2. Effect of pH on NTPDase activity from human lymphocytes with ATP or ADP as substrate.....	23
Figura 1.3. Lineweaver-Burk for ATP and ADP hydrolysis and the inset with V versus S	24
Figura 1.4. NTPDase Chevillard plot.....	24
Figura 1.5. Histogram of two-color analysis of CD39 on lymphocytes illustrating a normal subject.....	25

PARTE II - CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Box-whisker-plot of NTPDase activity in lymphocytes from healthy control individuals and HIV-positive patients.....	31
Figura 2.2. Box-whisker-plot of CD39 expression on lymphocytes from healthy control individuals and HIV-positive patients.....	32
Figura 2.3. Histogram of two-color analysis of CD39 and CD25 on lymphocytes illustrating a normal subject and a HIV-positive patient.....	32

PARTE 2 - CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Effect of different concentrations of nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors (nevirapine) on NTPDase activity from human lymphocytes with ATP or ADP as substrate..... 47

Figura 3.1. Effect of different concentrations of protease inhibitors (lopinavir) on NTPDase activity from human lymphocytes with ATP or ADP as substrate..... 48

ANEXO 3



PERMISSÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – TÍTULO

ATIVIDADE DA ENZIMA APIRASE EM LINFÓCITOS DE INDIVÍDUOS IMUNOCOMPETENTES E DE PACIENTES COM SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

2 – OBJETIVOS

- 2.1. Verificar a atividade das enzimas em pacientes voluntários sadios, determinando os seus valores normais em linfócitos.
- 2.2. Verificar a atividade da enzima apirase e em linfócitos de humanos imunodeprimidos, portadores do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) e compará-la com pacientes não infectados.
- 2.3. Verificar se há um valor prognóstico na determinação desta enzima, quando comparadas ao comprometimento do sistema imunológico dos pacientes (clínica do paciente).

3 – REGISTRO

O estudo será desenvolvido no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do CCS e no Laboratório de Enzimologia Toxicológica do Departamento de Química do CCNE (UFSM), com adesão voluntária de indivíduos sadios e de pacientes HIV-positivos vinculados ao ambulatório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Santa Maria (UFSM). Esse estudo voluntário obteve a aprovação junto a Comissão de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFSM.

4 – PROCEDIMENTOS

Os pacientes serão submetidos a punção venosa. O material biológico, sangue total, será destinado para determinações de atividade enzimática.

5 – RISCOS DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação aos participantes, pois não será realizado nenhum procedimento além daquele usado de rotina para punção venosa. Os pacientes que voluntariamente se submeterem à

punção venosa, poderão, em caso de acidentes de coleta, desenvolver flebite, flebotrombose, hematoma local, petéquias. Nestes casos serão prontamente atendidos e medicados no HUSM.

6 – ESTOCAGEM DE AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue que sobrarem dos testes serão descartadas, obedecendo as normas de biosegurança em vigor pela legislação.

7 – PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A participação dos pacientes nesse estudo é livre e voluntária, não haverá nenhuma forma de compensação financeira e também não haverá custos de sua parte que seja realizado o estudo. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo, assim como, não comprometerá o cuidado médico do paciente.

8 – CONFIDENCIALIDADE

A sua identidade permanecerá em sigilo. Os registros do prontuário também serão confidenciais e, sob a responsabilidade do HUSM, conforme legislação vigente.

Local para contato: Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria – Setor de Carga Viral; telefone 55 220 8560; responsável técnica: Daniela Leal.

9 – IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____

Identidade: _____

Assinatura – Pesquisador

Assinatura– Paciente

ANEXO 4

Errata enviada à revista, referente ao artigo 1:



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL**

**To Executive Editors
C.G. Gahmberg and S.S. Krag
bbagen@elsevier.com**

June, 2005

Dear Editors,

After the publication of our article “Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-pyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39 EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes”, published on BBA 1721 (2005) 9-15, we observed some errors. Thus, if possible, we want to make an erratum to this manuscript, as follow:

Page 12: Figure 4, the correct value of X axes is 1.0 instead 2.00

Page 12: Legend of the Figure 4, third line, the correct phrase is “The incubation time was 100 min; substrate A (ATP) at $P=0$ was 0.2 mM; substrate B (ADP) at $P=1$ was 0.2 mM.

Page 13: 3.6. Substrate specificity, second paragraph, line 8, the correct phrase is: “Then a sequence of mixtures with different concentrations of ATP (0 to 0.2 mM) and ADP (0 to 0.2 mM) on $P=0$ and $P=1$, respectively, was prepared.

Thank you for your time and attention.

Sincerely yours,

Dr. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Departamento de Química

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

97105-900 Santa Maria RS

Brazil

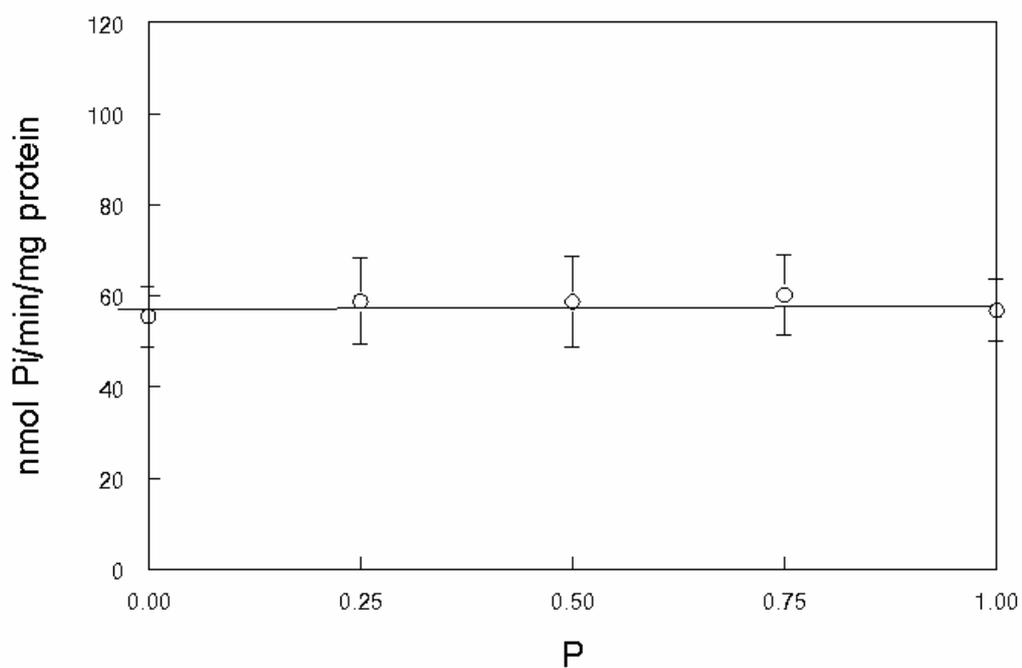


Fig.4. NTPDase Chevillard plot. The concentration at which the velocities were the same for ATP and ADP was chosen for the Chevillard plot. The assay conditions are described in Methods. The incubation time was 100 min; substrate A (ATP) at P=0 was 0.2 mM; substrate B (ADP) at P=1 was 0.2 mM. Data represent the mean \pm SEM for least three experiments.

ANEXO 5

Locais onde foram desenvolvidos os experimentos:

- Coleta das amostras: Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria.
- Determinação da atividade da NTPDase1: Laboratório de Pesquisa do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSM; Laboratório de Enzimologia do Departamento de Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas da UFSM.
- Citometria de fluxo e determinações hematológicas: Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria; Laboratório de Imunologia de Transplantes do Complexo Hospitalar Santa Casa – Porto Alegre.