

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

**EFEITO DO LPS SOBRE AS NUCLEOTIDASES:
UMA ABORDAGEM SOBRE A HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS**

FERNANDA CENCI VUADEN

Orientadora:

Prof. Dra. CARLA DENISE BONAN

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

Porto Alegre

2006

Aos meus pais, que são a essência da minha vida

Agradecimentos

Ao Valeri e todo o pessoal do ratário, com certeza, sem a presteza deles esse trabalho não teria sido realizado;

Aos seguranças que tornaram meus momentos de trabalho mais tranquilos;

Ao pessoal da limpeza, sempre muito quietos, mas sempre muito prestativos;

À Lucimara que sempre deixava tudo pronto quando eu precisava;

À Cléia sempre solícita e me salvando dos apuros;

Às meninas do 22: Alessandra (Japa), Andressa, Elizandra, Joséli, Luci, Vanessa;

Às meninas do 24: Andréia, Bárbara, Daniela, Daniele, Denise, Sandra, Vanessinha;

Foi maravilhoso poder conviver com vocês e conhecê-las melhor;

Ao Jean, o menino do lab!

À Ale Bruno, pelas nossas intermináveis e adoráveis conversas sobre Cleópatra e Arte Antiga;

À Rô, por ser um exemplo tão lindo a ser seguido;

À Gi, pelo grande auxílio, foste essencial para a realização deste trabalho, tanto pela ajuda nos experimentos, quanto pelo grande incentivo! Mas agradeço, principalmente, pela grande amizade! Que dure para sempre, pois tenho muito orgulho em ser amiga de uma roqueira tão linda!

À Cris, que foi quem me inseriu no contexto do laboratório, me ensinou os macetes e sempre foi uma grande companheira de trabalho e uma grande amiga. Obrigada pelas conversas maravilhosas, pelos ótimos conselhos! Admiro-te muito, és muito especial para mim!

Ao professor Sarkis que me recebeu tão bem no laboratório, sempre me ajudando a resolver meus problemas referentes à linearidade das reações, sempre tão querido comigo, fazendo eu me sentir tão bem no laboratório;

À professora Ana Batastini que sempre foi muito simpática e atenciosa;

A todo o pessoal do laboratório de Pesquisa em Bioquímica da PUCRS: Denis, Dudu Rico, Carol, Eliane, Elisa, Kelly, Marcelo, Mário – vocês sempre foram e vão continuar sendo muito importantes na minha vida, tanto acadêmica quanto pessoal;

Ao professor Maurício, que foi quem me apresentou o maravilhoso mundo bioquímico e me convidou para trabalhar em um grupo de pesquisa, muito obrigada pelo incentivo e valorização;

À professora Graça, que sempre iluminou o laboratório com sua aura e humor maravilhosos;

Aos psiquiatras do laboratório, Dioguinho e Guisolfi, sempre prontos para analisarem a turma;

Ao professor Renato, que foi essencial na minha carreira científica, sempre disposto a me ouvir, me ajudar... Chegou até a ser meu IC, por um curtíssimo período de tempo, mas foi! Sem o seu apoio talvez não estivesse escrevendo esses agradecimentos hoje...

Muito obrigada por acreditar em mim!

Às minhas irmãs de coração:

Nati, que está ao meu lado há mais de vinte anos, que dividiu uma avó maravilhosa comigo e, mesmo não nos vendo com muita frequência, está sempre presente na minha vida;

Carol, que foi minha grande companheira de faculdade, que está sempre ao meu lado, que sempre me deu forças para seguir adiante nos momentos difíceis, que sabe que mora no meu coração;

Dani e Dora, nossa, é difícil falar delas, pois são tão essenciais para mim que é difícil expressar o que sinto por elas, mas elas sabem, todo mundo sabe, que sem elas ao meu lado eu não teria crescido a metade do que cresci durante esses anos todos de amizade, cada uma ao seu jeito acrescenta muito na minha vida...

Aos meus pais, Gema e Myron, que são pessoas tão maravilhosas que agradeço a Deus todas as noites por ter me permitido a alegria de ser filha deles, espero que quando tiver meus filhos, tenha a capacidade de ensinar a eles pelo menos metade do que me ensinaram! Amo vocês mais do que tudo!

E, é claro, à Carlinha, minha orientadora, que além de ser uma excelente profissional, é uma pessoa fabulosa, talvez nunca consiga retribuir tudo o que ela fez por mim, mas quero expressar neste agradecimento todo o meu carinho e admiração por esta pessoa indescritível, linda por dentro e por fora! Obrigada por ter me orientado tão bem, por ter me acompanhado nessa etapa tão importante da minha vida, por ser tão especial para mim!

Índice

Parte I

I.1. Resumo.....	02
I.2. Abstract.....	03
I.3. Lista de Abreviaturas.....	04
I.4. Introdução	
I.4.1. Sepses.....	05
I.4.1.1. Lipopolissacarídeo (LPS).....	06
I.4.1.2. Agregação Plaquetária Durante Inflamação/Sepses.....	08
I.4.2. Sistema Purinérgico.....	10
I.4.2.1. Receptores Purinérgicos.....	10
I.4.2.2. ATP.....	11
I.4.2.3. ADP.....	12
I.4.2.4. Adenosina.....	13
I.4.2.5. Nucleotidasas.....	15
I.5. Objetivos.....	19

Parte II

II.1. Capítulo 1 – <i>Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats</i>	21
II.2. Capítulo 2 – <i>Effects of lipopolysaccharide on nucleotide hydrolysis in platelets of rats</i>	46

Parte III

III.1. Discussão	
III.1.1. Considerações Gerais.....	59
III.1.2. Lipopolissacarídeo altera as atividades nucleotídicas em linfócitos e soro de ratos.....	60
III.1.3. Efeito do lipopolissacarídeo na hidrólise de nucleotídeos em plaquetas de ratos.....	65
III.2. Conclusões Gerais.....	67
III. 3. Perspectivas.....	69
Referências Bibliográficas	70
Anexos	83

Parte I

I.1. Resumo

Os nucleotídeos extracelulares são importantes moléculas sinalizadoras, sendo essenciais para o início e manutenção de reações inflamatórias. Estão envolvidos no recrutamento de leucócitos e mastócitos ao sítio inflamatório, na ativação da vasculatura e no prolongamento da ativação inflamatória. Durante o processo inflamatório, o ATP exerce uma série de efeitos. Está envolvido no desenvolvimento da inflamação por um conjunto de ações combinadas: liberação de histaminas de mastócitos, provocando produção de prostaglandinas e produção e liberação de citocinas de células do sistema imune. A adenosina é um potente mensageiro extracelular e tem sido demonstrado que sua produção é aumentada em condições metabólicas desfavoráveis. Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas localizadas nas membranas celulares ou presentes na forma solúvel no meio intracelular e/ou extracelular. Assim, as ectonucleotidases desempenham um importante papel no controle da homeostasia dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Estas enzimas estão ancoradas na membrana plasmática e possuem seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Entre elas, pode-se destacar a família das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPases), a família das ecto-pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e a ecto-5'- nucleotidase. Considerando-se o papel pró-inflamatório do ATP e que a adenosina pode atuar como um imunomodulador, neste estudo foi avaliado o efeito *in vitro* e *in vivo* do lipopolissacarídeo sobre as ectonucleotidases de linfócitos e plaquetas e as formas solúveis presentes em soro. Nos resultados *in vitro*, observamos um aumento na hidrólise dos nucleotídeos em linfócitos e na hidrólise de ADP e AMP em plaquetas. Em soro, ocorreu uma diminuição da atividade da NPP. *In vivo*, observamos um aumento na hidrólise dos nucleotídeos em linfócitos e um decréscimo na hidrólise de todos os nucleotídeos testados em soro. Esses resultados nos permitem observar que as ectonucleotidases apresentam suas atividades diferentemente alteradas *in vitro* e após a indução de endotoxemia pela administração de LPS. As alterações observadas sugerem que estas enzimas podem atuar na regulação dos níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos em um modelo capaz de desencadear processos inflamatórios.

I.2. Abstract

Extracellular nucleotides are important signalling molecules, which are essential for the beginning and maintenance of inflammatory reactions. They are involved on leukocytes and mastocytes recruitment to the inflammatory site, vascular activation and in the maintenance of inflammatory activation. During the inflammatory process, ATP exerts a number of actions. It has been involved in the inflammation development by a conjunct of actions: release of histamines from mastocytes, triggering prostraglandine production and release of cytokines from immune cells. Adenosine is a potent extracellular messenger and it has been shown that its production is increased under adverse metabolic conditions. Extracellular nucleotides can be hydrolyzed by a variety of extracellular enzymes located on cell membranes or present in soluble forms on the extra and/or intracellular milieu. Thus, ectonucleotidases play an important role in the control of homeostasis on nucleotide and nucleoside levels. These enzymes are anchored in the plasmatic membrane and their catalytic site is faced to the extracellular milieu. These enzymes comprise the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolyse family (NTPDases), the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family (E-NPP) and the ecto-5'- nucleotidase. Considering the proinflammatory role of ATP and that adenosine can exert immunomodulatory actions, here we evaluate the *in vitro* and *in vivo* effect of lipopolysaccharyde on the ectonucleotidases from lymphocytes, platelets and blood serum of rats. *In vitro* results have shown an increase on nucleotide hydrolysis in lymphocytes and on ADP and AMP hydrolysis in platelets. In serum, it has been demonstrated a decrease on NPP activity. *In vivo*, we observed an increase on nucleotide hydrolysis in lymphocytes and a decrease in the hydrolysis of all nucleotides tested in serum. These results suggest that the ectonucleotidases present their activities differentially altered *in vitro* and after the induction of endotoxemia by LPS administration. The changes observed suggest that these enzymes can act in the regulation of extracellular nucleosides and nucleotides in a model able to trigger inflammatory process.

I.3. Lista de Abreviaturas

ADP – adenosina 5'-difosfato

AMP – adenosina 5'-monofosfato

cAMP – adenosina 5'-monofosfato cíclico

Ap_nA - diadenosina polifosfato

AR – receptores de adenosina

ATP – adenosina 5'-trifosfato

CDP – citidina 5'-difosfato

CD39 – antígeno de ativação celular linfóide

CD73 – proteína de superfície de linfócitos

ENTPDase – ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

ENPP – ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

GDP – guanosina 5'-difosfato

IDP – inosina 5'-difosfato

IL - interleucina

LPS – lipopolissacarídeo

NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo

Pi – fosfato inorgânico

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TLR – receptor do tipo “toll-like”

TNF – fator de necrose tumoral

TXA₂ – tromboxano A₂

UDP – uridina 5'-difosfato

I.4. Introdução

I.4.1. Sepses

A sepsis é uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que ocorre como consequência de uma infecção (Bone et al., 1992). Pode ser considerada como sendo o resultado da produção de um largo espectro de mediadores inflamatórios em resposta a ecto- e endotoxinas bacterianas liberadas na circulação sistêmica (Thiel et al., 2003). É a principal causa de mortes em unidades de terapia intensiva; entre 1979 e 2000, o número de casos de sepsis aumentou quatro vezes (de 164.000 para 660.000). Apesar dos avanços com relação ao cuidado dos pacientes e da introdução de potentes agentes antimicrobianos, a mortalidade permanece em torno de 20% (Martin et al., 2003).

A sepsis severa e a síndrome séptica promovem ativação fagocitária e os produtos formados se acumulam no espaço intravascular, desencadeando o choque séptico, resultando na injúria tecidual e/ou morte. Outra manifestação da sepsis severa é o acúmulo de neutrófilos ativados em tecidos periféricos não infectados, podendo causar falência renal, encefalopatia, falência hepática, síndrome do desconforto respiratório agudo, e coagulopatia intravascular disseminada (Bone et al., 1997).

Fatores microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), que são derivados de bactérias Gram-negativas, promovem a liberação de mediadores, incluindo quimiocinas (por exemplo, interleucina [IL]-8), citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral [TNF]- α , IL-1 β , IL-6, IL-12), citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-10, antagonista de receptor IL-1), eicosanóides, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (Bone et al., 1997; Symeonides & Balk, 1999; Van der Poll & Van Deventer, 1999).

I.4.1.1. Lipopolissacarídeo (LPS)

Bactérias Gram-negativas, das quais se pode destacar as patogênicas: *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia psittaci*, e *Legionella pneumophila*, apresentam um envoltório celular bilateralizado e assimetricamente organizado (Nikaido & Vaara, 1987). Voltado para o meio extracelular, certas proteínas e os lipopolissacarídeos são os constituintes predominantes, enquanto a membrana interna é composta por fosfolipídios e proteínas. Uma célula bacteriana contém aproximadamente $3,5 \cdot 10^6$ moléculas de LPS, ocupando uma área de $4,9 \mu\text{m}^2$, o que constitui cerca de três quartos da superfície celular de *E. coli* (que totaliza $6,7 \mu\text{m}^2$) de LPS, sendo o restante composto por proteínas (Nikaido & Vaara, 1987). A integridade da membrana, e do LPS constituinte desta, é essencial para a viabilidade bacteriana. De fato, mutantes incapazes de produzir LPS não são viáveis. Devido ao seu papel crucial e a sua posição externa, o LPS representa um alvo ideal para o ataque de anticorpos e agentes imunológicos ou farmacológicos. Quando a bactéria se multiplica, mas também quando sofre lise ou morre, o LPS é liberado na circulação (Rietschel et al., 1994).

Os lipopolissacarídeos bacterianos consistem tipicamente de um domínio hidrofóbico conhecido como lipídeo A (ou endotoxina), uma parte central (núcleo), e um polissacarídeo distal (ou antígeno-O) (Raetz & Whitfield, 2002) (Figura 1).

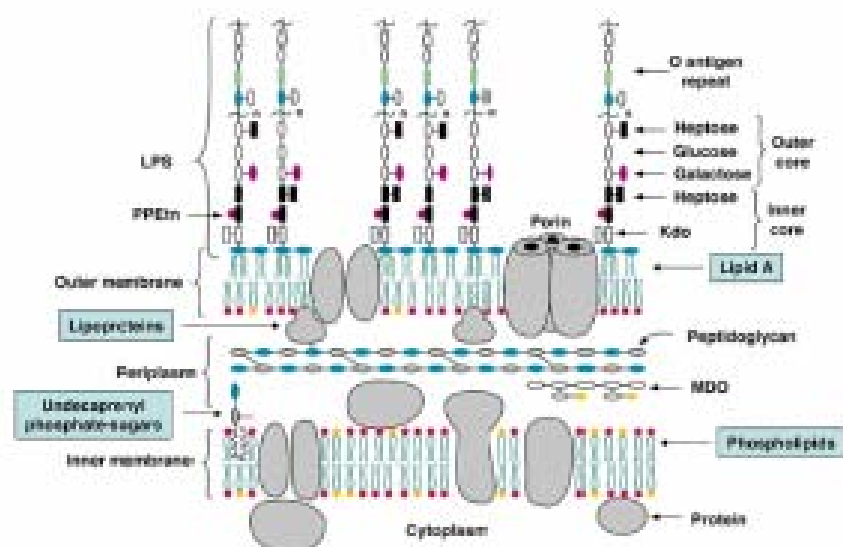


Figura 1: Modelo de membranas interna e externa de *Escherichia coli* K-12. O LPS é um componente essencial da membrana externa de bactérias Gram-negativas. É um complexo glicolipídico composto de um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico, conhecido como lipídeo A, o qual é o responsável pela atividade biológica do LPS. Adaptado de Raetz & Whitfield (2002).

O papel do lipopolissacarídeo, na patogênese da sepse foi reconhecido nas décadas de 1960 e 1970 (Braude et al., 1960). Atualmente, o LPS é reconhecido como o principal fator responsável por manifestações tóxicas de infecções Gram-negativas severas e inflamação generalizada (Rietschel & Brade, 1992; Bone, 1993). Portanto, diversos programas atuais de pesquisa no campo das doenças infecciosas objetivam a neutralização da endotoxina ou sua eliminação da circulação (Cross et al., 2004). Por outro lado, o LPS representa um imunomodulador altamente ativo, que é capaz de induzir resistência não específica a infecções virais e bacterianas e sustenta grandes esperanças como um potente adjuvante imunológico (Alving, 1993).

Os receptores do tipo “toll-like” (TLR) são uma família de receptores transmembrana responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e subsequente indução da

resposta inflamatória (Underhill, 2004). Ligantes de TLRs são conhecidos por atuar como adjuvantes, intensificando a resposta do sistema imune adaptativo (Hoebe et al., 2004). Dentre os receptores TLR, o responsável pelo reconhecimento do LPS é o TLR4 (Akira et al., 2001; Beutler & Rietschel, 2003) (Figura 2).

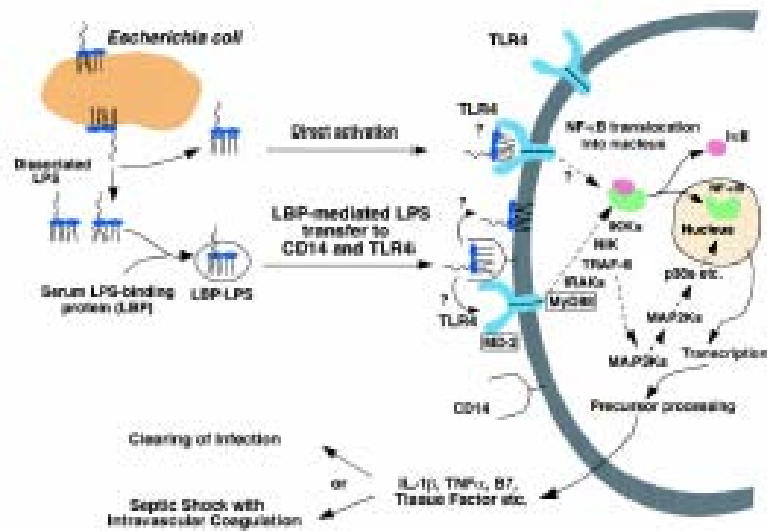


Figura 2: Detecção do lipídeo A pelo receptor do sistema imune inato de células animais TLR4. A estimulação de receptores TLR4 pelo LPS pode iniciar uma resposta imune pró-inflamatória, a qual serve para eliminar a infecção bacteriana, mas se a resposta não for suficiente pode infligir em dano tecidual ao hospedeiro, culminando em choque endotóxico. Adaptado de Raetz & Whitfield (2002).

I.4.1.2. Agregação Plaquetária Durante Inflamação/Sepse

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados liberados na circulação sanguínea através da fragmentação de megacariócitos (Hartwig & Italiano, 2003). Sob condições normais, as plaquetas circulam livremente no sangue a uma concentração de 150 a 300. $10^8/L$ e não aderem umas as outras ou a parede dos vasos. Seu papel

principal é assegurar a homeostase primária, o que significa a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos e a rápida cessação do sangramento nos eventos de injúria vascular. A função plaquetária pode ser vista como uma sucessão de eventos sobrepostos, envolvendo adesão, agregação, secreção e promoção da atividade pró-coagulante (Bennett et al., 1990). Através destas propriedades, as plaquetas são as principais efetoras da homeostase celular em humanos e outros mamíferos (White, 2000). Além de estancar a perda de sangue e reparar a injúria vascular, é crescente a aceitação de que as plaquetas são células inflamatórias com outros papéis funcionais (Weyrich et al., 2003). As plaquetas podem desempenhar funções importantes durante a inflamação crônica e aguda, as quais incluem liberação de mediadores pró-inflamatórios, exposição de moléculas de superfície que possuem ação inflamatória e interação com leucócitos e células endoteliais (Elstad et al., 1995; McIntyre et al., 2003). Após ativação, as plaquetas liberam compostos ativos, incluindo fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o qual estimula migração e proliferação de células da musculatura vascular lisa, citocinas pró-inflamatórias (Gawaz et al., 2000), e expressa P seletina (André, 2004) e CD40L (ligante de CD40 ou CD154, um membro da família TNF) (Henn et al., 1998). Esses mediadores inflamatórios promovem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e o recrutamento e extravasamento de monócitos (Henn et al., 1998; Lindemann et al., 2001; Gawaz et al., 1998), assim contribuindo para as respostas inflamatórias e pró-coagulantes (Huo & Ley, 2004).

Estudos referentes à agregação plaquetária durante a sepse são controversos. Diversos estudos têm demonstrado a acumulação plaquetária induzida por endotoxina e a acentuada agregação plaquetária em modelos animais (Almqvist et al., 1983; Beijer et al., 1987; Matera et al., 1992; Itoh et al., 1996). *In vitro*, compostos bacterianos como o

LPS e o ácido lipoprotéico de *Staphylococcus aureus* podem se ligar a membranas de plaquetas e células endoteliais de pacientes sépticos e inibir a agregação plaquetária (Salden & Bas, 1994; Sheu et al., 2000; Leytin et al., 2002). Entretanto, citocinas geradas durante o evento séptico não foram observadas ativando plaquetas humanas tanto diretamente quanto via trombina (Leytin et al., 2002). Em estudos clínicos, diversos pesquisadores têm reportado uma diminuição da agregabilidade plaquetária durante a sepse (Cowan et al., 1976; Boldt et al., 1997; Yaguchi et al., 2004), enquanto Gawaz et al. (1997) observou agregabilidade plaquetária aumentada.

I.4.2. Sistema Purinérgico

Os nucleotídeos extracelulares são importantes moléculas sinalizadoras, sendo essenciais para o início e manutenção de reações inflamatórias. Estão envolvidos no recrutamento de leucócitos e mastócitos ao sítio inflamatório, na ativação da vasculatura e no prolongamento da ativação inflamatória, até o retorno aos níveis basais (Luttikhuisen et al., 2004).

I.4.2.1. Receptores Purinérgicos

Os nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina podem exercer seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos divididos em dois grandes grupos: receptores P1 e P2. Os purinoreceptores do tipo P1 são mais eficientemente ativados por adenosina, enquanto os purinoreceptores do tipo P2 são ativados por ATP (Ralevic & Burnstock, 1998).

Os receptores purinérgicos do tipo P1 são subdivididos em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Ralevic & Burnstock, 1998; Fredholm et al., 2001). Os receptores de adenosina transmitem seu sinal principalmente via proteínas G heterotriméricas, que podem tanto estimular (G_s) quanto inibir (G_i) a atividade da adenilato ciclase, a enzima que catalisa a formação de AMP cíclico. Receptores do tipo A₁ e A₃ são receptores de alta e baixa afinidade para adenosina, respectivamente, e ambos inibem a adenilato ciclase. Em contrapartida, os receptores de alta e baixa afinidade, A_{2A} e A_{2B}, respectivamente, ativam a adenilato ciclase. Além de regular a atividade da adenilato ciclase, os subtipos de receptor de adenosina são também acoplados a distintas proteínas G, atuando em outros sistemas efetores, incluindo canais de cálcio e potássio, fosfolipase C, -D, -A2, GMP cíclico, fosfodiesterases e proteínas quinases ativadas por mitógenos, modulando diferentes funções celulares (Ralevic & Burnstock, 1998; Fredholm et al., 2000).

Os purinoreceptores do tipo P2 são subdivididos em duas subclasses: P2X e P2Y. A família P2X, ligada a um canal iônico, está envolvida na transmissão excitatória rápida, e a família P2Y é composta por receptores metabotrópicos acoplados à proteína G. Dentre os subtipos de receptores, sete da família P2X (P2X₁₋₇) e oito subtipos de receptores P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) são farmacologicamente distintos e possuem suas respostas funcionais descritas (Burnstock, 2004a).

I.4.2.2. ATP

Sob condições fisiológicas, o ATP é co-liberado com uma quantidade de neurotransmissores, os quais incluem acetilcolina, norepinefrina, glutamato, ácido γ -aminobutírico e neuropeptídeo Y (Burnstock, 2004b). Em tecidos sob hipóxia, insulto

isquêmico ou trauma, a liberação de ATP é marcadamente aumentada. O ATP é degradado a ADP, AMP e adenosina por famílias de ectonucleotidasas denominadas ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPDases) ou nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), bem como a ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 1999). Assim, estas enzimas podem controlar as ações extracelulares dos nucleotídeos por promover a sua remoção, bem como permitem a produção do nucleosídeo farmacologicamente ativo, a adenosina.

Durante o processo inflamatório, o ATP exerce uma série de efeitos. Está envolvido no desenvolvimento da inflamação por uma combinação de ações: liberação de histaminas de mastócitos, provocando produção de prostaglandinas e produção e liberação de citocinas de células do sistema imune (Di Virgilio et al., 1998). Em adição ao papel das purinas na inflamação, elas têm uma série de funções via receptores purinérgicos nas células imunes, incluindo destruição (morte) de patógenos intracelulares por induzir apoptose dos macrófagos do hospedeiro, quimioatração e adesão celular (Burnstock, 2001). A ação do ATP, durante o processo inflamatório, ocorre principalmente via ativação do receptor purinérgico P2X₇, provocando apoptose celular (Burnstock, 2002; Bulanova et al., 2005).

I.4.2.3. ADP

Nucleotídeos extracelulares e seus receptores exercem importantes papéis no sistema cardiovascular, incluindo ativação plaquetária; vasodilatação e vasoconstrição, dependendo da presença ou ausência de endotélio, respectivamente; e controle do tônus vascular pelos nervos perivasculares (Burnstock, 2002). Inicialmente, o ADP foi identificado como um fator derivado de eritrócitos que influenciava adesão plaquetária

ao vidro (Gaarder et al., 1961) e induzia agregação plaquetária (Born, 1962). Nas plaquetas, o ADP liga-se a receptores metabotrópicos do tipo P2Y₁ e P2Y₁₂. O receptor P2Y₁ tem um papel crucial no início da ativação plaquetária induzida por ADP e colágeno. Por outro lado, o receptor P2Y₁₂ tem sido mais bem conhecido e caracterizado em suas evidências genéticas e farmacológicas. Ele exerce um papel central na amplificação da agregação induzida por todos os conhecidos agonistas de plaquetas, os quais incluem colágeno, trombina, complexos imunes, TXA₂, adrenalina e serotonina (Hechler et al., 2005; Conley & Delaney, 2003). Este receptor está também envolvido na potenciação da secreção plaquetária (Cattaneo et al., 2000).

I.4.2.4. Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo púrico que desempenha importantes ações extracelulares. As ações fisiológicas da adenosina resultam quase que exclusivamente da ocupação dos receptores de superfície e pela ativação de vias de sinalização intracelular (Haskó & Cronstein, 2004) (Figura 3). Sob situações de estresse, as concentrações plasmáticas de adenosina podem aumentar drasticamente. A concentração basal de adenosina é de 1 mM, podendo atingir níveis de 8 mM no plasma de pacientes com choque séptico (Martin et al., 2000). Em pacientes severamente doentes, sofrendo de trauma, choque cardiogênico e choque séptico, são observadas concentrações plasmáticas elevadas de adenosina, inosina e hipoxantina (Jabs et al., 1998). Concentrações plasmáticas significativamente mais elevadas de hipoxantina são reportadas em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo, a qual é freqüentemente causada pela sepse (Quinlan et al., 1997). Em crianças com sepse, a concentração de adenosina no fluido cérebro-espinhal apresenta-se aumentada

(Rodriguez-Nunez et al., 2001). Martin et al. (2000) observou que em adultos sofrendo de choque séptico, os que não sobreviveram apresentaram níveis significativamente mais elevados de adenosina do que os que sobreviveram.

A adenosina desempenha um papel importante como um agente antiinflamatório endógeno (Cronstein, 1994), inibe a lise celular mediada por linfócitos e desenvolve atividade quimioativa em neutrófilos (Wolberg et al., 1975; Cronstein et al., 1983). Atuando via receptor A_{2A} , exerce um papel crucial na regulação de células do sistema imune. Em geral, a ação do receptor exerce fortes efeitos antiinflamatórios e imunossupressores (Thiel et al., 2003).

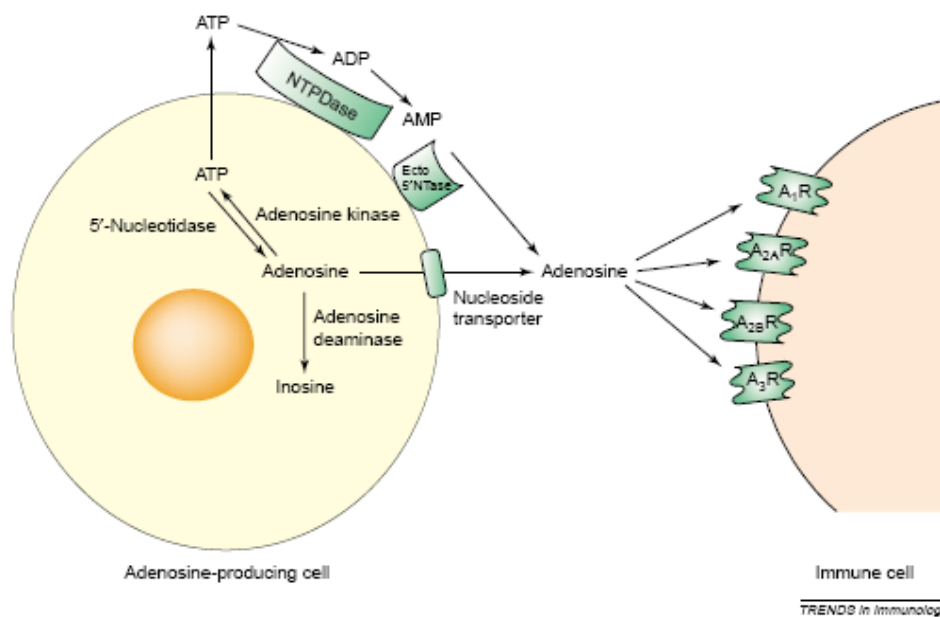


Figura 3: As maiores vias envolvidas no metabolismo da adenosina. A adenosina é formada a partir do precursor ATP nos espaços intra e extracelulares. A adenosina intracelular é desviada para o espaço extracelular através de transportadores de nucleosídeos localizados na membrana. A enzima da via de salvação, adenosina quinase, refosforila a adenosina a ATP, enquanto que a adenosina desaminase metaboliza a adenosina a inosina. A formação extracelular de adenosina é o resultado de

uma cascata enzimática que consiste de E-NTPDases, E-NPPs e ecto-5'-nucleotidase. Adaptado de Haskó & Cronstein (2004).

I.4.2.5. Nucleotidases

Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas localizadas nas membranas celulares ou presentes na forma solúvel no meio intracelular e/ou extracelular (Zimmermann, 2001). Assim, as ectonucleotidases desempenham um importante papel no controle da homeostasia dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Estas enzimas estão ancoradas na membrana plasmática e possuem seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Entre elas, podemos destacar a família das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPases), que são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e difosfatados até os seus respectivos nucleotídeos monofosfatados (Zimmermann, 1999). A ecto-5'- nucleotidase também pertence a este grupo de ecto-enzimas, sendo responsável pela hidrólise de nucleotídeos monofosfatados a seus respectivos nucleosídeos (Zimmermann, 2001). Além disso, uma outra família de enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos extracelulares é a da ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), capaz de hidrolisar 3',5'-cAMP, ATP, ADP, NAD^+ , Ap_nA (Zimmermann, 2001) (Figura 4).

Com relação à hidrólise de nucleotídeos, a NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfohidrolase) hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, sendo a proporção da hidrólise destes dois substratos de 1:1 (Heine et al., 1999; Zimmermann, 2001). A NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) hidrolisa o ATP 30 vezes mais que o ADP (Kirley, 1997; Zimmermann, 2001). A NTPDase3 (CD39L3, HB6) e a NTPDase8 preferem o

ATP em relação ao ADP numa razão de hidrólise de aproximadamente 3:1 e 2:1, respectivamente. Embora existam tais diferenças na especificidade pelos substratos, todos esses membros da família estão firmemente ligados à membrana plasmática via dois domínios transmembrana e o seu sítio ativo está voltado para o meio extracelular (Zimmermann, 2001; Lavoie et al., 2004; Bigonnesse et al., 2004). A NTPDase4 tem sido localizada no aparelho de Golgi (UDPase, NTPDase4 β) e em vacúolos lisossômicos/autofágicos (NTPDase4 α). A NTPDase4 α apresenta uma alta preferência por UTP e TTP, enquanto a NTPDase4 β por CTP e UDP. A função destas NTPDases ainda não está bem esclarecida (Zimmermann, 2001). Como as outras NTPDases, a NTPDase5 (CD39L4, ER-UDPase) e a NTPDase6 (CD39L2) são ativadas por cátions divalentes, porém têm uma preferência maior por nucleotídeos difosfatados. A NTPDase5 tem uma preferência na hidrólise de nucleotídeos na seguinte ordem: UDP > GDP = IDP >> ADP = CDP, enquanto que a NTPDase6 tem a seguinte preferência: GDP > IDP >> UDP = CDP >> ADP. Acredita-se que a NTPDase5 e a NTPDase6 participam das reações de glicosilação envolvidas nos processos de dobramento de glicoproteínas (Zimmermann, 2001). A NTPDase7 (LALP1) prefere nucleosídeos trifosfatados como substrato e está localizada em vesículas intracelulares (Shi et al., 2001).

Membros da família NPP têm ampla distribuição nos tecidos e são conhecidos cinco membros (NPP₁₋₅). NPP₁₋₃ são metaloenzimas caracterizadas por uma estrutura modular similar composta de um curto domínio intracelular, um domínio transmembrana simples e um domínio extracelular contendo um sítio catalítico conservado. NPP₄₋₅ ainda não foram funcionalmente caracterizadas (Goding et al., 2003). As enzimas revelam atividade nucleotídeo pirofosfatase, bem como fosfodiesterase alcalina, que são propriedades da mesma molécula enzimática. Elas têm

propriedades catalíticas comparáveis e são capazes de hidrolisar 3'5'-cAMP a AMP e Pi, ADP a AMP e Pi, NAD⁺ a AMP e nicotinamida mononucleotídeo, e diadenosina polifosfato (A_{p_nA}) a A_{p_{n-1}} e AMP. Ambos nucleotídeos púricos e pirimidínicos servem como substrato. Além disso, podem hidrolisar ligações fosfodiéster de ácidos nucleicos e ligações pirofosfato de nucleotídeos (Zimmermann, 2001).

A ecto-5'-nucleotidase (CD73) é uma enzima ancorada por glicosil fosfatidil inositol (GPI) que representa um marcador de maturação de linfócitos B e T. A enzima tem uma ampla distribuição tecidual e uma forma solúvel clivada tem sido descrita. A ecto-5'-nucleotidase pode revelar uma variedade de funções, dependendo de sua expressão celular e tecidual. Exerce um importante papel na formação de adenosina a partir do AMP extracelular e subsequente ativação dos receptores de adenosina P1. Além disso, pode estar envolvida na adesão celular (Zimmermann, 2001).

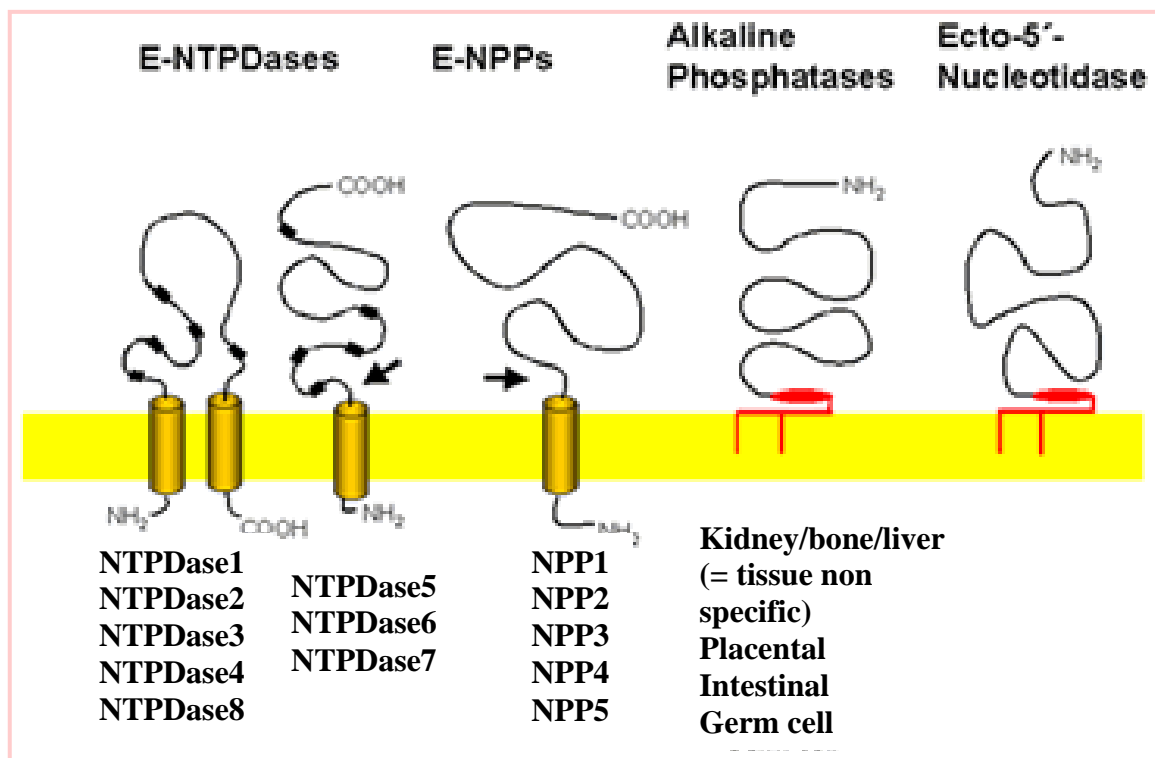


Figura 4: Topografia de membrana de ecto-nucleotidases. As NTPDases de 1 a 4 e a NTPDase 8 estão ligadas à membrana plasmática por dois domínios transmembrana, N e C-terminal. As NTPDases 5 a 7 não possuem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas ao próprio domínio N-terminal para formar uma proteína solúvel liberada (seta). Esta clivagem também pode ocorrer na família das E-NPPs (seta). A ecto-5'-nucleotidase está ancorada à membrana plasmática por uma molécula de glicosil fosfatidil inositol, a qual também pode sofrer clivagem, resultando em uma enzima solúvel. Os quadros escuros na seqüência das E-NTPDases representam as regiões conservadas da apirase. Adaptado de Zimmermann (2001).

I.5. Objetivos

Embora muitos trabalhos descrevam a importância dos nucleotídeos no desenvolvimento do processo inflamatório, poucos se atêm ao papel das ectonucleotidases, enzimas responsáveis pela hidrólise destes e, conseqüentemente, pelo término da resposta do ATP e ADP e aumento nas concentrações extracelulares do nucleosídeo adenosina. Portanto, este estudo apresenta os seguintes objetivos:

1. Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de LPS (25, 50, 75 e 100 µg/ml) sobre a atividade de hidrólise de ATP, ADP e AMP em linfócitos de linfonodos mesentéricos de ratos machos adultos;
2. Estudar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de LPS (25, 50, 75 e 100 µg/ml) sobre as atividades de hidrólise de ATP, ADP, AMP e ρ -Nph-5'-TMP em soro e plaquetas de ratos machos adultos;
3. Investigar possíveis alterações induzidas pelo modelo de endotoxemia, através da injeção intraperitoneal de LPS, sobre as atividades ectonucleotidásicas em linfócitos de linfonodos mesentéricos ratos machos adultos;
4. Avaliar o efeito *in vivo* do LPS (modelo endotoxêmico) sobre as atividades de hidrólise dos nucleotídeos da adenina tri- di- e monofosfatados e do substrato artificial ρ -Nph-5'-TMP em soro e plaquetas de ratos machos adultos;

Parte II

II. 1. Capítulo 1

Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Life Sciences

Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats

Fernanda Cenci Vuaden^a, Giana de Paula Cognato^a, Cristina Bonorino^b, João José de Freitas Sarkis^a, Carla Denise Bonan^{b,*}

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

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

*Corresponding Author

Carla Denise Bonan, Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

FAX: +55 51 3320 3612 Phone: +55 51 3320 3545 (Extension 4158)

E-mail: cbonan@pucri.br

Abstract

ATP exerts a proinflammatory role and induces cytokine release by acting at P2X₇ receptors. The product of ATP hydrolysis is the nucleoside adenosine, an important immunomodulator. The main source of extracellular adenosine is the hydrolysis of extracellular ATP by a group of ecto-enzymes: ENTPDase family, NPP family an ecto-5'-nucleotidase. Considering the role of ATP and adenosine in inflammatory processes, we investigated the effect of lipopolysaccharide on ectonucleotidases activities in lymphocytes and serum from adult rats, in order to better understand the involvement of extracellular nucleotide hydrolysis in an endotoxemia model. We observed significant changes on nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats after in vitro and in vivo exposure to LPS. In vitro results have shown an increase on nucleotide hydrolysis in lymphocytes and a decrease on the enzyme activity of NPP in blood serum. In vivo, we observed an increase on nucleotide hydrolysis in lymphocytes and a decrease in the hydrolysis of all nucleotides tested in blood serum. These results suggest that there is a time-dependent enhancement of extracellular nucleotides metabolism in lymphocytes and blood serum after the induction of an endotoxemic model. The changes observed suggest that these enzymes can act in the regulation of extracellular nucleosides and nucleotides in a model able to trigger inflammatory process.

Keywords: LPS, ATP, adenosine, NTPDase, NPP, 5'-nucleotidase, endotoxemia

1. Introduction

Extracellular ribonucleotides, such as ATP and UTP, have been considered as a new class of signaling molecules that might play a role in inflammation. Ribonucleotides are released at sites of inflammation as a result of cell damage (Di Virgilio et al., 2001). Virtually all cell types express surface receptors for these signaling ribonucleotides. Among these nucleotide receptors, the group of P2 nucleotide receptors comprises P2Y G-protein coupled receptors (P2YR) and the P2X receptors (P2XR), which are ligand-gated ion channels (Ralevic and Burnstock, 1998). P2 receptors are involved in cytokine release (Ferrari et al., 2000; Solle et al., 2001), chemotaxis (McCloskey et al., 1999), vasodilation (Marrelli, 2001; Buvinic et al., 2002), apoptosis (Molloy et al., 1994; von Albertini et al., 1998), T-cell activation and proliferation (Baricordi et al., 1999; Harada et al., 2000), and dendritic cell function (Ferrari et al., 2000). There is convincing evidence that ATP exerts a proinflammatory role and induces cytokine release by acting at P2X₇ receptors (Solle et al., 2001).

The product of ATP hydrolysis is the nucleoside adenosine, an important signaling molecule. Adenosine acts through four G-protein-coupled adenosine receptors (A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃) (Fredholm et al., 2001). Adenosine receptors mediate their signal by heteromeric G-proteins that can either stimulate (G_s) or inhibit (G_i) adenylyl cyclase. Activation of adenosine receptors on myeloid and lymphoid cells has also been shown to modulate inflammation (Haskó and Cronstein, 2004; Sitkovsky et al., 2004). Endogenous adenosine exerts a significant proportion of its anti-inflammatory actions via binding to A_{2A} receptors found on vascular endothelium, epithelium, monocytes/macrophages, neutrophils, mast cells, lymphocytes, platelets and neurons (Sullivan, 2003). Furthermore, the actions of adenosine receptors are viewed as protecting

cardiovascular and neuronal tissues from hypoxia or injury, which can increase the local concentration of extracellular adenosine by 10–100-fold (Fredholm et al., 2001).

The main source of extracellular adenosine is the hydrolysis of extracellular ATP by a group of ecto-enzymes: the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family, the ecto-pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) family and the ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (Zimmermann, 2001). NTPDases have an important role in cell adhesion and in controlling lymphocytes function, including antigen recognition and/or the effectors activation of cytotoxic T cells (Dombrowski et al., 1995). Furthermore, NTPDases play an important role in lymphocytes, since extracellular nucleotides are mediators of immune and non-immune cell function (Dombrowski et al., 1998). E-NPPs have multiple physiological roles, including nucleotide recycling, modulation of purinergic receptor signaling, regulation of extracellular pyrophosphate levels, stimulation of cell motility, and possible roles in regulation of insulin receptor signaling and activity of ecto-kinases (Goding et al., 2003). Ecto-5'-nucleotidase, otherwise known as CD73, is a lymphocyte maturation marker, which is involved in intracellular signaling, lymphocyte proliferation and activation (Airas, 1998; Resta et al., 1998).

Considering the role of ATP and adenosine in inflammatory processes, we investigated the effect of lipopolysaccharide endotoxin from *Escherichia coli* on ecto-nucleotidases in lymphocytes and serum from adult rats, in order to better understand the involvement of extracellular nucleotide hydrolysis in an endotoxemia model.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

LPS (from *Escherichia coli*, serotype 0111:B4), nucleotides (ATP, ADP and AMP), ρ -Nph-5'-TMP, Malachite Green Base, Coomassie Brilliant Blue G, HEPES were purchase from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The LDH Liquiform Kit was purchased from Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brazil). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Animals

In all experiments, male Wistar rats of approximately 60 days old, weighting around 250 grams from our breeding stock were used and housed four to a cage, with water and food ad libitum. The animal house was kept on a 12 hours light/dark cycle (lights on at 7:00 am) at a temperature of $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. Procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations of Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council).

2.3. In vitro experiments

Different concentrations of LPS (25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g/ml}$) were tested on nucleotidase activities in serum and lymphocytes from mesenteric lymph nodes of naïve rats. LPS was added to reaction medium in the preincubation phase of the enzyme assays.

2.4. In vivo experiments

Rats were injected intraperitoneally with either LPS (2 mg/kg body weight) (Spolarics et al., 1996) or saline. The animals were killed 24 and 48 hours after injection.

2.5. Isolation of blood serum fraction

Blood samples were drawn after decapitation of rats and were soon centrifuged in plastic tubes at 5000 g for 5 minutes at 20 °C. The serum samples obtained were then stored on ice and immediately used in the experiments (Oses et al., 2004).

2.6. Isolation of lymphocytes

Mesenteric lymph nodes were removed and passed through a mesh grid in saline 0.9% (Wu et al., 1991). Cells were washed three times with saline, centrifuged at 200 g for 10 minutes. After, cells were centrifuged two times at 200 g for 10 minutes with the same buffer used in the enzyme assays, without divalent cations. The cells were count with Trypan Blue and just the groups with more of 90% of viability were used to the experiments.

2.7. Enzyme assays

2.7.1. Measurement of serum ρ -Nph-5'-TMP hydrolysis

ρ -Nph-5'-TMP hydrolysis was determined essentially as described by Sakura et al. (1998). The reaction mixture containing ρ -Nph-5'-TMP, as a substrate (at the final concentration of 0.5 mM) in 100 mM Tris-HCl, pH 8.9, was incubated with approximately 1.0 mg of serum protein at 37 °C for 5 minutes in a final volume at 200 μ l. The reaction was stopped by the addition of 200 μ l of NaOH 0.2 N. The amount of ρ -nitrophenol was measured at 400 nm using an extinction coefficient of 18.8×10^{-3} /M/cm. In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the serum after the reaction was stopped. All samples were assayed in duplicate. Enzyme activities were expressed as nanomoles (nmol) of ρ -nitrophenol released per minute per milligram of protein.

2.7.2. Measurement of blood serum ATP, ADP and AMP hydrolysis

ATP and ADP hydrolysis were determined using a modification of the method described by Yegutkin (1997) according to Oses et al. (2004). The reaction mixture containing 3 mM ATP, ADP or AMP as substrate, 112.5 mM Tris-HCl, pH 8.0, was incubated with approximately 1.0 mg of serum protein at 37 °C for 40 minutes in a final volume of 200 µl. The reaction was stopped by the addition of 200 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA). The samples were chilled on ice and the amount of inorganic phosphate (Pi) released was measured as described by Chan et al. (1986). In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. All samples were centrifuged at 5000 g for 5 minutes to eliminate precipitated protein and the supernatant was used for the colorimetric assay. All samples were assayed in triplicate.

2.7.3. Measurement of lymphocyte ATP, ADP and AMP hydrolysis

ATP, ADP and AMP hydrolysis were determined using a modification of the method described by Fillipinni et al. (1990). The reaction medium contained 2 mM CaCl₂ (for ATP and ADP) or MgCl₂ (for AMP), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose, 1 mM sodium azide, 0,1% mM albumine and 20 mM Hepes buffer, pH 7.6, in a final volume of 200 µl. About 10⁶ cells of lymphocytes were added to the reaction medium and the enzyme reaction was started by the addition of ATP, ADP or AMP to a final concentration of 2 mM and incubated for 30 minutes at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 200 µl of 10% TCA. The samples were chilled on ice and the amount of Pi released was measured as described by Chan et al. (1986). In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the cells after reaction was stopped with TCA. All samples were assayed in triplicate.

2.8. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

2.9. Statistical Analysis

The data obtained are represented as mean \pm S.D. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Duncan multiple range test, considering $P < 0.05$ as significant.

3. Results

3.1. Cellular integrity

The lymphocytes preparation integrity was checked by measuring lymphocytes lactate dehydrogenase (LDH) activity. The protocol was carried out according to the manufacturer's instructions. Triton X-100 (1%, final concentration) was used to disrupt the platelet preparation. The measurement of LDH activity showed that most cells (approximately 90%, $n = 3$) were intact after the isolation procedure (data not shown).

3.2. In vitro experiments

In lymphocytes, we observed a significant increase on ATP (40%, 50% and 55%) and ADP (24%, 25% and 32%) hydrolysis in the concentration range of 50, 75 and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Fig. 1A and 1B). AMP hydrolysis just increased significantly at a final concentration of 75 $\mu\text{g/mL}$ (38%) (Figure 1C). In serum, LPS did not promote a significant difference on ATP, ADP and AMP hydrolysis, when compared to the control (data not shown). The hydrolysis of the artificial substrate $\rho\text{-Nph-5}'\text{-TMP}$ decreased

significantly in the presence of 25, 50, 75 and 100 µg/mL of LPS (18%, 37%, 31% and 36%, respectively), in relation to the control (Figure 2).

3.3. In vivo experiments

In lymphocytes, the ATP (100% and 145%) and ADP hydrolysis (69% and 100%) increased significantly at the time tested (24 and 48 hours) (Fig 3A and 3B). However, AMP hydrolysis showed a pattern similar to the *in vitro* results, since the hydrolysis of this nucleotide increased significantly at 24 hours (92%) after LPS injection and decreased after 48 hours of treatment (Figure 3C). In serum, at 24 and 48 hours, we observed a significant decrease in the hydrolysis of the three nucleotide tested (69% and 63% for ATP, 40% and 56% for ADP and 30% and 48% for AMP, respectively) (Figure 4A, 4B and 4C). The hydrolysis of the artificial substrate ρ -Nph-5'-TMP decreased significantly at 24 hours (49%), but it returned to the control levels at 48 hours (Figure 5).

4. Discussion

In the present study, we observed significant changes on nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats after *in vitro* and *in vivo* exposure to LPS.

ATP and its metabolites, ADP and adenosine, at low concentrations (in the micromolar range) influence vascular tone, cardiac function, platelet aggregation and the function of lymphocytes and granulocytes (Ralevic and Burnstock, 1998; Burnstock, 2004). It has been described an increase of ATP release during inflammation and this compound present proinflammatory properties (Bodin & Burnstock, 1998). Previous studies have suggested a role for extracellular nucleotides in regulating cellular responses to

lipopolysaccharide (LPS). For instance, extracellular signal regulated kinase (ERK) activation by LPS in macrophages can be inhibited by P2 nucleotide antagonists (Hu et al., 1998). Moreover, LPS was shown to activate IL-1 secretion via ATP release and autocrine stimulation (Ferrari et al., 1997; Imai et al., 2000).

ATP is hydrolyzed to ADP, AMP and adenosine by the action of ectonucleotidases (NTPDase family, NPP family and 5'-nucleotidase) (Zimmermann, 2001). In our results, we observed an increase on nucleotide hydrolysis in lymphocytes exposed to different concentrations of LPS, suggesting that this endotoxin can modulate the nucleotide degradation in these cells. The results have shown a significant increase of ATP, ADP and AMP hydrolysis at 24 hours after the induction of endotoxemic model. Therefore, an increase of nucleotide hydrolysis could be related to a compensatory response, decreasing ATP availability, a proinflammatory agent and, consequently, contributing to the production of extracellular adenosine, an anti-inflammatory compound. However, at 48 hours after the treatment, there is a significant increase of ATP and ADP hydrolysis, but not in AMP hydrolysis, which return to the control values. Despite these effects, it is possible to suggest that the adenosine levels remain enhanced, due to the stoichiometric effect promoted by the increased ATP and ADP hydrolysis observed. Furthermore, the efficient removal of these nucleotides reduces the ATP/ADP feed-forward inhibition on ecto-5'-nucleotidase, which could allow a burst-like formation of adenosine possibly designed to activate facilitatory A_{2A} receptors (Cunha, 2001).

Several studies have shown the high adenosine levels during inflammatory events or sepsis (Quinlan et al., 1997; Jabs et al., 1998; Martin et al., 2000; Rodriguez-Nunez et al., 2001). It has been reported the role of this purine nucleoside in the control of inflammation, due to its anti-inflammatory properties, acting mainly in adenosine A_{2A}

receptors (Sullivan, 2003; Thiel et al., 2003, Capecchi et al., 2005). It has been proposed the administration of adenosine A_{2A} agonists in the inflammatory events and sepsis (Thiel et al., 2003; Sullivan et al., 2004). Selective A_{2A} receptors agonists reduce the extravasation of neutrophils into LPS-challenged tissues in animal models of gram-negative bacterial meningitis (Sullivan et al., 1999) and septic arthritis (Hogan et al., 2001). A_{2A} receptors agonists decrease the serum concentration of TNF in LPS-challenged mice and inhibit LPS-induced release of IL-12 (Haskó et al, 1996) and TNF from isolated mouse macrophages (Haskó et al., 2000). The control of nucleotide and nucleoside levels exerted by ectonucleotidases could contribute to the modulation of purinergic signaling, promoted by P1 and P2 receptors, during inflammatory events.

Furthermore, we analysed the soluble nucleotidases from blood serum after in vivo exposure of LPS, since these enzymes could control the circulating nucleotide levels and present an important role in the maintenance of normal physiology (Oses et al., 2004). We observed a decrease on nucleotidase hydrolysis after 24 and 48 hours of exposure to LPS. The source of soluble NTPDases is unclear, but is possible to suggest the cleavage near the N-terminal region, which result in the release of these enzymes. Our results lead us to the hypothesis of there is a requirement of ectonucleotidases to the cells in order to promote to avoid the harmful effects of ATP. Thus, the cleavage and release of these enzymes could be reduced, promoting a decrease on nucleotide hydrolysis from blood serum.

In summary, these results indicate that there is a time-dependent enhancement of extracellular nucleotides metabolism in lymphocytes and blood serum after the induction of an endotoxemic model. The changes observed suggest that these enzymes can act in the regulation of extracellular nucleosides and nucleotides in a model able to trigger inflammatory process.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CAPES and CNPq-Brazil.

References

Albertini, M. von, Palmethofer, A., Kaczmarek, E., Koziak, K., Stroka, D., Grey, S.T., Stuhlmeier, K.M., Robson, S.C., 1998. Extracellular ATP and ADP activate transcription factor NF-kappa B and induce endothelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 248, 822–829.

Airas, L., 1998. CD73 and adhesion of B-cells to follicular dendritic cells. *Leuk Lymphoma* 29(1-2), 37-47. Review.

Baricordi, O.R., Melchiorri, L., Adinolfi, E., Falzoni, S., Chiozzi, P., Buell, G., Di Virgilio, F., 1999. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem.* 274, 33206–33208.

Bodin, P., Burnstock, G., 1998. Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm Res.* 47(8), 351-354.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem.*; 72, 248-256.

Burnstock, G., 2004. Introduction: P2 receptors. *Cur Top Med Chem.* 4, 793-803.

Buvinic, S., Briones, R., Huidobro-Toro, J.P., 2002. P2Y(1) and P2Y(2) receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Br J Pharmacol.* 136, 847–856.

Capecchi, P.L., Camurri, A., Pompella, G., Mazzola, A., Maccherini, M., Diciolla, F., Lazzerini, P.E., Abbraccio, M.P., Laghi-Pasini, F., 2005. Upregulation of A2A Adenosine Receptor Expression by TNF- α in PBMC of Patients with CHF: A Regulatory Mechanism of Inflammation. *J Card Fail.* 11(1), 67-73.

Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem.* 157, 375-380.

Cunha, R.A., 2001. Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem Res.* 26(8-9), 979-991.

Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., Baricordi, O.R., 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97, 587–600.

Dombrowski, K.E., Ke, Y., Thompson, L.F., Kapp, J.A., 1995. Antigen recognition by CTL is dependent upon ectoATPase activity. *J Immunol.* 154(12), 6227-6237.

Dombrowski, K.E., Ke, Y., Brewer, K.A., Kapp, J.A., 1998. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev.* 161, 111-118. Review.

Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S., Di Virgilio, F., 1997. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med.* 185, 579–582.

Ferrari, D., La Sala, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Falzoni, S., Girolomoni, G., Idzko, M., Dichmann, S., Norgauer, J., Di Virgilio, F., 2000. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J.* 14, 2466–2476.

Fillippini, A., Taffs, R.E., Agui, T., Sitkovsky, M.V., 1990. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes, protection of the cytolytic effects of extracellular ATP. *J Biol Chem.* 265, 334-340.

Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J., 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 527–552.

Goding, J.W., Grobбен, B., Slegers, H., 2003. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638, 1-19.

Harada, H., Chan, C.M., Loesch, A., Unwin, R., Burnstock, G., 2000. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 57, 949–958.

Haskó, G., Szabo, C., Nemeth, Z.H., Kvetan, V., Pastores, S.M., Vizi, E.S., 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol.* 157, 4634-4640.

Haskó, G., Kuhel, D.G., Chen, J.F., et al. 2000. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A_{2A} receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 14, 2065-2074.

Haskó, G., Cronstein, B.N., 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25, 33–39.

Hogan, C.J., Fang, G.D., Scheld, W.M., Linden, J., Diduch, D.R., 2001. Inhibiting the inflammatory response of joint sepsis. *Arthroscopy* 17, 311-315.

Hu, Y., Fiset, P.L., Denlinger, L.C., Guadarrama, A.G., Sommer, J.A., Proctor, R.A., Bertics, P.J., 1998. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem.* 273, 27170–27175.

Imai, M., Goepfert, C., Kaczmarek, E., Robson, S.C., 2000. CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 270, 272–278.

Jabs, C.M., Sigurdsson, G.H., Neglen, P., 1998. Plasma levels of high-energy compounds compared with severity of illness in critically ill patients in intensive care unit. *Surgery* 124, 65-72.

Londos, C., Cooper, D.M., Wolf, J., 1980. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 2551-2554.

Marrelli, S.P., 2001. Mechanisms of endothelial P2Y(1)- and P2Y(2)-mediated vasodilatation involve differential [Ca²⁺] responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281, H1759–H1766.

Martin, C., Leone, M., Viviand, X., Ayem, M.L., Guieu, R., 2000. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 28(9), 3198-3202.

McCloskey, M.A., Fan, Y., Luther, S., 1999. Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J Immunol.* 163, 970–977.

Molloy, A., Laochumroonvorapong, P., Kaplan, G., 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette–Guerin. *J Exp Med.* 180, 1499–1509.

Oses, J.P., Cardoso, C.M., Germano, R.A., Kirst, I.B., Rucker, B., Fürstenau, C.R., Wink, M.R., Bonan, C.D., Battastini, A.M.O., Sarkis, J.J.F., 2004. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci.* 74, 3275-3284.

Quinlan, G.J., Lamb, N.J., Tilley, R., Evans, T.W., Gutteridge, J.M., 1997. Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity and mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 155, 479-484.

- Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50, 413–492.
- Resta, R., Yamashita, Y., Thompson, L.F., 1998. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev.* 161, 95-109. Review.
- Rodriguez-Nunez, A., Cid, E., Rodriguez-Garcia, J., Camina, F., Rodriguez-Segade, S., Castro-Gado, M., 2001. Concentrations of nucleotides, nucleosides, purine bases, oxypurines, uric acid and neuron-specific enolase in the cerebrospinal fluid of children with sepsis. *J Child Neurol.* 16, 704-706.
- Sakura, H., Nagashima, S., Nakashima, A., Maeda, M., 1998. Characterization of fetal serum 5' nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thromb Res.* 91, 83-89.
- Sitkovsky, M.V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., Ohta, A., Thiel, M., 2004. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A_{2A} receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 657–682.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths R.J., Gabel, C.A., 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem.* 276, 125–132.
- Spolarics, Z., Stein, D.S., Garcia, Z.C., 1996. Endotoxin stimulates hydrogen peroxide detoxifying activity in rat hepatic endothelial cells. *Hepatology* 24, 691-696.
- Sullivan, G.W., Linden, J., Buster, B.L., Scheld, W.M., 1999. Neutrophil A_{2A} adenosine receptors inhibits inflammation in a rat model of meningitis: synergy with the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram. *J Infect Dis.* 180, 1550-1560.
- Sullivan, G.W., 2003. Adenosine A_{2A} receptor agonists as anti-inflammatory agents. *Cur Opin Invest Drugs* 4(11), 1313-1319.

Sullivan, G.W., Fang, G., Linden, J., Scheld, W.M., 2004. Adenosine receptor activation improves survival in mouse of endotoxemia and sepsis. *J Infect Dis.* 189, 1897-1904.

Thiel, M., Caldwell, C.C., Sitkovsky, M.V., 2003. The critical role of adenosine A_{2A} receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect.* 5(6), 515-526.

Wu, G., Field, C.J., Marliss, E.B., 1991. Glutamine and glucose metabolism in rat splenocytes and mesenteric lymph node lymphocytes. *AM J Physiol.* 260(23), 141-147.

Yegutkin, G.G., 1997. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochemistry-Moscou* 62, 724-728.

Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev Res.* 52. 46-56.

Legends to Figures

Figure 1: Influence of different concentrations of LPS (25, 50, 75 and 100 µg/ml) on ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in lymphocytes from mesenteric lymph nodes of rats. The control of enzymatic activities in lymphocytes were 0.38256 ± 0.04545 , 0.25098 ± 0.04451 and 0.13233 ± 0.01239 nmol Pi.min⁻¹.10⁻⁶ cells for ATP, ADP and AMP, respectively. The data represent a mean \pm SD (n = 5 at least). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Duncan multiple range test, considering P < 0.05 as significant (*).

Figure 2: Influence of different concentrations of LPS (25, 50, 75 and 100 µg/ml) on ρ -Nph-5`-TMP hydrolysis from blood serum fraction of rats. The control of specific activity in serum was 3.26 ± 0.12278 nmol ρ -nitrophenol.min⁻¹.mg⁻¹ of protein. The data represent a mean \pm SD (n = 5 at least). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Duncan multiple range test, considering P < 0.05 as significant (*).

Figure 3: ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in lymphocytes from mesenteric lymph nodes of rats after 24 and 48 hours of endotoxemia induction. The control of enzymatic activities in lymphocytes were 0.42195 ± 0.12012 , 0.29195 ± 0.06513 and 0.13956 ± 0.0134 nmol Pi.min⁻¹.10⁻⁶ cells for ATP, ADP and AMP, respectively. The data represent a mean \pm SD (n = 5 at least). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Duncan multiple range test, considering P < 0.05 as significant (*).

Figure 4: ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis from blood serum fraction of rats after 24 and 48 hours of endotoxemia induction. The control of specific activities in serum were 1.04876 ± 0.22883 , 1.10657 ± 0.23175 , 1.15605 ± 0.2647 nmol Pi.min⁻¹.mg⁻¹ of protein for ATP, ADP and AMP, respectively. The data represent a mean \pm SD (n = 5 at least). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Duncan multiple range test, considering P < 0.05 as significant (*).

Figure 5: *p*-Nph-5`-TMP hydrolysis from blood serum fraction of rats after 24 and 48 hours of endotoxemia induction. The control of specific activity in serum was 2.99 ± 0.30326 nmol *p*-nitrophenol.min⁻¹.mg⁻¹ of protein. The data represent a mean \pm SD (n = 5 at least). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Duncan multiple range test, considering P < 0.05 as significant (*).

Figures

Figure 1

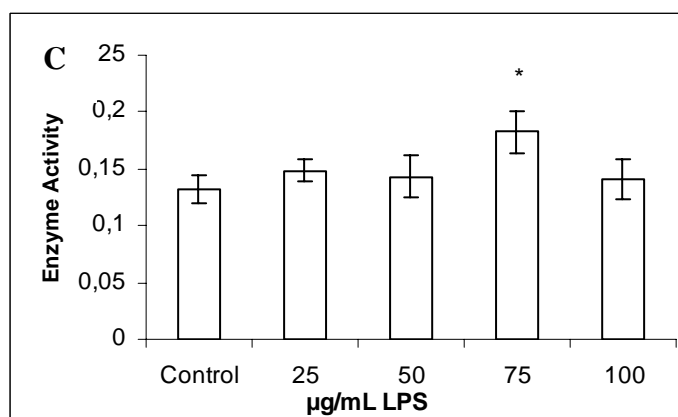
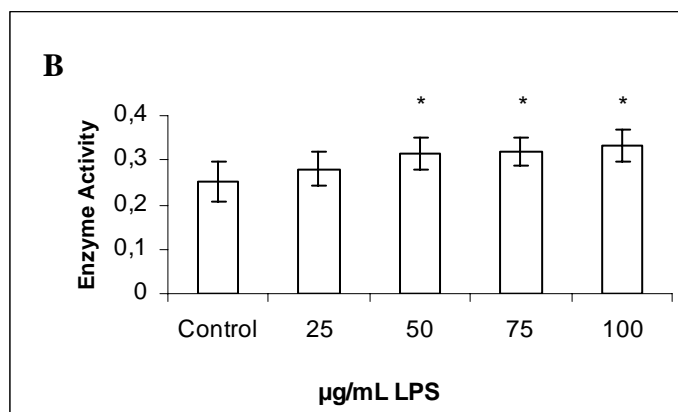
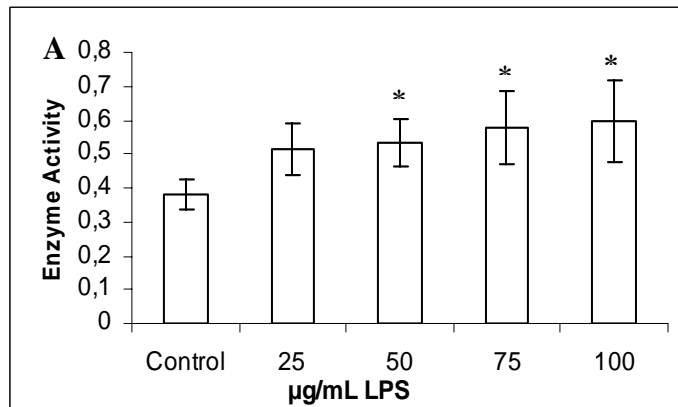


Figure 2

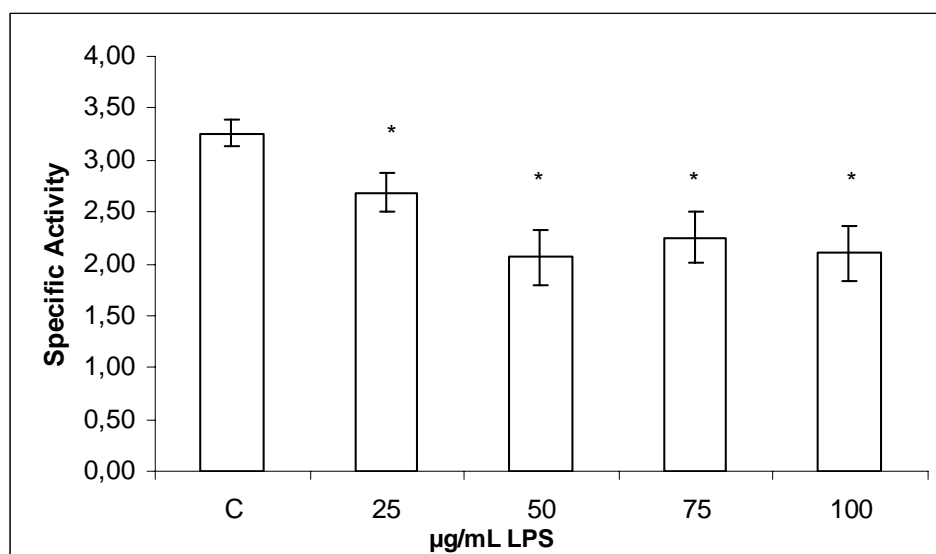


Figure 3

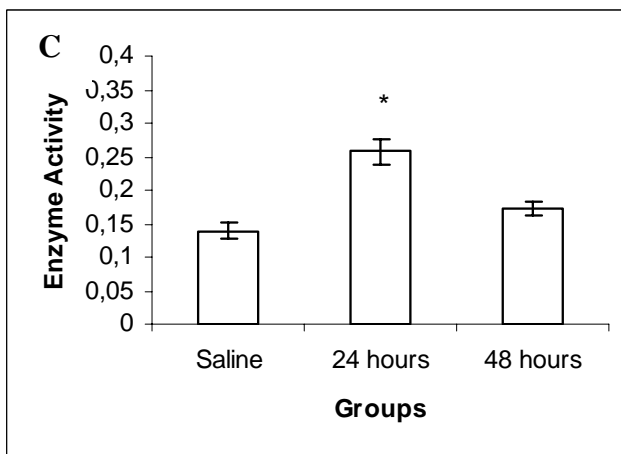
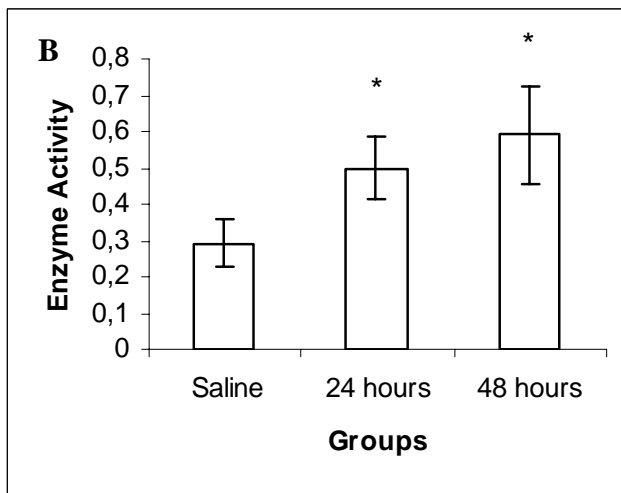
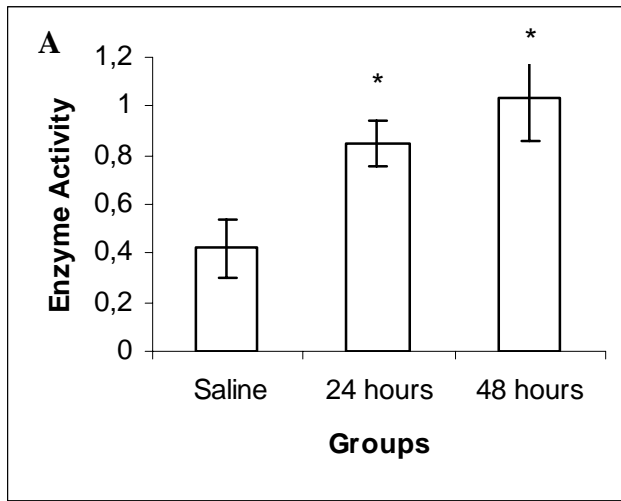


Figure 4

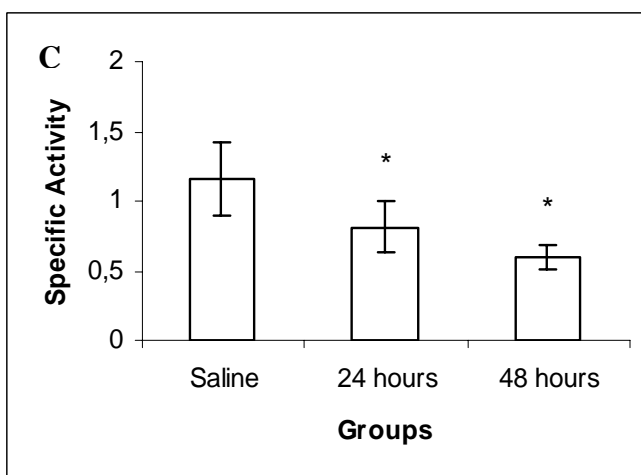
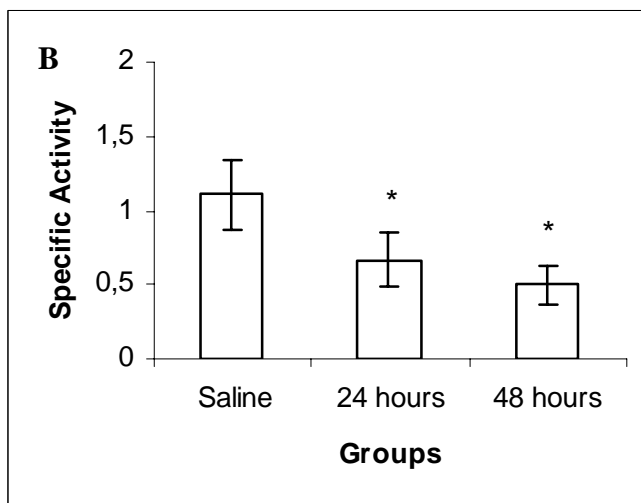
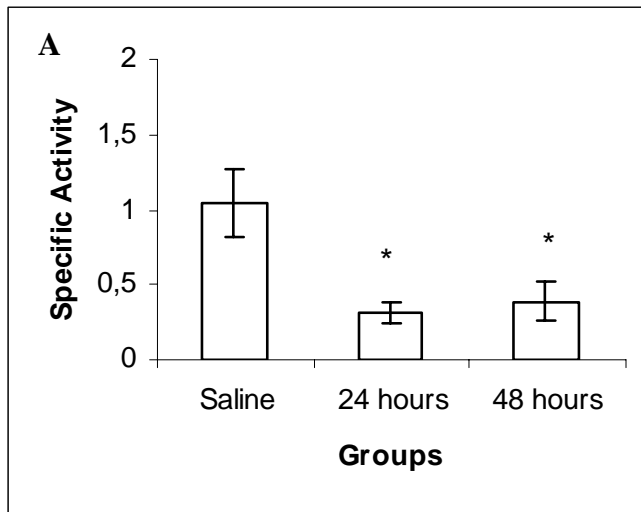
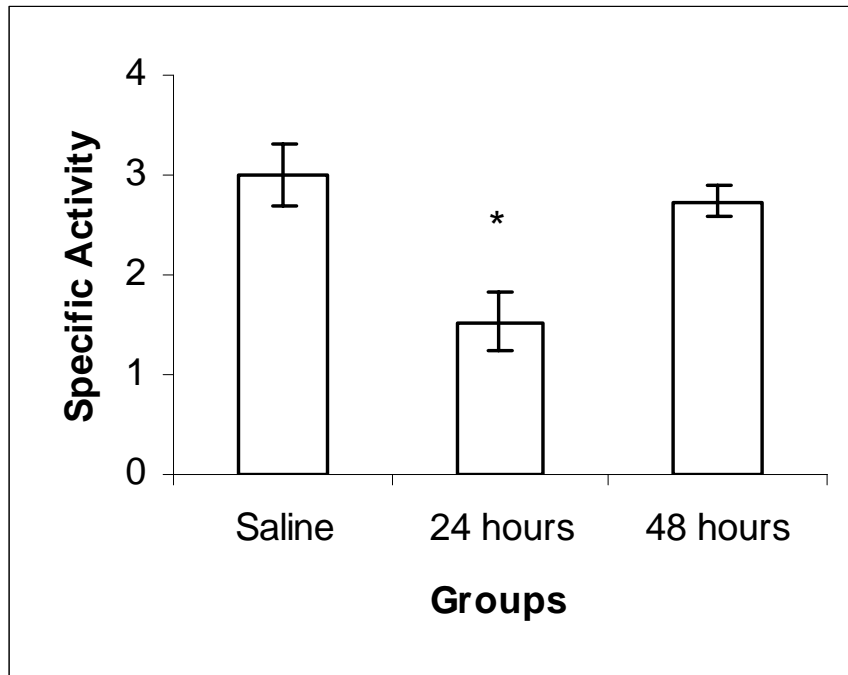


Figure 5



II. 2. Capítulo 2

Effects of lipopolysaccharide on nucleotide hydrolysis in platelets of rats

Resultados preliminares de manuscrito a ser submetido

Effects of lipopolysaccharide on nucleotide hydrolysis in platelets of rats

Fernanda Cenci Vuaden^a, Cristina Ribas Furstenuau^a, João José de Freitas Sarkis^a, Carla Denise Bonan^b

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

^b Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding Author

Carla Denise Bonan, Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

FAX: +55 51 3320 3612 Phone: +55 51 3320 3545 (Extension 4158)

E-mail: cbonan@pucrs.br

1. Introduction

Platelets are enucleated cell fragments released from megakaryocytes, known to play a major role in the maintenance of endothelial integrity and hemostasis (Jurk & Kehrel, 2005). Platelet function can be seen as a succession of overlapping events involving adhesion, aggregation, secretion, and promotion of procoagulant activity (Bennett & Shattil, 1990; Bithell, 1993). Platelet aggregation and fibrin deposition can also occur significantly within injured vasculature, as a consequence of inflammation (Piro et al., 2005). Systemic inflammation is a potent prothrombotic stimulus. Inflammatory mechanisms upregulate procoagulant factors, downregulate natural anticoagulants and inhibit fibrinolytic activity. Besides to modulating plasma coagulation mechanisms, inflammatory mediators appear to increase platelet reactivity. However, *in vivo*, natural anticoagulants not only prevent thrombosis, but they also dampen inflammatory activity (Esmon, 2003). Inflammatory mediators promote coagulation by elevating tissue factor (Broze, 1995). Endotoxin, tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-1a (IL-1a) induce tissue factor expression, primarily on monocytes/macrophages (Walsh, 1987; Edgington et al., 1991), and probably play a role in inducing tissue factor in atherosclerotic plaques as well (Young et al., 2002).

Adenine nucleotides and nucleosides may play a role in the regulation of vascular tone and in platelet aggregation, since ATP and ADP are vasoactive and platelet-active nucleotides, respectively (Burnstock, 1990; Colman, 1990). The level of exogenous ATP in the body may be increased in various inflammatory and shock conditions, primarily as a consequence of nucleotide release from platelets, endothelium, and blood vessel cells (Hantgan, 1984; Bodin & Burnstock, 1996; Dubyak, 2000). ADP is a nucleotide known to induce changes in platelets shape and

aggregation, to promote the exposure of fibrinogen-binding sites and to inhibit the stimulation of adenylate cyclase (Colman, 1990), while ATP competitively inhibits ADP-induced platelet aggregation (Coade & Pearson, 1989). Adenosine, the final product of the nucleotide hydrolysis, is a vasodilator (Engler, 1991) and an inhibitor of platelet aggregation (Kitakase et al., 1991).

The most relevant ecto-enzymes involved in adenine extracellular nucleotide hydrolysis are E-NTPDases (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases), E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) (Zimmermann, 2001). These enzymes are present on the surface of intact platelets and are able to promote the complete hydrolysis of ATP to adenosine in the extracellular space (Frassetto et al., 1993; Furstenau et al., 2004; 2006).

In the present study, we aimed to evaluate the effect *in vitro* of lipopolysaccharide endotoxin from *Escherichia coli* on extracellular adenine nucleotide hydrolysis by platelets from rats.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

LPS (from *Escherichia coli*, serotype 0111:B4), nucleotides (ATP, ADP and AMP), ρ -Nph-5'-TMP, Malachite Green Base, Coomassie Brilliant Blue G, HEPES were purchase from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Animals

In all experiments, male Wistar rats of approximately 60 days old, weighting around 250 grams from our breeding stock were used and housed four to a cage, with water and food *ad libitum*. The animal house was kept on a 12 hours light/dark cycle (lights on at 7:00 am) at a temperature of 23 ± 1 °C. Procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations of Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council).

2.3. *In vitro* experiments

Different concentrations of LPS (25, 50, 75 and 100 µg/mL) were tested on nucleotidase activities from rat platelets. LPS was added to reaction medium in the pre-incubation phase of the enzyme assays.

2.4. Platelet isolation

Platelets were isolated exactly as described previously by Hantgan (1984). In an effort to obtain preparations of normal, undamaged platelets free from non-adsorbed plasma constituents, we separated intact platelets from plasma by means of gel filtration on a 1.5 × 7.0 cm Sepharose 2B column (Tangen et al., 1971). The column was equilibrated with a buffer consisting of 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 5.5 mM dextrose, 0.2 mM EGTA, and 0.05 g% azide, pH 6.8 (Ca²⁺-free Tyrode's buffer). Platelets were eluted with the same buffer at room temperature; 0.5 mL fractions were collected and the tubes containing the maximum platelet count (determined visually) were used for subsequent experiments.

2.5. Enzyme assays

2.5.1. Measurement of platelets ATP, ADP and AMP hydrolysis

Unless otherwise stated, the reaction medium used to assay Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -ADPase activity contained 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM CaCl_2 , and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 μL . About 20 μg of platelet preparation was added to the reaction medium and pre-incubated for 10 min at 37 °C. The enzyme reaction was started by the addition of ATP or ADP to a final concentration of 0.5 mM. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the reaction. The reaction was stopped by the addition of 10% trichloroacetic acid (TCA). The amount of Pi liberated was carried out as previously outlined (Chan et al., 1986). Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis were prepared by adding platelet preparations after the reaction was stopped with TCA (to a final concentration of 5%). All samples were run in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. For the ecto-5'-nucleotidase assay, we used the same procedure and conditions, except that ATP and ADP as substrates were replaced by AMP (0.5 mM final concentration) and 5.0 mM CaCl_2 was replaced by 5.0 mM MgCl_2 . The other procedures were the same as those for ATP and ADP hydrolysis.

2.5.2. Measurement of platelets ρ -Nph-5'-TMP hydrolysis

ρ -Nph-5'-TMP (ρ -5'-timidine monophosphate) hydrolysis was determined essentially as described by Furstenau et al. (2006). The reaction medium used to assay ρ -Nph-5'-TMP activity contained 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 0.5 mM CaCl_2 , and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.9, in a final volume of 200 μL . About 20 μg of platelet preparation was added to the reaction medium and preincubated for 10 min at 37 °C. The enzyme reaction was started by the addition of ρ -Nph-5'-TMP (to a

final concentration of 0.5 mM) at 37 °C for 80 minutes in a final volume at 200 µL. The reaction was stopped by the addition of 200 µL of NaOH 0.2 N. The amount of *p*-nitrophenol was measured at 400 nm using an extinction coefficient of 18.8×10^{-3} /M/cm. In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the serum after the reaction was stopped. All samples were assayed in duplicate. Enzyme activities were expressed as nanomoles (nmol) of *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein.

2.6. Protein determination

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

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Duncan's multiple range test. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in the statistical analysis used.

3. Results and Discussion

In platelets, we observed a significant increase on ADP (36% and 40%, respectively) in the concentrations range of 75 and 100 µg/mL. AMP hydrolysis increased just in the presence of 100 µg/mL (43%) of LPS. However, there were no significant changes on ATP and *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis in all concentrations tested.

These results suggest that alterations observed in nucleotidase activities from circulatory system could modulate extracellular nucleotide and nucleoside levels, which

can regulate the inflammatory process events. Further studies investigating the *in vivo* effects of LPS on nucleotidase activities are required to provide a more complete view about the relation of purinergic system and inflammation.

References

Bennett JS, Shattil SJ. **Platelet function.** In: Williams WJ, ed. Hematology. New York: McGraw-Hill Inc.; 1233–41, 1990.

Bithell TC. **The hphysiology of primary hemostasis.** In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, eds. Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger; 540–55, 1993.

Bodin P, Burnstock G. **ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells.** J Cardiovasc Pharmacol.; 27: 872–5, 1996.

Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding.** Anal Biochem.; 72: 248-56, 1976.

Broze GJ Jr. **Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation.** Annu Rev Med.;46: 103-12, 1995. Review.

Burnstock, G. **Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium.** J Hypertens Suppl.; 8 (7): S95-106, 1990. Review.

Chan K, Delfert D, Junger KD. **A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity.** Anal Biochem.; 157: 375-80, 1986.

Chesterman CN. **Vascular endothelium, haemostasis and thrombosis.** Blood Rev.; 2 (2): 88-94, 1988. Review.

- Coade SB, Pearson JD. **Metabolism of adenine nucleotides in human blood.** Circ Res.; 65: 531–7, 1989.
- Colman RW **Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation.** FASEB J.; 4: 1425–35, 1990.
- Dubyak GR. **Purinergic signaling at immunological synapses.** J Auton Nerv Syst.; 81 : 64–8, 2000.
- Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. **The structural biology of expression and function of tissue factor.** Thromb Haemost.; 66: 67–79, 1991.
- Engler RL. **Adenosine the signal of life?** Circulation; 84: 952-4, 1991.
- Esmon CT. **Inflammation and thrombosis.** J Thromb Haemost.; 1: 1343–8, 2003.
- Frassetto S, Dias RD, Sarkis JJF. **Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets.** Mol Cell Biochem.; 129: 47–55, 1993.
- Furstenau CR, Trenti DS, Barreto-Chaves MLM, Sarkis JJF. **Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties.** Platelets; 17 (2): 84-91, 2006.
- Hantgan RR. **A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change.** Blood; 64: 896–906, 1984.
- Jurk K, Kehrel BE. **Platelets: physiology and biochemistry.** Semin Thromb Hemost.; 31 (4): 381-92, 2005. Review.
- Kitakase M, Hori M, Sato H, Takashima S, Inoue M, Kitabatake A, et al. **Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs.** Circ Res.; 69: 1402-8, 1991.

Piro M, Giubilato G, Pinnelli M, Giordano Sciacca P, Biasucci LM. **Endothelium and inflammation.** Panminerva Med.; 47 (2): 75-80, 2005. Review.

Spolarics Z, Stein DS, Garcia ZC. **Endotoxin stimulates hydrogen peroxide detoxifying activity in rat hepatic endothelial cells.** Hepatology 24: 691-96, 1996.

Tangen O, Berman HJ, Marfey P. **A new technique for separation of blood platelets from plasma.** Thromb Diath Haemorrh.; 25: 268-78, 1971.

Young JL, Libby P, Schönbeck W. **Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis.** Thromb Haemost.; 88: 554-67, 2002.

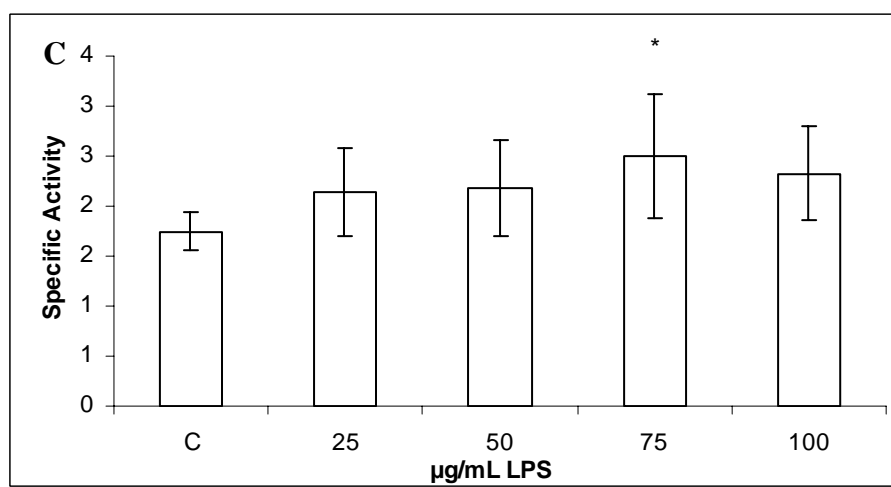
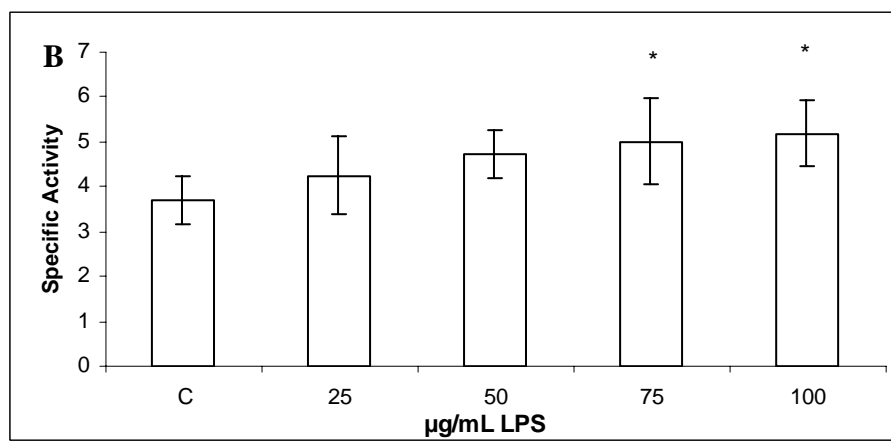
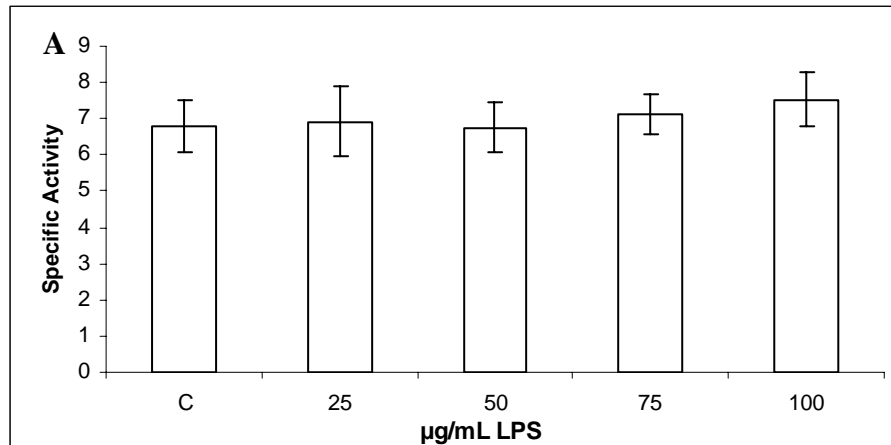
Walsh PN. **Platelet-mediated trigger mechanisms in the contact phase of blood coagulation.** Sem Thromb Hemost.; 13: 86-94, 1987.

Legends to Figures

Figure 1: Influence of different concentrations of LPS (25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g/ml}$) on ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in a preparation rich in platelets of rats. The control activities in platelets were 6.78 ± 0.70 , 3.70 ± 0.54 and 1.75 ± 0.18 $\text{nmol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ os protein for ATP, ADP and AMP, respectively. The data represent a mean \pm SD (n = 5 at least). Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Duncan multiple range test, considering $P < 0,05$ as significant (*).

Figures

Figure 1



Parte III

III.1. Discussão

III.1.1. Considerações gerais

Diversos estudos têm demonstrado o aumento da adenosina durante eventos inflamatórios ou sepse (Quinlan et al., 1997; Jabs et al., 1998; Martin et al., 2000; Rodriguez-Nunez et al., 2001). Muitos trabalhos têm reportado o papel deste nucleosídeo púrico como uma molécula importante no controle da inflamação, por suas propriedades antiinflamatórias, atuando principalmente via ativação do receptor purinérgico do tipo A_{2A} (Sullivan, 2003; Thiel et al., 2003, Capecchi et al., 2005). O ATP também exerce importantes propriedades pró-inflamatórias e modula a agregação plaquetária induzida por ADP (Coade & Pearson, 1989; Solle et al., 2001). Este nucleotídeo está envolvido no desenvolvimento da inflamação por um conjunto de ações combinadas: liberação de histaminas de mastócitos, provocando produção de prostaglandinas e produção e liberação de citocinas de células do sistema imune (Di Virgilio et al., 1998).

Tem sido bastante investigado o uso de agonistas de receptores A_{2A} no tratamento de eventos inflamatórios e sepse (Thiel et al., 2003; Sullivan et al., 2004). Dados genéticos e farmacológicos indicam que a ativação de receptores A_{2A} inibe a inflamação induzida por LPS, atuando em diferentes tipos celulares (Sullivan et al., 1999; Hogan et al., 2001). Agonistas seletivos de A_{2A} reduzem o extravasamento de neutrófilos em tecidos estimulados por LPS em modelos animais de meningite bacteriana Gram-negativa (Sullivan et al., 1999) e artrite séptica (Hogan et al., 2001). Além disso, agonistas deste receptor diminuem a concentração sérica de TNF- α em camundongos com endotoxemia (Haskó et al., 1996) e inibem a liberação de IL-12 e

TNF- α induzida por LPS em macrófagos isolados de camundongos (Haskó et al., 2000). Agonistas A_{2A} diminuem a liberação de produtos oxidativos e não oxidativos de neutrófilos ativados (Cronstein et al., 1983; Richter, 1992; Bouma et al., 1997; Sullivan et al., 2001) e reduzem a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos ativados e no endotélio vascular (Wollner et al., 1993; Bouma et al., 1996; Thiel et al., 1996). Além disso, diminuem a adesão dos neutrófilos a superfícies biológicas (Cronstein et al., 1992; Okusa et al., 2001) e promovem quimiotaxia (Rose et al., 1988; Sullivan et al., 1990).

As ecto-nucleotidases são as enzimas responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares de ATP e adenosina. A família das NTPDases e NPPs hidrolisam os nucleotídeos tri- e difosfatados até seus respectivos nucleotídeos monofosfatados e a 5'-nucleotidase hidrolisa os nucleotídeos monofosfatados até seus respectivos nucleosídeos (Zimmerman, 2001). Estas enzimas estão ancoradas na membrana celular, possuindo seu sítio ativo voltado para o meio extracelular, ou estão presentes na forma solúvel no meio intersticial (Zimmermann, 2001). Essas enzimas são distribuídas em uma ampla variedade de tecidos e células, sendo que a NTPDase1 e a 5'-nucleotidase são também conhecidas como antígeno de ativação celular linfóide (CD39) e proteína de superfície de linfócitos (CD73), respectivamente.

III.1.2. Lipolissacarídeo altera as atividades nucleotidásicas em linfócios e soro de ratos (Parte II, Capítulo 1)

No capítulo 1, avaliamos o efeito *in vitro* do LPS e do modelo da endotoxemia em linfócitos de linfonodos mesentéricos de ratos, pois se trata de um tipo celular importante para ativação de respostas do sistema imune. Optamos por trabalhar com

linfócitos de linfonodos mesentéricos, pois a preparação demonstrou ser a mais adequada para a realização dos procedimentos experimentais. Esta preparação apresenta-se enriquecida em linfócitos (mais de 95%) e com pouca contaminação por outros tipos celulares que poderiam interferir nos resultados, uma vez que os nucleotídeos poderiam estar sendo hidrolisados por ecto-enzimas presentes na membrana de outras células.

Para a realização dos ensaios enzimáticos, foi necessário realizar uma padronização das atividades enzimáticas para a hidrólise dos nucleotídeos tri- di- e monofosfatados testados. Todas as condições ideais necessárias à manutenção da linearidade das reações foram previamente testadas, como tempo de incubação, concentração de células, concentração de substrato, concentração de cátions. Essa padronização foi baseada no estudo de Fillippini et al. (1990), que testaram a hidrólise de ATP em linfócitos periféricos de humanos, e Purzyc et al. (2002), que observaram a hidrólise de ATP e AMP em linfócitos de baço de ratos. Durante a realização deste estudo, Leal et al. (2005) publicaram um trabalho sobre a caracterização de uma atividade NTPDásica em linfócitos de humanos. Foram realizadas algumas alterações nas condições de incubação descritas, tanto por Fillippini et al. (1990) quanto por Purzyc et al. (2002), para assegurar melhores condições à reação. Foram determinadas como condições ideais para a atividade enzimática um meio contendo 2 mM de CaCl_2 (para ATP e ADP) ou 2 mM de MgCl_2 (para AMP), 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 60 mM de glicose, 1 mM de azida sódica, 0,1% mM de albumina e 20 mM de tampão Hepes, pH 7.6, em um volume final de 200 μl . A concentração ideal de células e a concentração ideal de substrato foram determinados como sendo 10^6 células e 2 mM de nucleotídeo, respectivamente, e o tempo de incubação ideal foi de 30 minutos.

Além disso, analisamos nucleotidases solúveis presentes no soro, após exposição ao LPS *in vitro* e *in vivo*, uma vez que estas enzimas poderiam controlar os níveis de nucleotídeos circulantes e apresentar um importante papel na manutenção da fisiologia normal. Estas enzimas presentes em soro poderiam atuar em conjunto com enzimas de plaquetas e da parede vascular para evitar a agregação plaquetária espontânea e formação de trombos (Frassetto et al., 1993; Yegutkin & Burnstock, 2000; Oses et al., 2004).

Tanto em soro quanto nos linfócitos, avaliamos o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de LPS na hidrólise de ATP, ADP e AMP, sendo que em soro também foi testada a hidrólise do substrato artificial ρ -Nph-5'-TMP (para determinar a atividade da NPP).

Em linfócitos, nos experimentos *in vitro*, as hidrólises de ATP e do ADP aumentaram significativamente na presença de 50, 75 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. Já hidrólise do AMP teve um aumento significativo apenas na presença de 75 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, sendo que na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ de LPS a atividade não apresentou diferença significativa com relação ao controle. Esses experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se o LPS tinha algum efeito sobre as atividades ecto-nucleotidásicas, uma vez que tal efeito poderia influenciar os resultados dos experimentos *in vivo* que seriam posteriormente realizados.

Para a realização dos experimentos *in vivo*, foi utilizada uma concentração de 2 mg/mL, injetada intraperitonealmente, desenvolvendo um modelo de endotoxemia. A concentração utilizada foi baseada em outros estudos científicos que promoveram endotoxemia em ratos (Kittel, 1999; Zinchuk et al., 2001; Okada et al., 2002).

Em linfócitos, foram observadas as hidrólises dos três nucleotídeos após 24 e 48 horas de indução da endotoxemia. O ATP e o ADP apresentaram um aumento

significativo na sua hidrólise em ambos os tempos testados. Já o AMP apresentou um aumento significativo apenas em 24 horas e no tempo de 48 horas não foi observada nenhuma alteração significativa na hidrólise deste nucleotídeo.

Esses resultados indicam que, durante o processo inflamatório, há uma aumentada remoção dos nucleotídeos extracelulares, dependente do tempo de indução da endotoxemia. Durante eventos inflamatórios, há um aumento na liberação de ATP e este estaria atuando como uma molécula pró-inflamatória (Bodin & Burnstock, 1998). Portanto, um aumento na hidrólise deste nucleotídeo poderia estar relacionado com uma resposta compensatória no sentido de diminuir a disponibilidade de ATP, que estaria atuando como um sinalizador de processos inflamatórios e, conseqüentemente, contribuindo para um aumento na geração de adenosina extracelular, a qual poderia estar atuando como um agente antiinflamatório, 24 horas após a indução do modelo. Entretanto, após 48 horas da exposição ao LPS, foi observado um perfil diferente na hidrólise dos nucleotídeos, pois a hidrólise de AMP retornou aos níveis normais. Apesar dos resultados obtidos com o AMP, é possível sugerir que os níveis extracelulares de adenosina permanecem elevados, devido ao efeito estequiométrico exercido pela hidrólise aumentada de ATP e ADP e pela remoção do efeito inibitório que ambos os nucleotídeos exercem sobre a atividade da 5'-nucleotidase (Cunha, 2001). Para uma melhor compreensão destes resultados, pretendemos realizar a análise da expressão das NTPDases nestas células, a fim de investigar se as alterações observadas ocorrem em nível transcricional. Nosso interesse em realizar tais experimentos moleculares se deve também ao fato de que a razão de hidrólise observada para os nucleotídeos ATP e ADP está em um valor intermediário entre o descrito para a NTPDase3 e para a NTPDase8 (Zimmermann, 2001; Bigonnesse et al., 2004), e através da expressão gênica desta

família de enzimas é que poderemos concluir quais os membros que estão presentes na superfície destas células.

Para a realização do capítulo 1, também foram feitos experimentos observando a hidrólise dos nucleotídeos em soro. A origem das NTPDases solúveis, presentes no soro, ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que sejam originárias de membranas celulares, tendo sofrido clivagem próximo à região N-terminal (ver figura 4 da introdução). Foram testadas as atividades da NTPDase, da NPP (através da utilização do substrato artificial ρ -Nph-5'-TMP) e da 5'-nucleotidase. Em soro, tanto as concentrações de LPS testadas *in vitro*, quanto os tempos investigados no tratamento *in vivo*, foram os mesmos dos experimentos realizados com linfócitos.

Nos experimentos *in vitro*, não foi observada nenhuma alteração significativa na hidrólise de ATP, ADP e AMP, já a hidrólise do substrato artificial ρ -Nph-5'-TMP apresentou um decréscimo significativo em todas as concentrações testadas. Nos resultados *in vivo*, houve uma diminuição significativa na hidrólise de ATP, ADP e AMP em ambos os tempos testados. A hidrólise do substrato artificial ρ -Nph-5'-TMP demonstrou um decréscimo significativo apenas em 24 horas, sendo que em 48 horas a atividade apresentou valores praticamente iguais aos do grupo controle.

Nossos resultados obtidos no capítulo 1 demonstraram que houve um aumento na hidrólise dos nucleotídeos em linfócitos e uma diminuição em soro, após 24 e 48 horas de indução de endotoxemia. Estes dados nos conduzem à hipótese de que pode existir um maior requerimento das ectonucleotidases nas células, a fim de tentar promover uma diminuição dos efeitos prejudiciais do ATP. Dessa forma, a clivagem destas enzimas poderia estar diminuída, ocasionando uma redução na quantidade de nucleotidases solúveis e, conseqüentemente, promovendo uma redução na hidrólise dos nucleotídeos em soro. As diferenças obtidas *in vitro*, em soro, com relação às

NTPDases, 5'-nucleotidase (que não apresentaram alteração) e a NPP (que foi inibida por todas as concentrações de LPS testadas), demonstram que o LPS *per se* atua diretamente na enzima NPP e não nas outras nucleotidases.

As E-NPPs desempenham importantes funções fisiológicas, incluindo reciclagem de nucleotídeos, modulação da sinalização desempenhada por receptores purinérgicos, regulação dos níveis extracelulares de pirofosfato, estimulação da motilidade celular, e possíveis papéis na regulação da sinalização do receptor de insulina e atividade de ecto-quinases (Goding et al., 2003). Inibidores da fosfodiesterase têm sido descritos como possíveis agentes imunomodulatórios no controle da inflamação (Castro et al., 2005; Jeffery, 2005). Formas solúveis de NPP₁₋₃ têm sido descritas em soro (Belli et al., 1993; Meerson et al., 1996; Frittitta et al., 1999), mas ainda não é clara a significância fisiológica destas NPPs solúveis (Goding et al., 2003).

III.1.3. Efeito do Lipolissacarídeo na hidrólise de nucleotídeos em plaquetas de ratos (Parte II, Capítulo 2)

Tem sido demonstrada a crescente participação das plaquetas durante o processo inflamatório (Esmon, 2001; Esmon 2003). Os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina atuam na regulação do tônus vascular e na agregação plaquetária, sendo que ATP e ADP agem como moléculas vasoativas e ativadoras de plaquetas (Burnstock, 1990; Colman, 1990), respectivamente, e o nucleosídeo adenosina atua como um vasodilatador (Engler, 1991) e um inibidor da agregação plaquetária (Kitakaze et al., 1991). Com base nisso e nos resultados observados no capítulo 1, analisamos se a inflamação poderia estar influenciando na hidrólise de nucleotídeos em plaquetas. Dessa

forma, foram realizados os mesmos procedimentos experimentais do capítulo 1, sendo observados os resultados discutidos a seguir.

Nos experimentos *in vitro*, foi observado um decréscimo significativo na hidrólise de ADP nas concentrações de 75 e 100 µg/ml, a hidrólise do AMP foi alterada apenas na presença de 75 µg/ml. Entretanto, não houve alteração significativa na hidrólise de ATP em todas as concentrações testadas. A hidrólise do substrato artificial ρ -Nph-5'-TMP também não foi alterada pela presença *in vitro* de LPS nas concentrações testadas. Com base nesses resultados, pode-se sugerir que o LPS poderia interferir na hidrólise dos nucleotídeos, promovendo uma redução nos níveis extracelulares de ADP e AMP e o conseqüente aumento da adenosina. Futuros experimentos *in vivo* serão realizados a fim de compreender melhor as alterações promovidas pelo processo inflamatório nas ectonucleotidases de plaquetas.

III.2. Conclusões Gerais

Este estudo apresentou as seguintes conclusões:

1. Em linfócitos de linfonodos mesentéricos, foi observado um aumento na hidrólise de todos os nucleotídeos testados, na presença de diferentes concentrações de LPS *in vitro*. As hidrólises de ATP e ADP apresentaram um aumento significativo nas concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL de LPS. Entretanto, a hidrólise de AMP teve um aumento significativo apenas na concentração de 75 µg/mL;

2. Não houve alteração na hidrólise dos nucleotídeos tri- di- e monofosfatados em soro após exposição *in vitro* ao LPS. Já em plaquetas, foi observado um aumento na hidrólise de ADP (50 e 75 µg/mL de LPS) e AMP (75 µg/mL de LPS). A hidrólise do substrato artificial *p*-Nph-5'-TMP foi diminuída em soro nas concentrações testadas, mas não foi alterada em plaquetas;

3. A administração de LPS induziu um aumento na hidrólise de todos os nucleotídeos após 24 horas da indução do modelo de endotoxemia. Após 48 horas, somente as hidrólises de ATP e ADP foram significativamente alteradas em linfócitos de linfonodos mesentéricos;

4. Neste modelo, foi observada uma diminuição significativa na hidrólise de todos os nucleotídeos da adenina testados em ambos os tempos (24 e 48 horas) em soro. Já a

hidrólise do substrato artificial ρ -Nph-5'-TMP apresentou uma diminuição significativa apenas em 24 horas.

De uma forma geral, os resultados apresentados neste estudo nos permitem observar que as ectonucleotidases apresentam suas atividades diferentemente alteradas *in vitro* e após a indução de endotoxemia pela administração de LPS. As alterações observadas sugerem que estas enzimas podem atuar na regulação dos níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos em um modelo capaz de desencadear processos inflamatórios.

III.3. Perspectivas

Este trabalho gerou uma série de perspectivas de estudos, visando avaliar o sistema purinérgico após a indução de septicemia e endotoxemia em diferentes células do sistema imune, tais como células dendríticas e linfócitos. Para a realização desse estudo, são apresentados os seguintes objetivos:

- ◆ Padronizar a atividade das enzimas E-NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e E-NPP em linfócitos de camundongos;
- ◆ Caracterizar a atividade das enzimas E-NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e E-NPP em células dendríticas de camundongos;
- ◆ Determinar as atividades das ectonucleotidases em linfócitos e células dendríticas nos modelos de ligadura de ceco (CLP) e endotoxemia;
- ◆ Determinar a expressão gênica das ectonucleotidases e dos receptores A_{2A} e A_3 em células dendríticas e linfócitos nos modelos de CLP e endotoxemia;
- ◆ Verificar o efeito de agonistas e antagonistas de receptores de adenosina sobre as ectonucleotidases nos modelos de CLP e endotoxemia.

Estes estudos certamente contribuirão para uma maior compreensão da participação dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares bem como da contribuição das ectonucleotidases na modulação dos processos inflamatórios.

Referências Bibliográficas

- Almqvist P, Kuenzig M, Schwartz SI. **Effect of naloxone on endotoxin-induced pulmonary platelet sequestration.** Acta Chir Scand.; 149: 23–6, 1983.
- Alving CR. **Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants.** Immunobiology; 187: 430-46, 1993.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. **Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.** Nat Immunol.; 2 (8): 675-80, 2001.
- André P. **P-selectin in haemostasis.** Br J Haematol.; 126: 298–306, 2004.
- Beijer L, Botting J, Crook P, Oyekan AO, Page CP, Rylander R. **The involvement of platelet activating factor in endotoxin-induced pulmonary platelet recruitment in the guinea-pig.** Br J Pharmacol; 92: 803–8, 1987.
- Belli SI, van Driel IR, Goding JW. **Identification and characterization of a soluble form of the plasma cell membrana glycoprotein PC-1 (5'-nucleotide phosphodiesterase).** Eur J Biochem.; 217: 421-8, 1993.
- Bennett JS, Shattil SJ. **Platelet function.** In: Williams WJ, ed. Hematology. New York: McGraw-Hill Inc.; 1233–41, 1990.
- Beutler B, Rietschel ET. **Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin.** Nat Rev Immunol.; 3 (2): 169-76, 2003.
- Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sevigny J. **Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8.** Biochemistry; 43 (18): 5511-9, 2004.
- Bodin P, Burnstock G. **Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation.** Inflamm Res.; 47 (8): 351-4, 1998.

- Boldt J, Muller M, Rothe A, Lenzen P, Hempelmann G. **Does continuous heparinization influence platelet function in the intensive care patient?** Intensive Care Med.; 23: 567–73, 1997.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.** Chest; 101: 1644–1655, 1992.
- Bone RC. **Gram-Negative Sepsis: a Dilemma of Modern Medicine.** Clin Microb Rev.; 57-68, 1993.
- Bone, RC, Grodzin CJ, Balk RA. **Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process.** Chest; 112 (1): 235-43, 1997.
- Born GVR. **Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.** Nature; 194: 27–9, 1962.
- Bouma MG, Vandenwildenberg F, Buurman WA. **Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells.** Am J Physiol.; 270: C522–9, 1996.
- Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, et al. **Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A₂ and A₃ receptors.** J Immunol.; 158: 5400–8, 1997.
- Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC, eds. **Endotoxin in Health and Disease.** New York/Basel: Marcel Dekker. 950 pp., 1999.
- Braude AE, Jones JL, Douglas, H. **The behavior *Escherichia coli* endotoxin (somatic antigen) during infectious arthritis.** J Immunol.; 90: 297-312, 1960.

- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Hein M, Petersen F, Thon L, Adam D, Bulfone-Paus S. **Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells.** *J Immunol.*; 174 (7): 3880-90, 2005.
- Burnstock, G. **Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium.** *J Hypertens Suppl.*; 8 (7): S95-106, 1990. Review.
- Burnstock G, Williams M. **P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential.** *J Pharmacol Exp Therap.*; 295: 862-9, 2000.
- Burnstock G. **Overview of P2 receptors: possible functions in immune cells.** *Drug Dev Res.*; 53: 53-9, 2001.
- Burnstock G. **Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 22: 364–73, 2002.
- Burnstock G. **Introduction: P2 receptors.** *Cur Top Med Chem.*; 4: 793-803, 2004a.
- Burnstock G. **Cotransmission.** *Curr Opin Pharmacol.*; 4 (1): 47-52, 2004b. Review.
- Capecchi PL, Camurri A, Pompella G, Mazzola A, Maccherini M, Diciolla F, Lazzerini PE, Abbracchio MP, Laghi-Pasini F. **Upregulation of A2A Adenosine Receptor Expression by TNF- α in PBMC of Patients with CHF: A Regulatory Mechanism of Inflammation.** *J Card Fail.*; 11 (1): 67-73, 2005.
- Castro A, Jerez MJ, Gil C, Martinez A. **Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in immunomodulatory responses: advances in the development of specific phosphodiesterase inhibitors.** *Med Res Rev.*; 25 (2): 229-44, 2005. Review.
- Cattaneo M, Lecchi A, Lombardi R, Gachet C, Zighetti ML. **Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A2 production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet ‘primary secretion defect’**

- are heterozygous for a defect of P2CYC receptors.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 20:E101–6, 2000.
- Coade SB, Pearson JD. **Metabolism of adenine nucleotides in human blood.** *Circ Res.*; 65: 531–7, 1989.
- Colman RW **Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation.** *FASEB J.*; 4: 1425–35, 1990.
- Conley PB, Delaney SM. **Scientific and therapeutic insights into the role of the platelet P2Y12 receptor in thrombosis.** *Curr Opin Hematol.*; 10: 333–38, 2003.
- Cowan DH, Bowman LS, Fratianne RB, Ahmed F. **Platelet aggregation as a sign of septicemia in thermal injury.** A prospective study. *JAMA*; 235: 1230–4, 1976.
- Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, Hirsschhorn R. **Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils.** *J Exp Med.*; 158: 1160-77, 1983.
- Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. **Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A₁ receptors and inhibited via adenosine A₂ receptors.** *J Immunol.*; 148: 2201–6, 1992.
- Cronstein, BN. **Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent.** *J Cell Physiol.*; 76: 5-13, 1994.
- Cross AS, Opal S, Cook P, Drabick J, Bhattacharjee A. **Development of an anti-core lipopolyssaccharide vaccine for the prevention and treatment of sepsis.** *Vaccine*; 22: 812-17, 2004.
- Cunha RA. **Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals.** *Neurochem Res.*; 26 (8-9): 979-91, 2001.

- Di Virgilio F, Falzoni S, Mutini C, Sanz JM, Chiozzi P, **Purinergic P2X₇ receptor: a pivotal role in inflammation and immunomodulation.** Drug Dev Res.; 45: 207-13, 1998.
- Elstad MR, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. **The interaction of leukocytes with platelets in blood coagulation.** Curr Opin Hematol.; 2 (1): 47-54, 1995.
- Engler RL. **Adenosine the signal of life?** Circulation; 84: 951-4, 1991.
- Esmon CT. **Role of coagulation inhibitors in inflammation.** Thromb Haemost.; 86 (1): 51-6, 2001.
- Esmon CT. **Inflammation and thrombosis.** J Thromb Haemost.; 1: 1343-8, 2003.
- Filippini A, Taffs RE, Agui T, Sitkovsky MV. **Ecto-ATPase activity in cytolytic lymphocytes.** J Biol Chem.; 265: 334-40, 1990.
- Frassetto S, Dias RD, Sarkis JJF. **Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets.** Mol Cell Biochem.; 129: 47-55, 1993.
- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. **Structure and function of adenosine receptors and their genes.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.; 362 (4-5): 364-74, 2000.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. **International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors.** Pharmacol Rev.; 53 (4): 527-52, 2001.
- Frittitta L, Camastra S, Baratta R, Costanzo BV, D'Adamo M, Graci S, Spampinato D, Maddux BA, Vigneri R, Ferrenini E, Trischitta V. **A soluble PC-1 circulates in human plasma: relationship with insulin resistance and associated abnormalities.** J Clin Endocrinol Metabol.; 84: 3620-5, 1999.

- Gaarder A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owen PA. 1961. **Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets.** *Nature*; 192: 531–2, 1961.
- Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. **Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome.** *Intensive Care Med.*; 23: 379–85, 1997.
- Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, et al. **Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells.** *Circulation*; 98: 1164–71, 1998.
- Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, et al. **Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis.** *Atherosclerosis*; 148: 75–85, 2000.
- Goding JW. **Ecto-enzymes: physiology meets pathology.** *J Leukoc Biol.*; 67 (3): 285–31, 2000.
- Goding JW, Grobden B, Slegers H. **Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family.** *Biochim Biophys Acta*; 1638: 1–19, 2003.
- Haskó G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES. **Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice.** *J Immunol.*; 157: 4634–40, 1996.

- Haskó G, Kuhel DG, Chen JF, et al. **Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A_{2A} receptor-dependent and independent mechanisms.** FASEB J.; 14: 2065-74, 2000.
- Haskó G, Cronstein BN. **Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity.** Trends Immunol; 25 (1): 33-9, 2004.
- Hartwig J, Italiano J Jr. **The birth of the platelet.** J. Thromb. Haemost.; 1: 1580–6, 2003.
- Hechler B, Cattaneo M, Gachet C. **The P₂ receptors in platelet function.** Semin Thromb Hemost.; 31: 150–61, 2005.
- Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H. **Functional characterization of rat ecto-ATPase diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells.** Eur J Biochem.; 262 (1): 102-7, 1999.
- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, et al. **CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.** Nature; 391: 591–4, 1998.
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. **The interface between innate and adaptive immunity.** Nat Immunol.; 5: 971–4, 2004.
- Hogan CJ, Fang GD, Scheld WM, Linden J, Diduch DR. **Inhibiting the inflammatory response of joint sepsis.** Arthroscopy; 17: 311-5, 2001.
- Huo Y, Ley KF. **Role of platelets in the development of atherosclerosis.** Trends Cardiovasc Med.; 14: 18–22, 2004.
- Itoh H, Cicala C, Douglas GJ, Page CP. **Platelet accumulation induced by bacterial endotoxin in rats.** Thromb Res.; 83: 405–19, 1996.

- Jabs CM, Sigurdsson GH, Neglen P. **Plasma levels of high-energy compounds compared with severity of illness in critically ill patients in intensive care unit.** *Surgery*; 124: 65-72, 1998.
- Jeffery P. **Phosphodiesterase 4-selective inhibition: novel therapy for the inflammation of COPD.** *Pulm Pharmacol Ther.*; 18 (1): 9-17, 2005. Review.
- Kirley TL. **Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39.** *J Biol Chem.*; 272 (2): 1076-81, 1997.
- Kitakaze M, Hori M, Sato H, Takashima S, Inoue M, Kitabatake A, et al. **Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs.** *Circ Res.*; 69: 1402-8, 1991.
- Kittel A. **Lipopolysaccharide treatment modifies pH- and cation-dependent ecto-ATPase activity of endothelial cells.** *J Histochem Cytochem.*; 47 (3): 393-9, 1999.
- Lavoie EG, Kukulski F, Levesque SA, Lecka J, Sevigny J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol.*; 67 (10): 1917-26, 2004.
- Leal DB, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CA, da Silva JE, Morsch VM, Schetinger MR. **Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes.** *Biochim Biophys Acta*; 1721 (1-3): 9-15, 2005.
- Leytin V, Shakoor S, Mody M, Allen D, Garvey B, Freedman J. **Sepsis- and endotoxemia-generated cytokines do not trigger activation of human platelets.** *Crit Care Med.*; 30 (12): 2771-3, 2002.

- Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, et al. **Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis.** *J Cell Biol.*; 154: 485–90, 2001.
- Luttikhuisen, DT; Harmsen, MC; de Leij, LFMH; van Luyn, MJA. **Expression of P2 receptors at sites of chronic inflammation.** *Cell Tissue Res.*; 317: 289–298, 2004.
- Martin C, Leone M, Viviani X, Ayem ML, Guieu R. **High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock.** *Crit Care Med.*; 28 (9): 3198-202, 2000.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. **The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.** *N Engl J Med.*; 348: 1546-54, 2003.
- Matera C, Falzarano C, Berrino L, Rossi F. **Effects of tetanus toxin, Salmonella typhimurium porin, and bacterial lipopolysaccharide on platelet aggregation.** *J Med.*; 23: 327–38, 1992.
- McIntyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmerman GA. **Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions.** *Curr Opin Hematol.*; 10: 150-8, 2003.
- Meerson NR, Delautier D, Durand-Schneider AM, Moreau A, Schilsky MI, Sternlieb I, Feldmann G, Maurice M. **Identification of B10, an alkaline phosphodiesterase of the apical plasma membrane of hepatocytes and biliary cells, in rat serum: increased levels following bile duct ligation and during the development of cholangiocarcinoma.** *Hepatology*; 27: 563-8, 1997.
- Nikaido H, Vaara M. **Outer membrane.** In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology.* Neidhardt C, Ingraham JL, Brooks Low K, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE eds. pp. 7-22. Washington DC: Am Soc Microbiol., 1987.

- Okada T, Zinchuck V, Seguchi H. **Lipopolysaccharide administration increases acid an alkaline phosphatase reactivity in the cardiac muscle.** *Microsc Res Tech.*, 58: 421-6, 2002.
- Okusa MD, Linden J, Huang L, Rosin DL, Smith DF, Sullivan G. **Enhanced protection from renal ischemia-reperfusion injury with A_{2A}-adenosine receptor activation and PDE 4 inhibition.** *Kidney Int.*; 59: 2114–25, 2001.
- Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rücker B, Fürstenau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AMO, Sarkis JJF. **Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum.** *Life Sci.*; 74: 3275-84, 2004.
- Purzyc L, Calkosiński I, Polak-Jonkisz D. **Influence of diethyldithiocarbamate on the activity of ecto-ATPase in lymphocytes of rats: ex vivo studies.** *Pol J Pharmacol.*; 54 (5): 455-67, 2002.
- Quinlan GJ, Lamb NJ, Tilley R, Evans TW, Gutteridge JM. **Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity and mortality.** *Am J Respir Crit Care Med.*; 155: 479-84, 1997.
- Raetz CR, Whitfield C. **Lipopolysaccharide Endotoxins.** *Annu Rev Biochem.*; 71: 635–700, 2002.
- Ralevic V, Burnstock G. **Receptors for purines and pyrimidines.** *Pharmacol Rev.*; 50 (3): 413-92, 1998.
- Richter J. **Effect of adenosine analogues and cAMP-raising agents on TNF-, GM-CSF-, and chemotactic peptide-induced degranulation in single adherent neutrophils.** *J Leukocyte Biol.*; 51: 270–5, 1992.
- Rietschel ET, Brade H. **Bacterial endotoxins.** *Sci Am.*; 267: 26-33, 1992.

- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zihringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H. **Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function.** FASEB J.; 8: 217-225, 1994.
- Rodriguez-Nunez A, Cid E, Rodriguez-Garcia J, Camina F, Rodriguez-Segade S, Castro-Gado M. **Concentrations of nucleotides, nucleosides, purine bases, oxypurines, uric acid and neuron-specific enolase in the cerebrospinal fluid of children with sepsis.** J Child Neurol.; 16: 704-6, 2001.
- Rose FR, Hirschhorn R, Weissmann G, Cronstein BN. **Adenosine promotes neutrophil chemotaxis.** J Exp Med.; 167: 1186-94, 1998.
- Salden HJ, Bas BM. **Endotoxin binding to platelets in blood from patients with a sepsis syndrome.** Clin Chem.; 40 (8): 1575-9, 1994.
- Sheu JR, Lee CR, Lin CH, Hsiao G, Ko WC, Chen YC, Yen MH. **Mechanisms involved in the antiplatelet activity of Staphylococcus aureus lipoteichoic acid in human platelets.** Thromb Haemost.; 83 (5): 777-84, 2000.
- Shi JD, Kukar T, Wang CY, Li QZ, Cruz PE, Davoodi-Semiromi A, Yang P, Gu Y, Lian W, Wu DH, She JX. **Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1).** J Biol Chem.; 276: 17474-8, 2001.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. **Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors.** J Biol Chem.; 276: 125-32, 2001.
- Sullivan GW, Linden J, Hewlett EL, Carper HT, Hylton JB, Mandell GL. **Adenosine and related compounds counteract tumor necrosis factor- α inhibition of neutrophil migration: implication of a novel cyclic AMP-independent action on the cell surface.** J Immunol.; 145: 1537-44, 1990.

- Sullivan GW, Linden J, Buster BL, Scheld WM. **Neutrophil A_{2A} adenosine receptors inhibits inflammation in a rat model of meningitis: synergy with the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram.** J Infect Dis.; 180: 1550-60, 1999.
- Sullivan GW, Rieger JM, Scheld WM, Macdonald TL, Linden J. **Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A(2A) receptor agonists.** Br J Pharmacol.; 132: 1017-26, 2001.
- Sullivan GW. **Adenosine A_{2A} receptor agonists as anti-inflammatory agents.** Cur Opin Invest Drugs; 4 (11): 1313-9, 2003.
- Sullivan GW, Fang G, Linden J, Scheld WM. **Adenosine receptor activation improves survival in mouse of endotoxemia and sepsis.** J Infect Dis.; 189: 1897-904, 2004.
- Symeonides S, Balk RA. **Nitric oxide in the pathogenesis of sepsis.** Infect Dis Clin North Am.; 13: 299-312, 1999.
- Thiel M, Chambers JD, Chouker A, et al. **Effect of adenosine on the expression of β_2 integrins and L-selectin of human polymorphonuclear leukocytes in vitro.** J Leukocyte Biol.; 59: 671-82, 1996.
- Thiel M, Caldwell CC, Sitkovsky MV. **The critical role of adenosine A_{2A} receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases.** Microbes Infect.; 5 (6): 515-26, 2003.
- Underhill DM. **Toll-like receptors and microbes take aim at each other.** Curr Opin Immunol.; 16: 483-487, 2004.
- Van der Poll T, Van Deventer SJH. **Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis.** Infect Dis Clin North Am.; 13 (2): 413-26, 1999.

- White GC. **Platelet physiology and function.** Blood Coagul Fibrinolysis; 11 Suppl. 1: S53, 2000.
- Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. **The evolving role of platelets in inflammation.** J Thromb Haemost.; 1: 1897-905, 2003.
- Wolberg G, Zimmerman TP, Hiemstra K, Winston M, Chu LC. **Adenosine inhibition of lymphocyte-mediated cytotoxicity: possible role of cyclic adenosine monophosphate.** Science; 187: 957-9, 1975.
- Wollner A, Wollner S, Smith JB. **Acting via A₂ receptors, adenosine inhibits the upregulation of Mac-1 (CD11b/CD18) expression on FMLP-stimulated neutrophils.** Am J Respir Cell Mol Biol.; 9: 179–85, 1993.
- Yaguchi A, Lobo FLM, Vincent J-L, Pradier O. **Platelet function in sepsis.** J Thromb Haemost.; 2: 2096–102, 2004.
- Zimmermann H. **Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function.** Trends Pharmacol Sci.; 20 (6): 231-6, 1999.
- Zimmermann H. **Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature.** Drug Dev Res.; 52: 46-56, 2001.
- Zinchuck VS, Okada T, Seguchi H. **Lipopolysaccharide alters ecto-ATP-diphosphohydrolase and causes relocation of its reaction product in experimental intrahepatic cholestasis.** Cell Tis Res.; 304: 103-9, 2001.

Anexos

Lista de Figuras:

Figura 1: Modelo de membranas interna e externa de *Escherichia coli* K-12.....07

Figura 2: Detecção do lipídeo a pelo receptor do sistema imune inato de células animais TLR4.....08

Figura 3: As maiores vias envolvidas no metabolismo da adenosina.....14

Figura 4: Topografia de membrana de ecto-nucleotidasas.....17