



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM
PACIENTES COM MENINGITE ASSÉPTICA E
BACTERIANA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ARACÉLLI GNATTA DORNELES

**Santa Maria - RS, Brasil
2007**

HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM PACIENTES COM MENINGITE ASSÉPTICA E BACTERIANA

por

Aracélli Gnatta Dorneles

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
MESTRE EM BIQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vânia Lucia Loro
Co-orientador: Prof^a. Dr^a Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria – RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica**

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

**HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM PACIENTES COM
MENINGITE ASSÉPTICA E BACTERIANA**

elaborada por

Aracéli Gnatta Dorneles

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Vânia Lucia Loro
(Orientador – Presidente)

Prof^a. Dr^a. Maribel Antonelo Rubin (UFMS)

Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela (UFRGS)

Santa Maria, 30 de novembro de 2007

Dedico este trabalho aos meus queridos pais por sempre me apoiarem em todos os meus sonhos, nunca me impondo limites, mas sempre me orientando pelo caminho mais correto e menos penoso de seguir. Obrigada por todo o amor, carinho, compreensão, sacrifícios e renúncias.

Amo muito vocês!

Dedico este trabalho também a minha tia Marlí, minha segunda mãe, é sempre muito dedicada e preocupada com o meu sucesso, com a minha felicidade e minhas realizações.

Te amo!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha mãe, Sueli, por ser meu porto-seguro em todas as horas e principalmente pelo exemplo de força, dedicação e perseverança, sempre me incentivando ao crescimento profissional e pessoal. É para mim muito mais que uma mãe, é uma grande amiga.

AGRADECIMENTO

A professora Dr^a Vânia Lucia Loro, minha orientadora, pela oportunidade de aprendizado, por ter acreditado no meu potencial, pela orientação deste trabalho e principalmente por todas as vezes que idealizou junto comigo a realização deste projeto, me dando esperança para continuar;

Ao meu irmão Fabrício pelo carinho, pelo apoio, pelo incentivo e por ser para mim um exemplo de bom caráter e bom coração;

A minha vó Delvina e a vó Blanca por sempre torcerem pela minha felicidade e sucesso, e por sempre se preocuparem comigo;

A minha irmã de coração Alessandra, que sempre tem uma opinião sincera e uma solução prática para tudo aquilo que me aflige, e por ter uma maneira única de transformar minhas angústias em boas gargalhadas;

A minha grande amiga Juliana, que sempre tem tempo e ouvidos para as minhas reclamações. Minha companheira nas horas de descontração, nos momentos difíceis e também na batalha pela satisfação profissional. Tenho em ti um exemplo!

As minhas amigas tão queridas Gisele, Graciela e Karla, que me fazem acreditar todos os dias o valor de uma grande amizade, ao encherem a minha vida de paz e alegria. Adoro muito vocês!

Aos meus amigos que moram longe, mas sempre que estão perto me mostram que a distância jamais interfere nessa nossa tão sincera amizade: Betina, Débora, Ana Helena, Isabel, Daiane e Guilherme;

Ao Juju, meu amor. Agradeço pelo carinho, pelo amor, pelo apoio, pela paciência, pelos conselhos e pela dedicação. Além de ser uma pessoa muito importante para o meu crescimento intelectual e pessoal, sempre traz muita tranquilidade e muita alegria a minha vida!

A Charlene, minha colega e amiga de laboratório, que foi fundamental para que esse trabalho tenha sido realizado. Agradeço pelos ensinamentos, pelo ótimo exemplo de dedicação, competência e principalmente pela calma e pelo bom-humor nos momentos mais complicados;

A Bibiana e Alexandra, foram mais que colegas, foram amigas que me receberam de maneira muito acolhedora no laboratório e que sempre estiveram à

disposição para ensinar, compartilhar, trocar idéias e informações, mas o mais importante, sempre estiveram prontas para oferecer seu carinho na forma de um abraço, de um sorriso, de ouvidos atentos e conselhos sempre muito bem recebidos.

As amigas Lissandra e Alice obrigada pela amizade, pelo carinho e pela colaboração.

As queridas colegas de laboratório Rita e Milene, agradeço pelo companheirismo, pela amizade e pelos ensinamentos;

As alegres colegas e amigas, Roberta e Bárbara, pela amizade e por encherem o laboratório de energia positiva. Vocês são pessoas especiais e iluminadas por carregarem uma maravilhosa alegria de viver, e uma enorme força de vontade;

A Marta por todo o suporte técnico na realização do projeto, no fornecimento das amostras, nas entrevistas e na realização de algumas análises, colaborando de maneira indispensável com este trabalho;

A minha co – orientadora, professora Maria Rosa, pela disponibilidade em me ajudar, contribuindo para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela e a Prof(a). Dr(a) Maribel Antonelo Rubim por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Minha profunda gratidão aos amigos e pessoas que de uma forma ou de outra auxiliaram para a realização deste trabalho e que com pesar não mencionei nesses agradecimentos seletivos;

Por fim e nunca menos importante, agradeço a Deus pela vida, pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho e pelas oportunidades, fazendo que tudo isso componha a personalidade e o caráter que tenho hoje.

*“A nossa fé e perseverança
despertam o otimismo
que conduz à vitória final”.*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

HIDROLISE DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM PACIENTES COM MENINGITE ASSEPTICA E BACTERIANA

AUTORA: ARACELLI GNATTA DORNELES

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. VANIA LUCIA LORO

Data e Local da defesa: Santa Maria, 30 de novembro de 2007.

A meningite é uma grave doença inflamatória das meninges, as membranas que recobrem e protegem o encéfalo e a medula espinhal. Os principais agentes causadores da meningite são os vírus e as bactérias. Vários trabalhos afirmam que a adenosina, produto final da degradação do ATP (quando degradado pelas ectonucleotidases), possui um importante papel protetor nas desordens cerebrais. A degradação do ATP até adenosina é catalisada pela família das ecto-nucleotidases, a NTPDase hidrolisa nucleotídeos extracelulares tri e di-fosfatados (ATP e ADP) até nucleotídeos mono-fosfatados (AMP), e a 5'-nucleotidase catalisa a hidrólise do AMP até adenosina.

Neste trabalho verificou-se a hidrólise dos nucleotídeos de adenina no líquido de pacientes com meningite asséptica e bacteriana, a fim de comparar a hidrólise destes nucleotídeos com pacientes controles (ausência de processo inflamatório neural). Foram utilizados pacientes com idade entre 18 e 59 anos de ambos os sexos em uma amostragem de 15 pacientes controles, 15 pacientes com meningite asséptica e 15 paciente com meningite bacteriana. Para os critérios de inclusão e exclusão foram analisados parâmetros tais como: aspecto do líquido, contagem total de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos, valores de proteína, glicose e lactato.

Obtivemos como resultado uma diminuição significativa da hidrólise do ATP nos pacientes com meningite asséptica e bacteriana quando comparados com pacientes controles. Ao contrário obtivemos um aumento significativo da hidrólise do ADP e do AMP nos dois grupos de meningites quando comparados com os

controles. A hidrólise aumentada do ADP e do AMP refere-se talvez a tentativa de aumentar a produção de adenosina, que por sua vez possui um conhecido papel neuroprotetor frente a insultos cerebrais.

Palavras-chave: meningite, NTPDase, Liquor, Adenosina

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa da Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

ADENINE NUCLEOTIDE HYDROLYSIS IN PATIENTS WITH BACTERIAL AND ASEPTIC MENINGITIS

AUTHOR: ARACÉLLI GNATTA DORNELES

ADVISOR: PROF^a. DR^a. VÂNIA LUCIA LORO

Date and Place of the defense: November 30th, 2007, Santa Maria

The meningitis is a serious inflammatory illness of meninges, the membranes that recover and protect encephalo and the spinal cord. The main causing agents of the meningitis are the viruses and the bacteria. Some works affirm that the adenosine, the final product of ATP hydrolysis (when degraded by ectonucleotidases), have an important protective role in brain disorders. Breakdown of extracellular ATP to adenosine is catalyzed by ecto-nucleotidases family, the NTPDase hydrolyze extracellular nucleotide tri and diphosphates (ATP and ADP) to nucleotide monophosphate (AMP) and the 5'-nucleotidase catalyzes the hydrolysis of AMP to adenosine.

In this work we verified adenine nucleotides hydrolysis in the CSF of aseptic and bacterial meningitis patients, in order to compare with adenine nucleotides hydrolysis in controls patient (absence of neural inflammatory process). Were used patients with age between 18 and 59 years of both the sex in a sampling of 15 patient controls, 15 patients with aseptic meningitis and 15 patients with bacterial meningitis. For the criteria of inclusion and exclusion had been analyzed parameters like, aspect of the CSF, total counting of leukocytes, distinguishing counting of leukocytes, values of protein, glucose and lactate.

We got as resulted a significant reduction of hydrolysis of the ATP in the patients with aseptic and bacterial meningitis when compared with patient controls. In contrast we got a significant increase of hydrolysis of the ADP and the AMP in the two groups of meningitis when compared with the controls. The increase in ADP and

AMP hydrolysis maybe means the attempt of increase the adenosine production, that have a recognized neuroprotective actions in brain insults.

Keywords: meningitis, NTPDase, cerebrospinal fluid, CSF, Adenosine

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO:

TABLE I - Characteristics of the three groups: age (years) and sex (male/female), and absence of CNS inflammatory disease.....	56
TABLE II - Characteristics of the CSF in biochemistry and hematological analysis.....	57
TABLE III - Distribution of NTPDase and 5'-Nucleotidase activities after CSF centrifugation.....	58

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

FIGURA 01 - Meninges cranianas.....	23
FIGURA 02 - Meninges espinhais.....	24
FIGURA 03 - Circulação líquórica.....	25
FIGURA 04 - Punção lombar.....	26
FIGURA 05 - Estrutura dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina.....	29
FIGURA 06 - Estruturas das enzimas da família NTPDase.....	32
FIGURA 07 - E-NTPDase.....	33
FIGURA 08 - Estrutura da 5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI.....	35

MANUSCRITO:

FIGURE 01 - ATP hydrolysis in CSF from aseptic (n=15) and bacterial (n=15) meningitis, and from control group (n=15).....	60
FIGURE 02 - ADP hydrolysis in CSF from aseptic (n=15) and bacterial (n=15) meningitis, and from control group (n=15).....	61
FIGURE 03 - 5'-Nucleotidase activity in CSF from aseptic (n=15) and bacterial (n=15) meningitis using AMP as substrate.....	62
FIGURE 04 - Alteration in lactate levels in CSF from aseptic (n=15) and bacterial (n=15) meningitis, and from control group (n=15).....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACR - regiões conservadas de apyrase
- ADP - Adenosina 5'-difosfato
- AMP - Adenosina 5'-monofosfato
- ATP - Adenosina 5'-trifosfato
- Ca - Cálcio
- CaCl - Cloreto de cálcio
- CSF - Cerebrospinal fluid
- EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid
- E-NTPDase - Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- GPI - glicofosfatidil inositol
- KCl - Cloreto de potássio
- KH_2PO_4 - Dihidrogenofosfato de potássico
- Líquor - Líquido cefalorraquidiano
- Mean - Média
- Mg - Magnésio
- MgCl_2 - Cloreto de magnésio
- NTPDase - Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- Pi - Fosfato inorgânico
- PIC - Pressão intracraniana
- SD - Standard Deviation (desvio padrão)
- TCA - Thricloroacetic acid
- SNC - Sistema nervoso central

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	72
ANEXO B - Carta de aprovação do comitê de ética.....	74

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
LISTA DE ANEXOS	16
APRESENTAÇÃO	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Objetivos	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Meninges	23
2.2. Líquido cefalorraquidiano	24
2.2.1. Punção lombar.....	26
2.3. Meningite	27
2.3.1 Meningite Asséptica.....	27
2.3.2 Meningite Bacteriana.....	28
2.4. Nucleotídeos da adenina	29
2.4.1 Adenosina 5'-trifosfato (ATP).....	30
2.4.2 Adenosina 5'-difosfato (ADP).....	30
2.4.3 Adenosina 5'-monofosfato (AMP).....	30

2.4.4 Adenosina.....	31
2.5. Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina.....	31
2.5.1. NTPDase (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD39, E.C. 3.6.1.5).....	32
2.5.2. 5'-Nucleotidase.....	34
2.6 Receptores Purinérgicos no sistema nervoso central.....	35
3. RESULTADOS.....	37
3.1. Manuscrito: Adenine nucleotides hydrolyze of patients with aseptic and bacterial meningitis.....	37
Abstract.....	39
Introduction.....	40
Material and methods.....	42
Results.....	45
Discussion.....	46
Conclusion.....	49
References.....	50
4. DISCUSSÃO.....	64
5. CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	72

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, os objetivos e a revisão bibliográfica. A seguir, os resultados são apresentados na forma de manuscrito, o qual foi escrito seguindo-se as normas do periódico ao qual o mesmo foi submetido à publicação. Os itens discussão e conclusões, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao manuscrito. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem nos itens introdução, revisão de literatura e discussão.

1. INTRODUÇÃO

A adenosina 5'-trifosfato (ATP) é um nucleotídeo purina encontrado em concentrações na faixa do milimolar em praticamente todas as células (Torres et al., 2002). Além de estarem relacionados ao metabolismo energético intracelular, o ATP e seus produtos de hidrólise, adenosina difosfato (ADP) e adenosina, exercem funções de regulação em vários processos biológicos, como neurotransmissão, contração muscular, metabolismo ósseo, metabolismo do glicogênio hepático, função cardíaca, agregação plaquetária e inflamação entre outros (Agteresch et al., 1999; Torres et al., 2002).

Já é bem conhecido o papel da adenosina em condições fisiológicas no sistema nervoso central (SNC), atuando como um modulador do estado metabólico celular e como um neuromodulador nas sinapses nervosas (Cunha, 2001). Sabe-se também que a adenosina tem uma ação neuroprotetora em condições patológicas (Latini & Pedata, 2001), bem como em processos inflamatórios (Bours et al., 2006), na isquemia (Von Lubitz, 1999) e nas convulsões (Rudolphi et al., 1992). Também tem sido proposto que a adenosina é um potente regulador da circulação cerebral (Dunwiddie & Fredholm, 1997).

Existe uma variedade de enzimas, localizadas na superfície das células capazes de hidrolisar nucleotídeos extracelulares, como os nucleotídeos da adenina, produzindo como produto final dessa hidrólise, a adenosina. Estas enzimas são chamadas de ectonucleotidases (Zimmermann, 1996; Robson et al., 2006). Com o passar das décadas várias famílias de ectonucleotidases tem sido descobertas e caracterizadas, como por exemplo, a família das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase/CD39; EC 3.6.1.5), que hidrolisam nucleotídeos extracelulares tri e difosfato. A cascata de ectonucleotidases pode ser iniciada por uma NTPDase e terminada pela ecto-5'-nucleotidase (CD73; EC 3.1.3.5), enzima responsável pela hidrólise de nucleotídeos monofosfato (Robson et al., 2006). Assim, este sistema enzimático é uma importante ferramenta para a manutenção e o controle das concentrações de purinas extracelulares e conseqüentemente, para a regulação do balanço entre as atividades purinérgicas excitatórias e inibitórias (Cunha, 2001). Baseado nestas considerações é possível postular que estas enzimas são importantes para a modulação fisiológica das funções do SNC, bem

como para as atividades neuroprotetoras contra danos cerebrais (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006).

A meningite é uma infecção aguda associada com uma reação inflamatória no espaço subaracnóideo, podendo ser causada por diversos microorganismos, incluindo bactérias, parasitas, vírus ou fungos (Sáez-Llorenz et al., 2003; Straussberg et al., 2003). Os índices de mortalidade variam entre crianças, recém-nascidos e adultos. Um terço dos pacientes que sobrevivem à doença, apresentam seqüelas neurológicas como perda temporária ou permanente da audição (Sáez-Llorens et al., 2003). O diagnóstico da meningite é feito pelos sintomas clínicos do paciente e pela análise do líquido cefalorraquidiano, também chamado líquor. Dependendo da etiologia da infecção, o aspecto do líquor poderá variar. Em pessoas saudáveis, o líquor apresenta-se cristalino e incolor. Nas meningites, parâmetros como cor, transparência, contagem diferencial de leucócitos, concentração de glicose, proteínas, lactato, coloração de Gram e cultura podem variar (Menaker et al., 2004).

Na meningite asséptica a contagem total de leucócitos está elevada, ficando em torno de 10 a 1000 leucócitos/mm³, sendo que os linfócitos são os leucócitos que aparecem em maior quantidade, os valores de proteína estão aumentados, em torno de 0,5 a 1,0 g/dL, e os níveis de glicose encontram-se normais (Lewis & Gibbon, 2000). Já na meningite bacteriana a contagem total de leucócitos está bem elevada, superior aquelas encontradas na meningite asséptica, sendo que os neutrófilos são os leucócitos que aparecem em maior quantidade, os valores de proteína aparecem bem elevados e os níveis de glicose aparecem diminuídos. (Rodriguez et al., 1990; Menaker et al., 2005).

Outro parâmetro que pode ser utilizado para diferenciar a meningite asséptica da meningite bacteriana é o nível de lactato no líquor, que se encontra elevado na meningite bacteriana, superior a 2,8 mmol/L (Curtis et al., 1981).

A hidrólise de nucleotídeos da adenina e guanina foi verificada em líquor de rato (Portela et al., 2002), entretanto são escassos os estudos em líquor humano. Considerando o exposto acima, é de interesse científico a avaliação da hidrólise dos nucleotídeos de adenina no líquor de pacientes humanos com meningite asséptica e bacteriana.

1.1 Objetivos:

- Verificar se ocorre hidrólise dos nucleotídeos de adenina no líquido de pacientes controles (sem alterações inflamatórias no líquido) e no líquido de pacientes com diagnóstico positivo para meningite asséptica ou bacteriana.
- Analisar se existe diferença na hidrólise do ATP, ADP e AMP no líquido dos pacientes com diagnóstico positivo para meningite asséptica e bacteriana quando comparados com os pacientes controles.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Meninges

As meninges são constituídas de uma seqüência de três delicadas membranas de tecido conjuntivo que recobrem o sistema nervoso central (SNC), encéfalo e medula (Fig.1 e Fig.2), com múltiplas funções como proteção contra choques mecânicos, processos metabólicos, processos imunológicos e termorregulação. São elas a pia-máter (camada mais interna que adere ao cérebro e à medula espinhal), a aracnóide (que é a camada intermediária e também serve de canal para o líquido cefalorraquidiano) e a dura-máter (que é a camada mais externa e resistente) (Wang & Chambers, 2002).

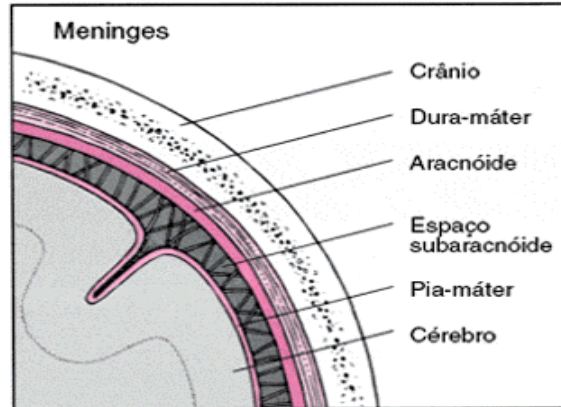


Figura 1 – Meninges Cranianas. Disponível em: < http://www.msd-brazil.com/msd43/manual/mm_sec6_59.htm>. Acesso em: 11 out. 2007.

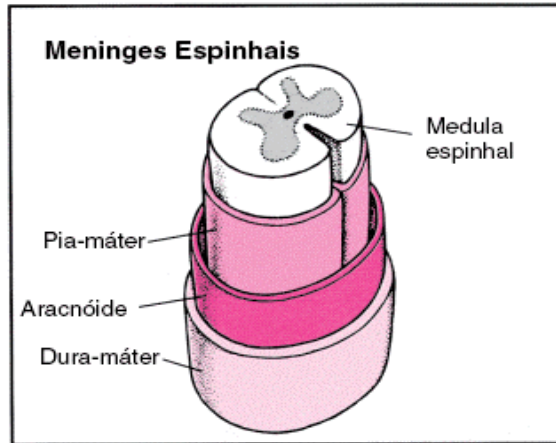


Figura 2 – Meninges Espinhais. Disponível em: <http://www.msd-brazil.com/msd43/manual/mm_sec6_59.htm>. Acesso em: 11 out. 2007.

2.2 Líquido cefalorraquidiano

O líquido é um produto da filtração do plasma, que banha todo o cérebro e a medula, sendo uma via de comunicação direta entre eles. Aparentemente o líquido é incolor e transparente, semelhante ao plasma ultrafiltrado, vários íons, enzimas e outras substâncias são encontrados no líquido normal. Já a sua composição química não se parece com a de um ultrafiltrado do plasma, pois possui um conteúdo protéico baixo e poucas células (Sickmann et al., 2002; Di Terlizzi & Platt, 2006). As concentrações de cloro, sódio e magnésio no líquido são ligeiramente superiores às encontradas no plasma, já as concentrações de potássio, cálcio total e glicose, são ligeiramente inferiores (Guyton & Hall, 2000).

O líquido é formado pelos plexos coróides, tecido especializado que se encontra no interior das quatro cavidades intra-cerebrais, chamadas de ventrículos cerebrais, em uma razão de aproximadamente 0,35 mL/min nos humanos (Di Terlizzi & Platt, 2006), quantidade essa reabsorvida pelos vilos aracnóideos para manter um volume total de 140 a 170 mL em adultos e de 10 a 60 mL em recém-nascidos (Strasinger, 2000).

A formação do líquido pelos plexos coróides é constante e feita por meio de filtração renovando-se diariamente (Pople, 2002). O líquido produzido no encéfalo flui por entre os ventrículos, através de orifícios denominados forames até o tronco cerebral, após recobre a medula espinhal circulando até sua região mais inferior e retornando para o encéfalo no espaço subaracnóideo para ser reabsorvido e lançado na corrente sanguínea (Fig.3). Há a necessidade de reabsorção do líquido constantemente, a fim de evitar-se a pressão intracraniana (PIC) (Schirmer, 1995).

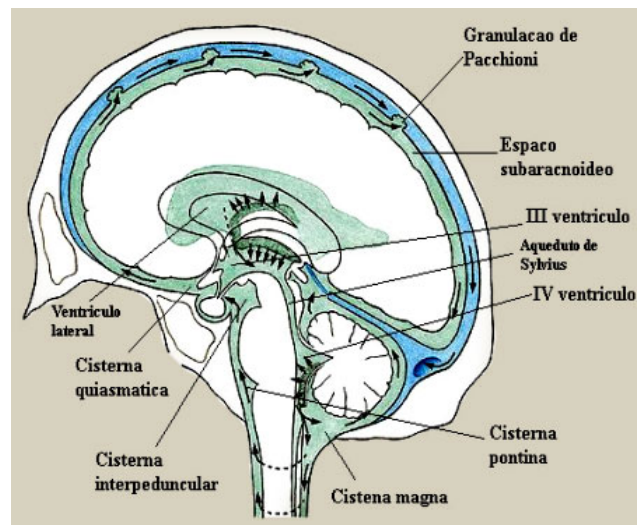


Figura 3 – Circulação líquórica. Disponível em: < http://esclerosemultipla.files.wordpress.com/2006/08/men_03.jpg>. Acesso em 14 out. 2007.

O líquido tem um papel protetor no SNC. Uma das primeiras funções do líquido é proteger o cérebro das mudanças na pressão arterial e venosa associadas com a postura, respiração e esforço físico. Em síntese, o líquido ajuda a modular a variação normal da PIC e juntamente com o fluxo sanguíneo cerebral, auxiliam na autorregulação da PIC. Outra característica de proteção é o seu papel na excreção de produtos potencialmente tóxicos do metabolismo cerebral. Juntamente com a proteção, o líquido desempenha papel fundamental no metabolismo cerebral atuando como um transportador de nutrientes vindo do sistema circulatório sanguíneo para o sistema nervoso. O líquido age também como um veículo de transporte intra-cerebral

de substâncias biologicamente ativas, como as substâncias liberadoras de hormônios (Strasinger, 2000; Di Terlizzi & Platt, 2006).

Em adição ao transporte de nutrientes, eventualmente o líquido pode transportar também agentes infecciosos como vírus, bactérias e parasitas para o espaço subaracnóideo (Guyton & Hall, 2000). Assim, para confirmar um diagnóstico positivo de infecção no sistema nervoso, ou alguma lesão, é necessário um exame do líquido, que é coletado por punção lombar (Lewis & Gibbon, 2000).

2.2.1 Punção lombar

Uma agulha pequena e oca é inserida na parte inferior do canal espinal, em geral entre a terceira e a quarta ou entre a quarta e a quinta vértebras lombares, abaixo do ponto onde termina a medula espinal (Fig.4). O líquido cefalorraquidiano é coletado geralmente em três tubos estéreis e as amostras são enviadas ao laboratório para serem examinadas. O primeiro tubo que recebe a primeira alíquota de líquido é utilizado para análises bioquímicas e sorológicas, o segundo tubo em geral é usado para microbiologia, e o terceiro tubo destina-se ao setor de hematologia para ser feita a contagem celular, já que esta fração da amostra tem a menor probabilidade de conter células introduzidas acidentalmente pelo procedimento de punção espinal (Strasinger, 2000).



Figura 4 – Punção lombar. Disponível em: <http://esclerosemultipla.files.wordpress.com/2006/07/unção_lombar.jpg>. Acesso em 14 out. 2007.

2.3 Meningite

A meningite é uma infecção aguda associada a uma considerável reação inflamatória ocorrida nas meninges, mais especificamente no espaço subaracnóideo, incluindo a pia-máter, a membrana aracnóide e o líquido. O processo inflamatório se estende através do espaço subaracnóideo pelo encéfalo e medula. Vários são os agentes etiológicos causadores da meningite, sendo os vírus e as bactérias os principais. Os Parasitas e os fungos podem também desencadear a meningite, porém são menos frequentes (Sanvito, 1997; Sáez-Llorenz et al., 2003; Straussberg et al., 2003).

A meningite está entre as infecções que acometem o SNC, e que determina elevados índices de morbidade e mortalidade. Os índices de mortalidade variam entre crianças, recém-nascidos e adultos. Um terço dos pacientes que sobrevivem à doença apresenta seqüelas neurológicas. Perda temporária ou permanente da audição, cegueira, convulsões, hidrocefalia e deficiência motora são exemplos de seqüelas causadas pela meningite (Sáez-Llorens et al., 1990; Neumann & Thompson, 1998; Sáez-Llorens et al., 2003).

O diagnóstico da meningite é feito através dos sinais clínicos juntamente com as análises laboratoriais. Dependendo da etiologia da infecção, o aspecto do líquido poderá variar, nas meningites, parâmetros como cor, transparência, contagem diferencial de leucócitos, concentração de glicose, proteínas, lactato, coloração de Gram e cultura, auxiliam no diagnóstico (Menaker et al., 2004). Os sintomas clínicos são a febre, a cefaléia, a rigidez do pescoço, a dor de garganta e o vômito (Begg et al., 1999).

2.3.1 Meningite Asséptica

A meningite asséptica é uma denominação utilizada para a inflamação das meninges causada por agentes virais, porém, este tipo de meningite também pode ser causada por agentes químicos (alguns medicamentos utilizados no tratamento do câncer ou em transplantes de órgãos e mesmo antiinflamatórios não esteróides

(por exemplo, o ibuprofeno) também podem causar inflamação das meninges.) e malignidades disseminadas (algumas células tumorais podem provocar meningite). Dentre os agentes etiológicos virais, destaca-se o enterovírus como o principal causador de meningite asséptica (Lamarão et al., 2005).

A meningite asséptica é geralmente a inflamação das meninges com a menor gravidade e cura-se sem tratamento específico (Kleine et al., 2003).

Neste tipo de meningite encontra-se no líquido uma contagem celular moderadamente elevada, ficando em torno de 10 a 100 leucócitos/mm³. A porcentagem de linfócitos e monócitos é alta. O aspecto do líquido antes da centrifugação é pouco turvo, devido à pequena elevação no valor de proteínas, ficando em torno de 50 a 100mg/dL, após a centrifugação seu aspecto é incolor. Os valores de glicose permanecem normais (Lewis & Gibbon, 2000).

2.3.2 Meningite Bacteriana

A meningite bacteriana é a inflamação das meninges causada por bactérias. É uma doença com alto risco de vida e é considerada mais perigosa que a meningite asséptica por resultar em sérios danos ao sistema nervoso. Na meningite bacteriana é importante saber a bactéria causadora para que se possa fazer um tratamento adequado à base de antibióticos. Os patógenos mais comuns são o *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* tipo B e *Streptococcus agalactiae* (Neumann & Thompson, 1998; Weisfelt et al., 2007).

Entre os achados laboratoriais da meningite bacteriana, encontra-se uma contagem elevada de células brancas, ficando em torno de 1000 a 5000 leucócitos/mm³ com uma predominância de neutrófilos. A proteína costuma estar elevada pelo menos três vezes em relação ao valor normal. Pelo consumo de glicose pela bactéria e pela lesão neuronal, temos a glicorraquia, assim os valores de glicose estão bastante diminuídos (Neumann & Thompson, 1998).

2.4 Nucleotídeos da adenina

Os nucleotídeos possuem três componentes característicos: uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato. As bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos ancestrais, as pirimidinas e as purinas. São chamados nucleotídeos de adenina aqueles que possuem como base nitrogenada uma purina denominada adenina (Fig.5) (Lehninger et al., 2000).

O ATP, um nucleotídeo de purina trifosfatado, pode ser hidrolisado até ADP, um nucleotídeo difosfatado, seguidamente até AMP, um nucleotídeo monofosfatado, e finalmente até adenosina (Wink et al., 2003).

Os nucleotídeos são amplamente encontrados em animais e plantas, e sabe-se que são responsáveis por regular várias funções fisiológicas e patológicas (Wink et al., 2003). Há algum tempo atrás se pensava que os nucleotídeos de adenina possuíam um exclusivo papel intracelular, agora já é conhecido seu amplo efeito extracelular como neurotransmissores e neuromoduladores (Torres et al., 2002).

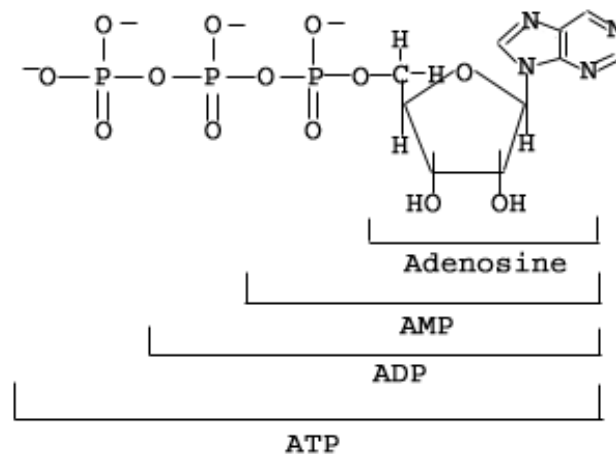


Figura 5 – Estrutura dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina. Disponível em: <<http://textbookofbacteriology.net/metabolism.html>>. Acesso em 19 out. 2007.

2.4.1 Adenosina 5'-trifosfato (ATP)

O ATP possui um papel intracelular bem estabelecido no metabolismo energético das células. Extracelularmente, o ATP participa de uma série de

processos biológicos como: neurotransmissão, contração muscular, função cardíaca, agregação plaquetária, metabolismo do glicogênio hepático e processos inflamatórios (Torres et al., 2002).

ATP contido em vesículas sinápticas é liberado para estimular nervos terminais, bem como para ativar nervos pré-sinápticos. Uma vez liberado o ATP pode atuar como um rápido neurotransmissor em algumas sinapses ou como um neuromodulador pré-sináptico (Cunha & Ribeiro, 2000; Burnstock & Williams, 2000). O ATP atua como neurotransmissor no sistema nervoso simpático e parassimpáticos, e também nos nervos sensoriais do sistema nervoso periférico. É reconhecida também sua ação transmissora no SNC, possivelmente na comunicação neurônio-glia e glia-glia. O papel modulador do ATP, no sistema nervoso periférico, é controlar a sinalização da maioria dos neurotransmissores, como glutamato, GABA, acetilcolina, noradrenalina e serotonina (Cunha & Ribeiro, 2000). Outra possível ação do ATP é como molécula endógena sinalizadora no processo inflamatório e imune (Bours et al., 2006).

2.4.2 Adenina 5'-difosfato (ADP)

O ADP é o principal agonista envolvido no recrutamento e agregação das plaquetas em locais de injúria vascular. Concentrações micromolar de ADP são suficientes para induzir a agregação plaquetária em humanos (Marcus et al., 2003; Duarte et al., 2007).

2.4.3 Adenina 5'-monofosfato (AMP)

Quando o AMP está em concentrações elevadas, é ele que cumpre o papel de sinalizador, a fim de adaptar o metabolismo primário do desbalanço metabólico. Porém essa sinalização é intracelular, já que o AMP não consegue atravessar a membrana da célula (Cunha, 2001).

2.4.4 Adenosina

A adenosina tem várias funções no SNC. É bem conhecido seu papel como mensageiro trans-celular, sinalizando o desbalanço metabólico. Além disso, possui um papel homeostático no controle do metabolismo celular. Junto ao seu papel como modulador homeostático, a adenosina também cumpre um papel neuromodulatório, no qual a adenosina regula a liberação de neurotransmissores, a ligação pós-sináptica e a ação de outros sistemas de receptores (Cunha, 2001).

A adenosina atua de maneira protetora em condições patológicas, como na isquemia e nas convulsões induzidas por injúrias neurais. Propõe-se também que a adenosina é um potente regulador da circulação cerebral (Latini & Pedata, 2001).

Evidências indicam que juntamente com o ATP, a adenosina funcione como um sinalizador endógeno que controla a resposta inflamatória e imune. Essa inter-relação entre o ATP e adenosina é baseada na presença de uma grande família de receptores purinérgicos (P1 e P2, receptores para a adenosina e para o ATP respectivamente) (Bours et al., 2006). A adenosina inibe a agregação plaquetária, tornando-se um agente protetor dos vasos e artérias, protegendo os mesmos da instalação da placa arterosclerótica (Spronk et al., 2004; Duarte et al., 2007).

Alguns trabalhos apontam um aumento na hidrólise dos nucleotídeos de adenina com conseqüente aumento na produção de adenosina em condições patológicas como o diabetes e o câncer de mama. (Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2004).

2.5 Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina

Ectonucleotidases são ectoenzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares aos seus respectivos nucleosídeos (Robson et al., 2006).

A hidrólise do ATP e do ADP até AMP é catalisada por ecto-NTPDase (apirase, CD39, ATP difosfohidrolase) e o AMP formado pela ação desta enzima é hidrolisado até adenosina pela ação da 5'-nucleotidase (CD73, E.C.3.1.3.5), duas enzimas capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como

ATP, ADP e AMP aos seus receptores específicos (Zimmermann, 1992; Zimmermann, 1996).

Com o passar das décadas ectonucleotidases pertencentes a várias famílias de enzimas tem sido descobertas, clonadas e caracterizadas (Fig.6). Este estudo avançado em relação a estas enzimas tem resultado em uma considerável descoberta sobre a estrutura e função destas enzimas, bem como na definição de suas implicações fisiológicas e pato-fisiológicas em uma considerável variedade de tecidos (Robson et al., 2006).

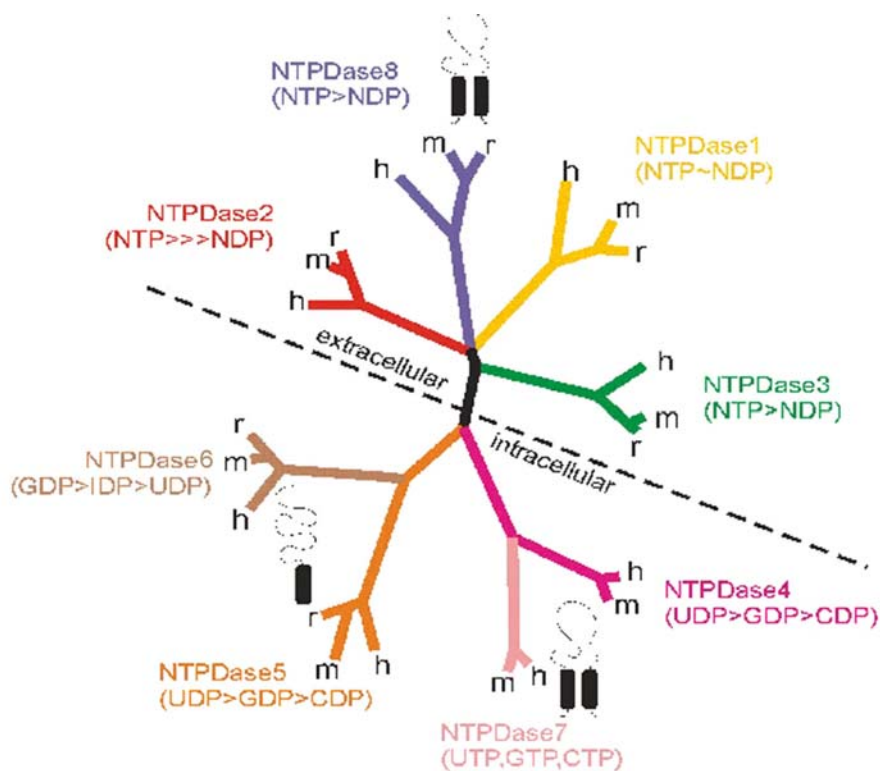


Figura 6 – Estrutura das enzimas da família NTPDase – Robson et al. 2006.

2.5.1 NTPDase (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD39, E.C. 3.6.1.5)

A E-NTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) é o termo que se utiliza para designar uma família de enzimas localizadas na membrana plasmática de várias células, inclusive células do tecido nervoso (Zimmermann, 1996), e que hidrolisa nucleotídeos extracelulares di e/ou trifosfatados como o ATP e o ADP, na

presença de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (são inativas na sua ausência), até nucleotídeos monofosfatados como o AMP (Wang & Guidotti, 1996; Robson et al., 2006).

A família das NTPDase é atualmente composta por 8 membros. Quatro das NTPDases são tipicamente encontradas na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular (NTPDase1, 2, 3, 8). As NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular, mas podem ser hidrolisadas e liberadas para o meio extracelular, e as NTPDases 4 e 7 que estão totalmente localizadas na região intracelular e seu centros ativos estão direcionados para o lúmen das organelas citoplasmáticas

Todos os membros desta família apresentam em sua estrutura no mínimo cinco domínios chamados regiões conservadas de apyrase (ACR), que é o local que apresenta grande similaridade na seqüência de aminoácidos. Tais domínios estão diretamente envolvidos na atividade catalítica da enzima e/ou na integridade estrutural das E-NTPDases (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006).

As E-NTPDases 1,2,3 e 8 estão ancoradas na superfície celular através de dois domínios transmembranas com dois grupamento amino e carboxi terminal hidrofóbicos, enquanto que as NTPDases 5 e 6 possuem apenas um domínio transmembrana com um grupamento amino terminal (Fig. 7) (Maliszewski et al.,1994; Zimmermann 2001).

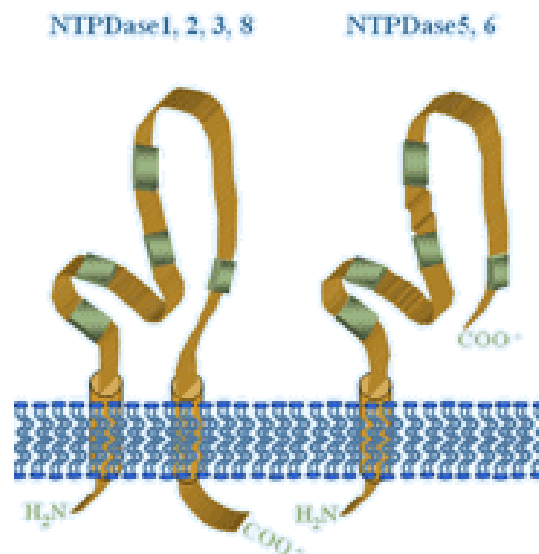


Figura 7.E-NTPDases - Adaptado de Zimmermann (2001).

As ações biológicas das E-NTPDases tem sido relatadas em vários eventos e tipos celulares. Dependendo da localização tecidual a sua atividade enzimática tem diferentes funções fisiológicas. O mecanismo tromborregulatório no sistema vascular, o papel imunorregulatório nos processos imunes e inflamatórios e o papel neuromodulador e neuroprotetor no sistema nervosos, são alguns exemplos das ações dessas enzimas (Lunkes et al., 2003; Robson et al., 2006; Duarte et al., 2007).

2.5.2 5' –Nucleotidase (CD73, E.C. 3.1.3.5)

Existem sete tipos de 5'-nucleotidases humanas isoladas e caracterizadas. Estas enzimas variam de acordo com a sua localização celular, onde cinco destas enzimas estão localizadas no citosol, uma na matriz mitocondrial e uma ancorada no exterior da membrana plasmática (Fig.8). Estas enzimas têm em comum sua habilidade de catalisar a hidrólise de uma variedade de nucleotídeos monofosfatados como o AMP até o seu nucleosídeo, no caso a adenosina. As 5'-nucleotidases têm também a função de regular os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos celulares (Hunsucker et al., 2005).

A ecto-5'-nucleotidase é uma enzima ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI (glicofosfatidil inositol) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Fig. 8) (Zimmermann, 1998).



Figura 8 – Estrutura da 5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI. Adaptado de Zimmermann (2001).

O papel da 5'-nucleotidase está intimamente ligado à produção de adenosina, assim a função desta enzima está ligada a todas as funções fisiológicas e protetoras em patologias, ligadas a adenosina. Vários experimentos evidenciam que esta enzima também participa no controle dos níveis extracelular de ATP na fenda sináptica e no controle da neurotransmissão e neuromodulação purinérgica (Dunwiddie & Masino, 2001; Schetinger et al., 2001).

2.6 Receptores Purinérgicos no sistema nervoso central

Os purina nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares iniciam uma vasta gama de respostas celular através da ativação de receptores. Como já foi visto, são as ectonucleotidases que controlam os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos na superfície das células (Burnstock & Williams 2000).

Os receptores purinérgicos são divididos em receptores de nucleosídeos, que são os receptores P1, e os receptores de nucleotídeos, que são os receptores P2.

Existem dois grandes grupos de receptores de nucleotídeos extracelulares, que são os receptores P2X, chamados ionotrópicos, pois estão ligados a canais iônicos, e os receptores P2Y, chamados metabotrópicos, pois estão acoplados a uma proteína G (Kunapuli et al., 2003).

Os neurônios do SNC possuem receptores P2X e P2Y sensíveis ao ATP. Acredita-se que os receptores P2X medeiam uma resposta sináptica rápida a transmissão do ATP, enquanto os receptores P2Y medeiam uma pequena mudança no potencial de membrana em resposta a liberação não sináptica do ATP ou a interação com receptores para outros transmissores. Dependendo da localização do receptor, ocorre uma determinada ação. Os receptores P2 pós-sinápticos e os receptores pré-sinápticos P2X parecem exercer efeito excitatório, enquanto que os receptores pré-sinápticos P2Y são inibitórios (Illes & Ribeiro, 2004).

O ATP pode antagonizar a ação do ADP mediante receptor P2Y na agregação plaquetária. A adenosina possui efeitos sedativos no SNC pela ativação de receptores P1 ao contrário do ATP que possui efeitos excitatórios via ativação de receptores P2 nas células nervosas (Burnstock & Williams, 2000).

3. RESULTADOS

3.1 Manuscrito

Adenine nucleotide hydrolysis in patients with aseptic and bacterial meningitis

Aracélli Gnatta Dorneles, Charlene Menezes, Rita Leal Sperotto, Marta Medeiros
Frescura Duarte, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger e Vânia Lúcia

Loro

(Submetido à Revista Neurochemical Research)

**ADENINE NUCLEOTIDE HYDROLYSIS IN PATIENTS WITH
ASEPTIC AND BACTERIAL MENINGITIS**

Aracélli Gnatta Dorneles¹, Charlene Menezes¹, Rita Leal Sperotto¹, Marta Medeiros Frescura Duarte¹, Vera Maria Morsch¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger¹ and Vânia Lúcia Loro^{1,2}

¹Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

²Address reprint requests to: Vânia Lucia Loro, Prof^a. Dr^a. Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

Tel: +55-55 32209456; E-mail: vaniluc@yahoo.com.br, vanial@smail.ufsm.br

ABSTRACT

The meningitis is a disease with high mortality rates capable to cause neurologic sequelae. The adenosine (the final product of ATP hydrolysis by ectonucleotidases), have a recognized neuroprotective actions in the central nervous system (CNS) in pathological conditions. The aim of the present study was evaluate the adenine nucleotides hydrolysis for to verify one possible role of ATP, ADP and AMP hydrolysis in inflammatory process such as meningitis. The hydrolysis was verified in cerebrospinal fluid (CSF) from human patients with aseptic and bacterial meningitis. Our results showed that the ATP hydrolysis was reduced 12.28% ($p<0.05$) in bacterial meningitis and 22% ($p<0.05$) in aseptic meningitis. ADP and AMP hydrolysis increased 79.13% ($p<0.05$) and 26.37% ($p<0.05$) in bacterial meningitis respectively, and 57.39% ($p<0.05$) and 42.64% ($p<0.05$) in aseptic meningitis respectively. This may be an important protective mechanism in order to increase adenosine production.

Keywords: Aseptic Meningitis, Bacterial Meningitis, Meningitis, Adenosine, NTPDase, Cerebrospinal fluid

1. INTRODUCTION

Several cell types including neurons and glial cells can release nucleotides and nucleosides into the extracellular space. These substances play an important role in physiological and/or pathological conditions [1]. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is a purine nucleotide found in millimolar concentrations in a variety of cells, including neural cells. ATP is a neurotransmitter of sensory nerves in sympathetic and parasympathetic peripheral nervous system, as well as in the central nervous system (CNS) [2, 3]. Once released, ATP can act as a fast neurotransmitter in some synapses or as a presynaptic neuromodulator [4]. Most commonly, the released ATP is metabolized extracellularly into adenosine by a cascade of ectonucleotidases [5].

Extracellular ATP and its breakdown products, such as adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), and adenosine have important effects on a variety of biological processes [3]. Adenosine, final product of ATP breakdown, may be formed intracellularly in the CNS from degradation of AMP by 5'-nucleotidase [6] or extracellularly from degradation of AMP by ecto-5'-nucleotidase [7]. Considering the excitatory effects of ATP and the neuroprotective effects of adenosine, the release of adenine nucleotides is an important step in the modulation of several functions of CNS [8]. Current evidences indicate that ATP and adenosine are also important endogenous signaling molecules in immunity and inflammation process [9]. Adenosine acts in physiological conditions, including neurotransmission, muscle contraction, platelet aggregation, cardiac function, and vasodilatation [10, 11, 9]. Adenosine has also been proposed to be a potent regulator of cerebral blood flow [12,13] and to have protective actions in pathological conditions, like brain ischemia [14], diabetes [15], cardiovascular pathology

associated with hypercholesterolemia, hypertension and platelet aggregation [16,17], cancer [18], and inflammatory processes [9].

Ectonucleotidases are ectoenzymes that hydrolyze extracellular nucleotides to the respective nucleosides. These enzymes are located in various tissues and are Ca^{2+} or Mg^{2+} activated. Besides, they have been well characterized in the central nervous system (CNS) [19,20,17,21]. NTPDases were included in ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase/CD39) family (NTPDase 1,2,3 and 8) [22]. The ecto-5'-nucleotidase, which is responsible for extracellular degradation of AMP, is the best-characterized enzymatic source of adenosine [13]. 5'-nucleotidase activities have been described in mammalian tissues with different biochemical and molecular properties [6]. Complete ATP hydrolysis by NTPDase and 5'-nucleotidase may be relevant to the general pathogenesis or acute and chronic brain disorders, such as neurodegenerative diseases [23,14,24]. Consequently, taken together NTPDase and 5'-nucleotidase activities contribute for the regulation of the balance between excitatory and inhibitory purine activities in the CNS [5,25,24].

In this context, adenine nucleotide hydrolysis can be important in CNS inflammatory diseases as meningitis, which is a severe acute infectious disease caused by microorganisms, such as viruses, bacteria, parasites, and fungi [26,27]. This disease is associated with a considerable inflammatory reaction in the subarachnoid space [27]. Fatality rates associated with this disease can be as low as 2% in infants and children, and as high as 20–30% in neonates and adults [28,26,27]. Diagnosis and initial treatment depends mainly on clinical symptoms and signs, as well as on the results of conventional cerebrospinal fluid (CSF) analyses. CSF changed its composition in the meningitis process [29]. The CSF analyses

include number and type of cells, and protein and glucose levels; however, in some specific cases these clinical data do not allow differential diagnosis [30,31].

In aseptic meningitis the cell counts are in the range of 10–1000 leukocytes/mm³, with lymphocyte predominance. CSF protein is slightly raised at 0.5–1.0 g/L and CSF glucose is normal [32]. On the contrary, CSF of a patient with bacterial meningitis reveals an increased white blood cell count and predominance of polymorphonuclear leucocytes. A low glucose concentration in CSF of bacterial meningitis patients was observed in relation to control patients [34,26]. Some authors recognize that CSF lactate estimation is a good discriminator between bacterial and aseptic meningitis [35,36].

Considering the importance of adenine nucleotides hydrolysis for nervous system the question to be discussed is on the importance of this hydrolysis in CSF of patients with meningitis. Therefore, the objective of this study was to compare ATP, ADP, and AMP hydrolysis between healthy patients and patients that developed bacterial or aseptic meningitis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Patients – experimental groups

The present study included 45 patients, with age ranging from 18 to 64 years old. The CSF samples of healthy patients were considered only absence of central nervous system inflammatory diseases (Table I). CSF samples obtained by lumbar puncture in the Caridade Hospital Santa Maria - RS were centrifuged and the supernatant was used for routine examination in the LABIMED Santa Maria – RS.

The remainder from LABIMED was used for the determination of adenine nucleotide hydrolysis and lactate measure. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center, Federal University of Santa Maria (Protocol number: 23081.017441/2006/97). The diagnosis was based in CSF aspect, white blood cell count, glucose and protein concentration (Table II). The biochemical concentrations of CSF were measured using standard enzymatic methods of Ortho-Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson reagents, with a fully automated analyzer (Vitros 950[®]- dry chemistry, Rochester, New York). Hematological determinations were performed using an analyzer Pentra 120[®] (ABX, Montpellier, France) from LABIMED Santa Maria – RS. The CSF samples (100 μ L) was centrifuged with 10% TCA during 5 min at 1000 x g for obtain CSF deproteinated supernatant. Supernatant free protein was used to estimate CSF lactate content according to Harrower and Brown [38] with some modifications.

2.2 ATP and ADP hydrolysis

The samples used in experimentation were centrifuged at 4500 x g at 5°C for 5 min, to obtain cell-free supernatants (S1). The supernatant (S1) was added to the reaction medium and used for enzymatic assay. Twenty microliters of the CSF preparation (4-7 μ g protein) were added to the reaction mixture of NTPDase and preincubated for 10 min at 37°C, to a final volume of 200 μ L. NTPDase activity was determined by the method of Schetinger et al. [39] with some modifications. The reaction medium containing 5 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose + 225 mM sucrose and 45 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5 was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1 mM. The reaction was stopped

by the addition of 200 μL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The inorganic phosphate (Pi) released by ATP and ADP hydrolysis was measured by the method of Chan et al. [40] using KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out to correct for nonenzymatic hydrolysis by adding CSF after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme activities are expressed as nmol Pi released/min/mg protein.

2.3 AMP hydrolysis

The samples preparation for AMP hydrolysis was the same for ATP and ADP hydrolysis. Twenty microliters of the CSF preparation (4-7 μg protein) were added to the reaction mixture of reaction and preincubated for 10 min at 37°C , to a final volume of 200 μL . AMP hydrolysis was determined by the method of Portela et al. [8] with some modifications, in a reaction medium containing 5 mM MgCl_2 and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2. The reaction was started by the addition of AMP as substrate at a final concentration of 1mM. The reaction was stopped by the addition of 200 μL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The inorganic phosphate (Pi) released by AMP hydrolysis was measured by the method of Chan et al. [40] using KH_2PO_4 as standard. All samples were run in triplicate. Enzyme activities are reported as nmol Pi released/min/mg protein.

2.4 Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard [41].

2.5 Statistical analysis

Comparison among multiple groups was performed by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls post-hoc tests, when necessary. The hydrolysis values obtained were compared by Student *t*-test. $p < 0.05$ was considered significant for all statistical analyses.

6. RESULTS

ATP, ADP, and AMP hydrolysis were verified in cerebrospinal fluid of healthy patients (non inflammatory diseases associate) to compare with the same nucleotides hydrolysis in cerebrospinal fluid of aseptic and bacterial meningitis. ATP hydrolysis was decreased 12.28% ($p < 0.05$) in bacterial meningitis and 22% ($p < 0.05$) in aseptic meningitis when comparing to the control. In the aseptic meningitis, the ATP hydrolysis was lower than bacterial meningitis (Fig. 1).

On the other hand, ADP and AMP hydrolysis had an increase of 79.13% ($p < 0.05$) and 26.37% ($p < 0.05$) in bacterial meningitis, respectively, and 57.39% ($p < 0.05$) and 42.64% ($p < 0.05$) in aseptic meningitis, respectively, when comparing to the control values (Figs. 2 and 3).

The K_m value for control patients was verified varying ATP (100-2000 μM), ADP (100-2000 μM), and AMP (10-200 μM) concentrations. The apparent K_m and V_{max} for ATP ($n=4$, mean \pm S.D.) were 44.8 μM and 7.1 nmol Pi /min per mg protein, for ADP ($n=4$, mean \pm S.D.) were 30.6 μM and 14.2 nmol Pi /min per mg protein and for AMP were 16 μM and 5.5 nmol Pi /min per mg protein (Lineweaver–Burk plot).

In order to determine whether the nucleotidase activities in CSF were soluble or membrane bound, we measured ATP, ADP, and AMP hydrolysis both in the supernatants and pellets of a centrifugation at 4000 x *g* for 5 min and of an ultracentrifugation at 43 000 x *g* for 1 h. Enzymatic activities in the pellets were less than in the supernatants. These results were not influenced by inflammatory process of meningitis (Table III). So, we decide working with the supernatant because the highest enzymatic activities in this fraction suggest that we were essentially dealing with soluble nucleotidases present in the supernatants. Patients with bacterial meningitis showed lactate values increase in CSF as compared to patient control values, while in aseptic meningitis no alteration in lactate levels was observed (Fig. 4).

7. DISCUSSION

Our data clearly demonstrate that adenine nucleotide hydrolysis in cerebrospinal fluid (CSF) was modified in patients with aseptic and bacterial meningitis. When analyzing ATP hydrolysis, a slight decrease in aseptic and bacterial meningitis patients compared with control patients was observed. This was a surprising result because ATP, once released in extracellular space, is quickly metabolized into adenosine by a cascade of ectonucleotidases [5].

It is well known that the extracellular ATP levels rise in response to cell damage caused by physical trauma or pathogens [9]. ATP release diffuses through the pericellular space and activates adjacent cells involved in inflammatory and immune responses, like epithelial cells, macrophages, and fibroblast [42]. The binding of ATP to purinergic receptors of the P2X and P2Y families has many pro-

inflammatory effects [43]. In fact, purinergic signaling might influence cellular activation, proliferation, and induction of apoptosis observed in several inflammatory states [44].

CD39 is a nucleoside triphosphate diphosphohydrolase that converts extracellular ATP to AMP. This enzyme is expressed by many types of leukocytes and by vascular endothelial cells [45]. As a result, ATP-generation and ATP-consuming pathways coexist on the surface of leukocytes and endothelial cells and their dynamic balance regulates local ATP and adenosine levels in this microenvironment [45]. Meanwhile, nucleotidases can be found as soluble forms in biological fluids [46]. In the context of meningitis inflammatory process perhaps, ATP may have been hydrolyzed by ectoenzymes present on the surface of leukocytes and by a NTPDase soluble form. Soluble forms of nucleotidases have been shown to be released from cultured cells expressing these enzymes, as well as from nervous system [24, 46, 8]. According to Todorov et al. [48] soluble enzymes degrade ATP to adenosine, and according to Westfall et al. [47] these enzymes also degrade ADP to adenosine. Thus, in neural tissue the initial dephosphorylation from ATP to ADP is an important step in the metabolism from ATP to adenosine.

In addition, evidences indicate that there are intracellular molecules that are exteriorized into the extracellular environment of the tissue trauma and have pro-inflammation activity. These molecules would have the ability to alert the body about danger and initiate the immune response [42]. This is the “danger signal” hypothesis and the extracellular nucleotides have all the essential features for this task because they are present at a high concentration intracellular and are quickly released upon damage of the cell membrane [49,42].

Many works have uncovered several interactions between ectoenzymes and the adhesion and activation molecules that are involved in leukocytes trafficking between the blood and the tissue damage [45].

The increase in ADP and AMP hydrolysis in aseptic and bacterial meningitis observed in the present study is very significant. It is important to point out that ADP and AMP hydrolyses produce adenosine. These data agree with other works that showed adenosine production in CNS in brain insults and in inflammatory processes [5, 9]. Like ATP, adenosine can also be considered a danger molecule, because its extracellular levels increase in response to tissue damage [9]. The adenosine is normally present in the extracellular fluid in most tissues of the body, including the brain. Adenosine has an important neuroprotective role in CNS in pathological conditions [50, 3]. According to Latini and Pedata [13], evidences indicate that the adenosine release for extracellular space by physiological stimuli originates per se from neurons, meaning that in physiological conditions most adenosine is derived from intracellular AMP [51], whereas under conditions of increasing metabolic activity and for a mismatch between energy supply and demand, the adenosine extracellular is attributable to the degradation of extracellularly released nucleotides [13].

Adenosine activates specific receptors of neutrophil, working as an antiadhesive signal for the binding of neutrophils to endothelial cells. Thus, adenosine prevents leukocytes activation, downregulates the expression of vascular adhesion molecules, and decreases leukocytes trafficking by inhibition of cytokine release from the endothelium [45]. Furthermore, adenosine acts as an immunosuppressive agent, which may have relevance for both cell-mediated and inflammatory immune responses [52]. In this study adenosine formation can be

important as a neuroprotective mechanism against inflammatory process generated by meningitis.

8. CONCLUSION:

In conclusion, our study demonstrated that the hydrolysis of adenine nucleotides was modified in aseptic and bacterial meningitis, mainly by an NTPDase soluble form, indicating that there may be a neuroprotective attempt associate with adenosine production. The enhancement of ADP and AMP hydrolysis and the decrease in ATP hydrolysis is likely to have an important connection with the inflammatory processes.

REFERENCES

1. Magalhães-Cardoso MT, Pereira MF, Oliveira L et al (2003) Ecto-AMP deaminase blunts the ATP-derived adenosine A2A receptor facilitation of acetylcholine release at rat motor nerve endings. *J Physiol* 549:399-408
2. Bunstook G, Williams M (2000) P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 295:862-869
3. Torres ILS, Buffon A, Dantas G et al (2002) Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 74:181-186
4. Cunha RA, Ribeiro JA (2000) ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci* 68:119-137
5. Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in nervous system: different role, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38:107-25
6. Zimmermann H (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *J Biochem* 285:345-365
7. Zimmermann H (1996) Biochemistry, localization and function roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 49:589-618
8. Portela LVC, Oses JP, Silveira AL et al (2002) Guanine and adenine nucleotidase activities in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 950:74-78
9. Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F et al (2006) Adenosine 5'- triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and nflammation. *Pharmacol Ther* 112: 358-404
10. Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW et al (1999) Adenosine triphosphate: established and potential clinical application. *Drugs* 58:211- 232

11. Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G (2003) Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci* 24:290- 297
12. Dunwiddie TV, Fredholm BB (1997) Adenosine neuromodulation. In: *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics*. (Jacobson KA, Jarvis MF, eds) Wiley-Liss, New York, pp 359-382
13. Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79:463-84
14. Pasini FL, Guideri F, Picano E et al (1999) Increase in plasma adenosine during brain ischemia in man: A study during transient ischemic attacks, and stroke. *Brain Res Bull* 51:327-330
15. Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F et al (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 109:189-194
16. Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H (2000) Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96:2157-2162
17. Duarte MMF, Loro VL, Rocha JBT et al (2007) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *FEBS J* 274: 2707-2714
18. Araújo MC, Rocha JBT, Morsch A et al (2004) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1740:421-426
19. Vieira VP, Rocha JBT, Stefanello FM et al (2001) Heparin and chondroitin sulfate inhibit adenine nucleotide hydrolysis in liver and kidney membrane enriched fractions. *Int J Biochem Cell Biol* 33:1193-1201

20. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF et al (2003) Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 1:2497-2509
21. Pedrazza EL, Senger MR, Pedrazza L et al (2007) Sertraline and clomipramine inhibit nucleotide catabolism in rat brain synaptosomes. *Toxicol In Vitro* 21:671-676
22. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2:409-430
23. Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW et al (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 59:663-690
24. Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST et al (1999) CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleotide diphosphates. *J Biol Chem* 274:20064-20067
25. Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: Some recent developments and a note nomenclature. *Drug Dev Res* 52:45-45
26. Sáez-Llorenz X, Jr. McCracken GH (2003) Bacterial meningitis in children. *Lancet* 361:2139-2148
27. Straussberg R, Harel L, Nussinovitch M et al (2003) Absolute Neutrophil Count in Aseptic and Bacterial meningitis related to time of lumbar puncture. *Pediatr Neurol* 28:365-369
28. Sáez-Llorens X, Ramilo O, Mustafa MM et al (1990) Molecular pathophysiology of bacterial meningitis: Current concepts and therapeutic implications. *J Pediatr* 116:671-684

29. Toczyłowska B, Chalimoniuk M, Wodowska M et al (2006) Changes in concentration of cerebrospinal fluid components in patients with traumatic brain injury. *Brain Res* 1104:183-189
30. Lindquist L, Linné L, Hansson LO et al (1988) Value of cerebrospinal fluid analysis in the differential diagnosis of meningitis: a study in 710 patients with suspected central nervous system infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7:374-380
31. Rodríguez-Núñez A, Cid E, Rodríguez-García J et al (2003) Neuron-specific enolase, nucleotides, nucleosides, purine bases, oxypurines and uric acid concentrations in cerebrospinal fluid of children with meningitis. *Brain Dev* 25:102-106
32. Lewis H, Gibbon FM (2000) Management of viral meningitis and encephalitis. *Curr Pediatr* 10:110-115
33. Menaker J, Martin IBK, Hirshon JM (2005) Marked elevation of cerebrospinal fluid white blood cell count: an unusual case of streptococcus pneumoniae meningitis, differential diagnosis, and a brief review of current epidemiology and treatment recommendations. *J. Emerg Med* 29:37-41
34. Rodriguez AF, Kaplan SL, Mason EO Jr (1990) Cerebrospinal fluids values in the very low birth weight infant. *J Pediatr* 116:971-74
35. Controni G, Rodriguez W, Hicks JM et al (1977) Cerebrospinal fluid lactic acid levels in meningitis. *J Pediatr* 91:379-384
36. Cameron PD, Boyce JMH, Ansari BM (1993) Cerebrospinal fluid lactate in meningitis and meningococcaemia. *J Infect* 26:245-252
37. Curtis GDW, Slack MPE, Tompkins DS (1981) Cerebrospinal fluid lactate and the diagnosis of meningitis. *J Infect* 3:159-165

38. Harrower JR, Brown CH (1972) Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J Appl Physiol.* 32:709–711
39. Schetinger MRC, Vieira VLP, Morsch VM et al (2001). ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. *Comp Biochem Physiol B.* 128:731-741
40. Chan K, Delfret D, Junges K (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺ ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375-380
41. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
42. Di Virgilio F (2005) Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling* 1:205-209
43. Idzko, M. et al. (2002) Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P₂ receptors. *Blood* 100:925-932
44. Dwyer KM, Deaglio S, Crikis S et al (2007) Salutary roles of CD39 in transplantation. *Transplant Rev* 21:54-63
45. Salmi M, Jalkanen S (2005) Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nature Rev Immunol* 5:760-771
46. Goding JW (2000) Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *J Leukoc Biol* 67:285-311
47. Westfall TD, Menzies JR, Liberman R et al (2000) Release of a soluble ATPase from the rabbit isolated vas deferens during nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 131:909-914

48. Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD et al (1997) Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387:76-79
49. Di Virgilio F, Baricordi OR, Romagnoli R et al (2004) Leukocyte P2 receptors: A novel target for anti-inflammatory and anti-tumor therapy. *Curr Drug Targets*. 5:85-99
50. Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE et al (1992) Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci* 13:439-445
51. Spicuzza L, Di Maria G, Polosa R (2006) Adenosine in the airways: Implications and applications. *Eur J Pharmacol* 533:77-88
52. Spsychala J (2000) Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 87:161-173

Table I. Characteristics of the three groups: age (years) and sex (male/female), and absence of CNS inflammatory disease.

	Control group (n=15)	Aseptic Meningitis (n=15)	Bacterial Meningitis (n=15)
Male	8	4	7
Female	7	11	8
Age	18 – 59 years	27 – 46 years	22 – 64 years
Inflammatory disease (CNS)	absence	presence	presence

Table II. Characteristics of the CSF in aspect, biochemistry and hematological analysis

	Control (n=15)	Aseptic Meningitis (n=15)	Bacterial Meningitis (n=15)
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Leukocytes (cells/mm ³)	2.29 \pm 1.82	89.07 \pm 110.28	4929.57 \pm 73.39
Neutrophils (%)	0 \pm 0	9.16 \pm 13.14	76.7 \pm 15.64
Lymphocytes (%)	100 \pm 0	81.83 \pm 15.79	15.00 \pm 14.40
Monocytes (%)	0 \pm 0	8.08 \pm 5.01	8.25 \pm 4.89
Protein (mg/dL)	41.96 \pm 19.20	86.11 \pm 490.63	274.63 \pm 61.11
Glucose (mg/dL)	53.20 \pm 7.02	58.71 \pm 14.93	39.14 \pm 18.15
CSF aspect Before centrifugation	clear	Superficially cloudy	Cloudy
CSF aspect After centrifugation	Colorless	Colorless	xanthochromic

Table III: Distribution of NTPDase and 5'-Nucleotidase activities after CSF centrifugation. (A) control group; (B) aseptic meningitis; (C) Bacterial meningitis

A	ATP (nmol P _i / min per mg)	ADP (nmol P _i / min per mg)	AMP (nmol P _i / min per mg)
S1	27.79 ± 0.39	33.29 ± 2.46	22.67 ± 0.29
P1	19.46 ± 1.05	20.59 ± 2.64	15.05 ± 1.64
S2	17.15 ± 0.72	22.37 ± 12.74	12.69 ± 1.21
P2	6.23 ± 2.94	11.03 ± 1.47	10.39 ± 16.17
B	ATP (nmol P _i / min per mg)	ADP (nmol P _i / min per mg)	AMP (nmol P _i / min per mg)
S1	33.66 ± 0.6	16.7 ± 0.46	9.55 ± 0.29
P1	2.3 ± 0.05	2.46 ± 0.64	2.65 ± 0.35
S2	17.5 ± 0.72	15.2 ± 1.74	8.9 ± 1.21
P2	1.23 ± 0.85	1.42 ± 0.47	1.3 ± 0.16
C	ATP (nmol P _i / min per mg)	ADP (nmol P _i / min per mg)	AMP (nmol P _i / min per mg)
S1	23.66 ± 0.68	17.5 ± 1.46	10.55 ± 0.59
P1	3.3 ± 0.5	3.67 ± 0.54	3.65 ± 0.45
S2	15.5 ± 0.52	13.2 ± 1.94	7.9 ± 1.3
P2	2.33 ± 0.95	1.82 ± 0.57	1.7 ± 0.26

CSF was centrifuged at low (4000g) and high (40 000g) speed to obtain two pellets (P1, P2) and two supernatants (S1, S2), respectively. The table shows the CSF hydrolytic activity for ATP, ADP and AMP present in pellets and supernatants (n=4). Results are expressed as mean ± S.D of three independent experiments.

FIGURES CAPTIONS

Fig. 1. ATP hydrolysis in CSF from aseptic (n=15) and bacterial (n=15) meningitis, and from control group (n=15). Data represent the mean \pm SD. * Indicate a significant difference at $p < 0.05$ between groups and control values.

Fig. 2. ADP hydrolysis in CSF from aseptic (n=15) and bacterial (n=15) meningitis, and from control group (n=15). Data represent the mean \pm SD. * Indicate a significant difference at $p < 0.05$ between groups and control values.

Fig. 3. 5'-Nucleotidase activity in CSF from aseptic (n=15) and bacterial (n=15) meningitis using AMP as substrate. Data represent the mean \pm SD. * Indicate a significant difference at $p < 0.05$ between groups and control values.

Figure 4. Alteration in lactate levels in CSF from aseptic (n=15) and bacterial (n=15) meningitis, and from control group (n=15). Data represent the mean \pm SD. * Indicate a significant difference at $p < 0.05$ between groups and control values.

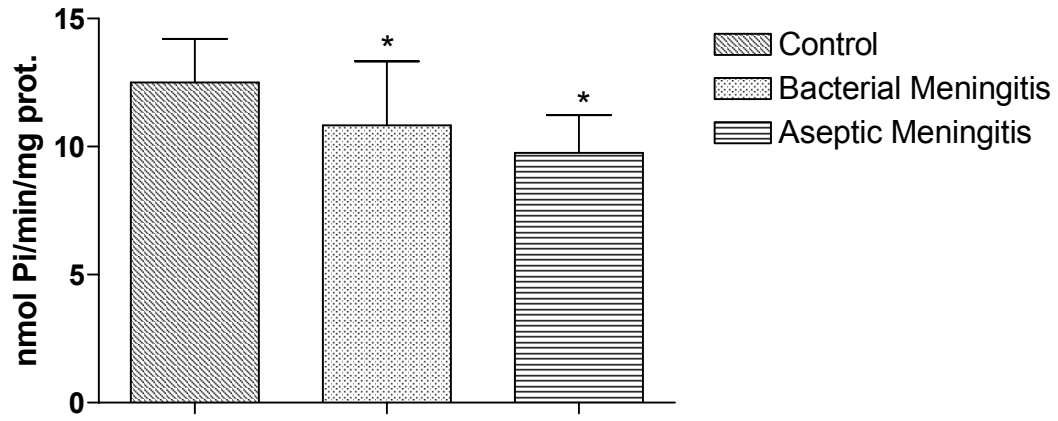


Fig. 1

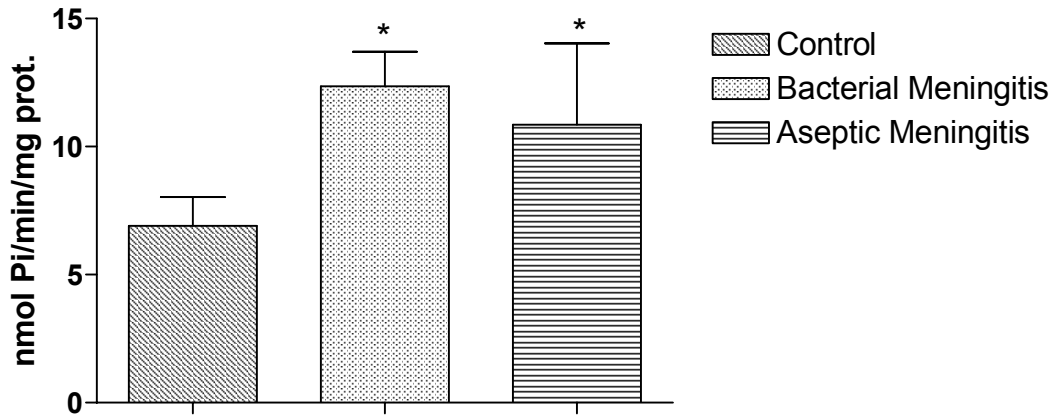


Fig. 2

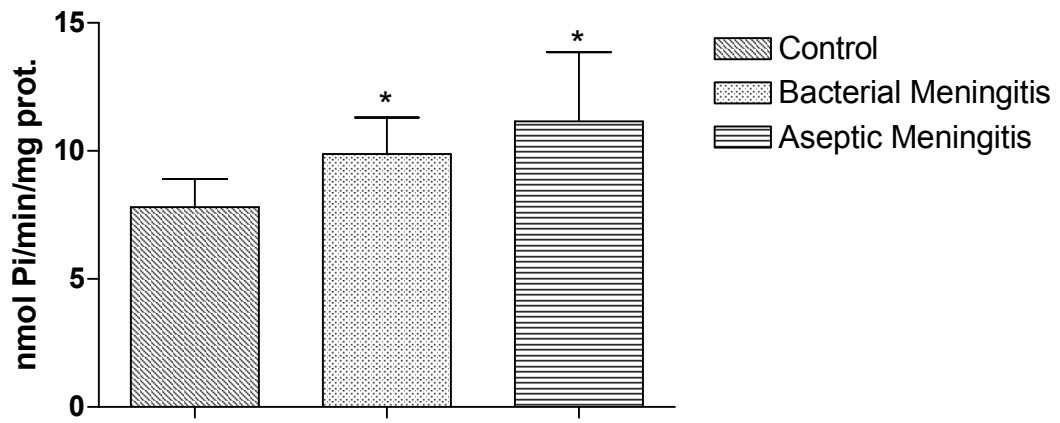


Fig. 3

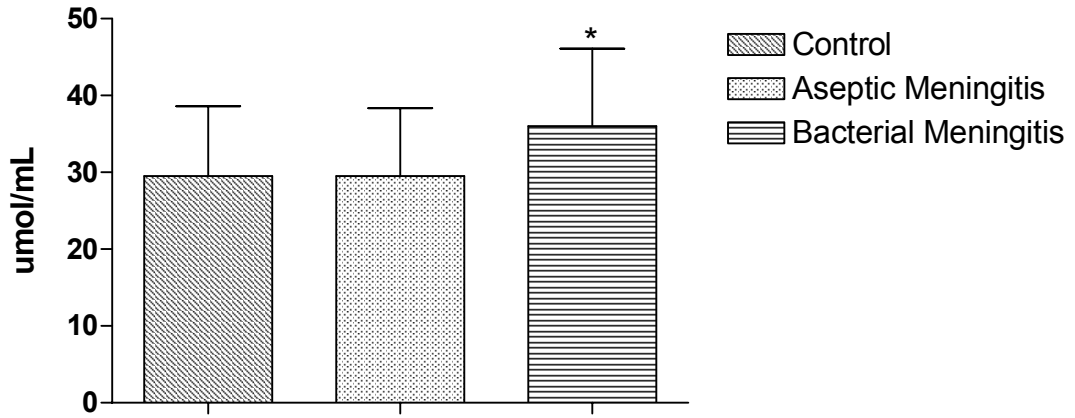


Fig. 4

4. DISCUSSÃO

Existe uma grande variedade de estudos a respeito da atuação das NTPDases em diferentes patologias (Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2004; Duarte et al., 2007), e também a respeito do papel do ATP e da adenosina no SNC (Cunha & Ribeiro, 2001; Latini & Pedata, 2001), entretanto não foi encontrado na literatura um estudo que relacionasse a hidrólise dos nucleotídeos da adenina no líquido de pacientes humanos com presença de processo inflamatório, como é o caso das meningites.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que houve uma hidrólise aumentada dos nucleotídeos ADP e AMP, o que provavelmente indica um aumento na produção de adenosina. Esse aumento pode ser atribuído às ações neuroprotetoras da adenosina no SNC (Pasini et al., 1999; Latini & Pedata, 2001), e também por atuar como um agente imunossupressor, tendo um papel relevante na resposta imune e inflamatória (Spychala, 2000).

Sabe-se que a enzima NTPDase1 é responsável também pela degradação do ADP até AMP (Robson et al., 2006), e que a enzima 5'-nucleotidase tem como função primordial a degradação do AMP para a produção de adenosina (Zimmermann, 1992). Alguns trabalhos apontam a existência e a importância das formas solúveis dessas enzimas no líquido (Portela et al., 2002; Di Virgilio et al., 2004). Neste trabalho, provavelmente formas solúveis foram expressas, devido ao fato de as maiores atividades de hidrólise ocorrerem na fração sobrenadante 1 do centrifugado do líquido.

Nosso estudo demonstrou também que houve uma diminuição na hidrólise do ATP, que pode ser explicada pelo fato de existirem NTPDases ligadas à membrana dos leucócitos (Salmi & Jalkanen, 2005), principais células recrutadas no processo inflamatório, como é o caso da meningite. Assim, talvez tenha ocorrido uma hidrólise do ATP pelas enzimas ligadas aos leucócitos e uma diminuição da hidrólise do ATP pelas enzimas solúveis.

De um modo geral, na literatura existem poucos estudos demonstrando a atividade enzimática das NTPDases e hidrólise dos nucleotídeos da adenina no líquido de humanos, apesar de haver uma grande quantidade de trabalhos a respeito

da atuação das NTPDases em várias regiões do sistema nervoso (Schetinger et al., 2001; Torres et al., 2002; Wink et al., 2003). Dessa forma acreditamos que nosso estudo foi o primeiro passo para verificação da presença dessas enzimas no líquido de humanos quando relacionadas à pacientes com meningite asséptica e bacteriana.

Adicionalmente, este trabalho encoraja a realização de trabalhos futuros com essas enzimas neste fluido biológico que é tão importante para o SNC. Além disso, enfatizamos o fato de que o ATP e a adenosina são moléculas que podem auxiliar no tratamento da meningite, agilizando as defesas auto-imunes, e também protegendo o SNC do dano causado por essa grave reação inflamatória das meninges.

5. CONCLUSÃO

- Ocorreu hidrólise dos nucleotídeos da adenina, ATP, ADP e AMP no Líquor dos pacientes com ausência de reação inflamatória no Líquor, e também nos pacientes possuindo diagnóstico positivo para meningite assépticas e meningite bacteriana.
- Houve diferença na hidrólise dos nucleotídeos de adenina dos pacientes com diagnóstico positivo para meningite quando comparados com pacientes controle. Observou-se uma diminuição do ATP provavelmente pela ação diminuída das nucleotidasas solúveis presentes neste líquido biológico, uma característica singular ao processo inflamatório gerado na meningite. Também foi observado um aumento na hidrólise do ADP e do AMP na tentativa de produzir adenosina, molécula com conhecidos efeitos benéficos em situações patológicas neurais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGTERESCH, H. J. et al. Adenosine triphosphate: established and potential clinical application. **Drugs**, v. 58, p. 211-232, 1999.

ARAÚJO, M. C. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochim Biophys Acta**, v. 1740, p. 421-426, 2004.

BEGG, N. et al. Consensus Statement on Diagnosis, Investigation, Treatment and Prevention of Acute Bacterial Meningitis in Immunocompetent Adults. **J Infect**, v. 39, p. 1-15, 1999.

BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'- triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and nflammation. **Pharmacol Ther**, v. 112, p. 358-404, 2006.

BUNSTOOK, G.; WILLIANS, M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 295, p. 862-869, 2000.

CUNHA, R. A.; RIBEIRO, J. A. ATP as a presynaptic modulator. **Life Sci**, v. 68, p. 119-137, 2000

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in nervous system: different role, different sources and different receptors. **Neurochem Int**, v. 38, p. 107-25, 2001.

CURTIS, G. D. W.; SLACK, M. P. E.; TOMPKINS, D. S. Cerebrospinal fluid lactate and the diagnosis of meningitis. **J Infection**, v. 3, p. 159-165, 1981.

DI TERLIZZI, R.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I – Function and composition. **Veterinary J**, v. 172, p. 422-431, 2006.

DI VIRGILIO, F.; BARICORDI, O. R.; ROMAGNOLI, R. E.T.; Leukocyte P2 receptors: A novel target for anti-inflammatory and anti-tumor therapy. **Curr Drug Targets**, v. 5, p. 85-99, 2004.

DUARTE, M. M. F. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS J**, v. 274, p. 2707-2714, 2007.

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

DUNWIDDIE, T. V.; FREDHOLM, B. B. Adenosine neuromodulation. In: JACOBSON, K. A.; JARVIS, M. F. (Eds). **Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics**. New York: Wiley-Liss, 1997. p. 359-382.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000. p. 679-685.

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

ILLES, P.; RIBEIRO, J. A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. **Eur J Pharmacol**, v. 483, p. 5-17, 2004.

KLEINE, T. O. et al. New and old diagnostic markers of meningitis in cerebrospinal fluid (CSF). **Brain Res Bull**, v. 61, p. 287-297, 2003.

KUNAPULI, S. P. et al. Platelet purinergic receptors. **Curr Opin Pharmacol**, v. 3, p. 175-180, 2003.

LAMARÃO, L. M. et al. Pesquisa de enterovírus em casos de síndrome de meningite asséptica de Belém, PA. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, p. 391-395, 2005.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **J Neurochem**, v. 79, p. 463-84, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839 p.

LEWIS, H.; GIBBON, F. M. Management of viral meningitis and encephalitis. **Curr Pediatr**, v. 10, p. 110-115, 2000.

LUNKES, G. I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thromb Res**, v 109, p. 189-194, 2003.

MALISZEWSKI, C. R. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen: Molecular cloning and structural characterization. **J Immunol**, v. 153, p. 3574-3583, 1994.

MARCUS, A. J. et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **J Thromb Haemost**, v. 1, p. 2497-2509, 2003.

MENAKER, J.; MARTIN, I. B. K.; HIRSHON, J. M. Marked elevation of cerebrospinal fluid white blood cell count: an unusual case of streptococcus pneumoniae meningitis, differential diagnosis, and a brief review of current epidemiology and treatment recommendations. **J. Emerg Med**, v. 29, p. 37-41, 2005.

NEUMANN, M. A.; THOMPSON, K. D. Acute bacterial meningitis: prevention and treatment. **Clin Microbiol Newsletter**, v. 20, p. 181-184, 1998.

PASINI, F. L. et al. Increase in plasma adenosine during brain ischemia in man: A study during transient ischemic attacks, and stroke. **Brain Res Bull**, v. 51, p. 327-330, 1999.

POPLE, I. K. Hydrocephalus and shunts: what the neurologist should know. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 73, p. 17-22, 2002.

PORTELA, L. V. C. et al. Guanine and adenine nucleotidase activities in rat cerebrospinal fluid. **Brain Res**, v. 950, p. 74-78, 2002.

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

RODRIGUEZ, A. F.; KAPLAN, S. L.; MASON, E. O. JR. Cerebrospinal fluids values in the very low birth weight infant. **J Pediatr**, v. 116, p. 971-74, 1990.

RUDOLPHI, K. A. et al. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, p. 439-445, 1992.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Molecular pathophysiology of bacterial meningitis: Current concepts and therapeutic implications. **J Pediatr**, v.116, p. 671-684, 1990.

SÁEZ-LLORENZ X, JR. MCCracken, G. H. Bacterial meningitis in children. **Lancet**, v. 361, p. 2139-2148, 2003.

SALMI, M.; JALKANEN, S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. **Nat Rev Immunol**, v. 5, p. 760-771, 2005.

SANVITO, V. L. **Síndromes Neurológicas**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. 599 p.
SCHETINGER, M. R. C. et al. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comp Biochem Physiol B**, v. 128, p. 731-741, 2001.

SICKMANN, A. et al. Towards a high resolution separation of human cerebrospinal fluid. **J Chromatogr B**, v. 771, p. 167-196, 2002.

SCHIRMER, M. Neurocirurgia. 7. ed. São Paulo: Santos Editora, 1995. 345 p.

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacol Ther**, v. 87, p. 161-173, 2000.

SPRONK, H. M. H.; VAN DER VOORT, D.; TEN CATE, H. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. **Thrombosis Journal**, v. 2, p. 1-10, 2004.

STRAUSSBERG, R. et al. Absolute Neutrophil Count in Aseptic and Bacterial meningitis related to time of lumbar puncture. **Pediatr Neurol**, v. 28, p. 365-369, 2003.

STRASINGER, S. K. **Uroanálise & fluidos biológicos**. 3. ed. São Paulo: Premier, 2000. 233 p.

TORRES, I. L. S. et al. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, p. 181-186, 2002.

VON LUBITZ, D. K. J. E. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? **Eur J Pharmacol**, v. 365, p. 9-25, 1999.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an Ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase. **J Biol Chem**, v. 271, p. 9898-9901, 1996.

WANG, Y.; CHAMBERS, K. C. The meninges contribute to the conditioned taste avoidance induced by neural cooling in male rats. **Behav Brain Res**, v. 134, p. 9-19, 2002.

WINK, M. R. et al. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. **Cancer Letters**, v. 198, p. 211-218, 2003.

WEISFELT, M. et al. Procoagulant and fibrinolytic activity in cerebrospinal fluid from adults with bacterial meningitis. **J Infect**, v. 54, p. 545-550, 2007.

Zimmermann, H. 5'-Nucleotidase molecular structure and functional aspects. **J Biochem**, v. 285, p. 345-365, 1992.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and function roles of ectonucleotidases in the nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 49, p. 589-618, 1996.

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

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note nomenclature. **Drug Dev Res**, v. 52, p. 45-45, 2001.

ANEXOS

Anexo A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo um projeto de pesquisa intitulado: **POSSÍVEIS ALTERAÇÕES DA HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM PACIENTES COM MENINGITE** através da mestrandia Aracélli Gnatta Dorneles, orientada pela Prof^a Dra. Vânia Lucia Loro, que tem como objetivo verificar se ocorrem mudanças no líquido de pacientes com diagnóstico positivo para meningite. Justifica-se este estudo levando-se em conta a importância de verificar se certas substâncias que fazem parte do líquido apresentam alterações na meningite. Futuramente, essa avaliação poderá ser um incremento no diagnóstico de patologias.

O Sr ou Sra está sendo convidado a participar deste estudo autorizando a utilização do líquido que sobraram de exames solicitados por seus médicos. Todo o material utilizado para a coleta será descartado e/ou desinfetado. Este estudo não envolve risco adicional a sua vida. As amostras serão tratadas de acordo com os protocolos experimentais estabelecidos.

Fica garantido que os dados coletados ficarão sob responsabilidade do pesquisador e que os mesmos serão utilizados apenas para fins científicos, sem que o paciente seja identificado, garantindo assim o anonimato.

A participação neste estudo é livre e voluntária, sendo que não haverá nenhuma forma de compensação financeira ou custos para o Sr ou a Sra. A recusa na sua participação não leva a nenhum prejuízo ou comprometimento dos seus cuidados de saúde.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que estou de acordo em participar deste projeto de pesquisa, livre de qualquer constrangimento, pois fui informado (a) de forma clara e detalhada dos objetivos e dos procedimentos que serão realizados. Fui igualmente informado da garantia de receber respostas a qualquer dúvida que ainda puder ter sobre assuntos

relacionados com a pesquisa, e da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízo de qualquer ordem.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu, _____ assinando este consentimento estou de acordo em participar desta pesquisa.



Santa Maria, ____ de _____ 200__.

Assinatura

Vânia Lucia Loro/ Pesquisadora/ (55) 32209456 – (55) 81296914

Aracélli Gnatta Dorneles/ Aluna de mestrado/ (55) 91278275/ Rua: Araújo Viana 1547 apto 304.

Anexo B

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Possíveis alterações da hidrólise de nucleotídeos de adenina em pacientes com meningite

Número do processo: 23081.017441/2006-97

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0148.0.243.000-06

Pesquisador Responsável: Vânia Lúcia Loro

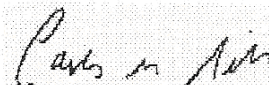
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Março/2008	Relatório parcial
Janeiro/2009	Relatório final

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

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:	06/02/2007
DATA DA APROVAÇÃO DA EMENTA:	28/09/2007

Santa Maria, 28 de Setembro de 2007.



Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM
Registro CONEP N. 243.