

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Maria Emilha Basso

**METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DA  
ADENINA EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE PACIENTES COM  
HEPATITE C**

**Santa Maria, RS  
2016**

**Maria Emilha Basso**

**METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DA ADENINA EM  
LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE PACIENTES COM HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS  
2016

**Maria Emilha Basso**

**METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DA ADENINA EM  
LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE PACIENTES COM HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 19 de julho 2016:**

---

**Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**

---

**José Edson Paz da Silva Dr. (UFSM)**

---

**Carlos Eduardo Blanco Linares Dr. (URI)**

Santa Maria, RS  
2016

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho...*

*... aos meus pais, Moacir e Ivania pelo amor e carinho de sempre.*

*... ao meu esposo Thiago, pela compreensão, carinho e companheirismo.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me mostrar o caminho, iluminar e proteger nesta jornada.

- Agradeço aos meus pais pelo apoio de sempre, incentivo ao estudo e por me fornecerem todo o suporte necessário para chegar à realização deste sonho.
- Ao meu esposo Thiago, primeiramente pelo seu companheirismo, por sua doação, amizade, apoio e carinho que me deram base nas horas difíceis.
- Ao meu sogro e minha sogra, que me acolheram como filha e da mesma forma que meus pais me deram apoio para a realização deste sonho.
- Ao meu irmão e à minha cunhada que sempre torceram por esta conquista.
- À minha orientadora Daniela, a qual me deu a oportunidade de estudo, pelo apoio, compreensão e incentivo.
- Aos colegas de laboratório Jamile, Cláudia, Jader, Josi, Paulo Guilherme que me auxiliaram nesta trajetória.
- Ao colega do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Assis, que muito colaborou na construção deste trabalho.
- Em especial à Lívia e Mari que não mediram esforços para me ajudar, mesmo que à distância, e pela sua amizade de sempre, meu sincero muito obrigada!
- Ao Farmacêutico do CAMMI de Santa Maria, que me forneceu instrumentos para realização deste trabalho.

*“Em cada um de nós há um segredo, uma paisagem interior, com planícies invioláveis, vales de silêncio e paraísos secretos.”*  
*Antoine de Saint-Exupéry*

## RESUMO

### METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DA ADENINA EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE PACIENTES COM HEPATITE C

AUTORA: Maria Emilha Basso

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus HCV, caracterizado pelo desenvolvimento de inflamação, bem como da fibrose. Já os nucleotídeos de adenina e seu nucleosídeo são moléculas de sinalização importantes no meio extracelular, que podem modular as respostas inflamatórias em plaquetas e linfócitos. O objetivo deste estudo foi determinar as atividades de ectoenzimas [ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) e ecto-adenosina desaminase (E-ADA)], presentes em plaquetas e linfócitos de pacientes com hepatite C. Vinte e cinco pacientes com sorologia positiva para HCV e cinquenta indivíduos aparentemente saudáveis, com sorologia negativa para HCV (grupo controle) foram selecionados para este estudo. Em linfócitos, foi observada uma menor hidrólise de ATP ( $P < 0,001$ ), e uma maior hidrólise de ADP ( $P < 0,001$ ) pela E-NTPDase, e uma maior atividade da E-ADA ( $P < 0,001$ ) em pacientes com HCV, quando comparados com o grupo de controle. Ainda, os resultados em plaquetas revelaram uma maior hidrólise de ATP e ADP pela E-NTPDase e uma maior atividade da E-ADA em pacientes com hepatite C quando comparados com o grupo controle. Também foram observados níveis séricos aumentados de IL-4 e IL-10 ( $P < 0,05$ ) e redução de IL-6 ( $P < 0,05$ ). Em conclusão, os resultados mostraram que as atividades das E-NTPDases e E-ADA foram alteradas em linfócitos e plaquetas de pacientes com hepatite C. Essas alterações podem representar possíveis mecanismos reguladores para evitar danos ao fígado. Além disso, a diminuição nos níveis séricos de IL-6, bem como produção aumentada de IL-4 e IL-10 podem sugerir uma resposta anti-inflamatória e possíveis mecanismos compensatórios a fim de minimizar a lesão hepática.

**Palavras-chave:** Hepatite C, os linfócitos, plaquetas, ectoenzimas, citocinas, sinalização purinérgica.

## ABSTRACT

### METABOLISM OF NUCLEOTIDE AND NUCLEOSIDE ADENINE IN LYMPHOCYTES AND PLATELETS OF PATIENTS WITH HEPATITIS C

AUTHOR: Maria Emilha Basso  
ADVISOR: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Hepatitis C is an infectious disease caused by Hepatitis C virus (HCV) and characterized by development of inflammation as well as fibrosis. On the other hand, the extracellular nucleotides and adenine nucleosides are important signaling molecules that can modulate inflammatory responses in platelets and lymphocytes. This study sought to determine the activities of ectoenzymes [ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) and ecto-adenosine deaminase (E-ADA)] that metabolize nucleotides in platelets and lymphocytes and to evaluate cytokine levels of patients with HCV. Twenty five HCV patients and fifty healthy subjects (control group) were selected for this study. In lymphocytes, was observed a lower ATP hydrolysis ( $P<0.001$ ), and higher ADP hydrolysis ( $P<0.001$ ) and E- ADA activity ( $P<0.001$ ) in HCV patients when compared to the control group. In addition, the results revealed a higher ATP and ADP hydrolysis by E-NTPDase and higher E-ADA activity in platelets of HCV patients when compared with the control group. Also, IL-4 and IL-10 were significantly ( $P<0.05$ ) increased while IL-6 was decreased ( $P<0.05$ ) in HCV patients. In conclusion, the results showed that the activities of E-NTPDase and E-ADA were altered in both lymphocytes and platelets of HCV patients. These alterations in enzymes activities may be possible regulatory mechanisms in an attempt to manage liver damage and ongoing inflammatory process. Furthermore, decreased IL-6 as well as increased IL-4 and IL-10 in HCV patients may suggest an antiinflammatory process and possible compensatory mechanisms in minimizing liver injury.

**Keywords:** Hepatitis C, lymphocytes, platelets, ectoenzymes, cytokines, purinergic signaling.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prevalência de Hepatite C por região em percentual.....	12
Figura 2 – Estrutura do HCV .....	14
Figura 3 – Genoma do HCV .....	15
Figura 4 – Representação esquemática da cascata purinérgica.....	20
Figura 5 – Liberação de ATP extracelular .....	21
Figura 6 – Membros da família das NTPDases.....	23

## MANUSCRITO

**Figura 1.** ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by E-NTPDase in lymphocytes of Hepatitis C and control patients. Enzyme specific activities were reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*\*\*”) indicates a significant difference ( $P<0.001$ ) between the Hepatitis C patients (n=25) and control (n=50). Student's *t* test for independent samples was used for all the analyses..... 46

**Figura 2.** ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis by E-NTPDase and E-5'-nucleotidase in platelets of Hepatitis C patients (n=25) and controls (n=50). Enzyme specific activities were reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*\*\*”) and (“\*\*”)  $P<0.001$  and  $P<0.01$ , respectively. Student's *t* test for independent samples was used for all the analyses..... 46

**Figura 3.** Adenosine deamination in lymphocytes (A) and platelets (B) of patients with Hepatitis C and controls. Enzyme activities were reported as U/mg protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*\*\*”) indicates a significant difference ( $P<0.001$ ) and (“\*\*”) indicates a significant difference ( $P<0.05$ ), with n=50 (controls) and n=25 (Hepatitis C patients) (Student's *t* test for independent samples). ..... 46

**Figura 4.** Serum levels of TNF, IFN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 from patients with Hepatitis C and control group. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*”) indicates a significant difference ( $P<0.05$ ); control (n=50) and Hepatitis C patients (n=25) (Student's *t* test for independent samples)... 46

## LISTA DE TABELAS

Table 1: <i>In vitro</i> effects of antiretrovirals on E-NTPDase activity in lymphocytes .....	47
Table 2: <i>In vitro</i> effects of antiretrovirals on E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities in platelets.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADA:** Adenosina desaminase

**ADP:** Adenosina difosfato

**AMP:** Adenosina monofosfato

**ATP:** Adenosina trifosfato

**E-ADA:** Ecto- adenosina desaminase

**E-NTPDase:** Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

**E-NPP:** Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

**E-5-NT:** Ecto-5'-nucleotidase

**HCV:** Vírus da hepatite C

**HIV:** Vírus da imunodeficiência humana

**IL-1:** Interleucina-1

**IL-6:** Interleucina-6

**MS:** Ministério da Saúde

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**RNA:** Ácido ribonucleico

**Th1:** Linfócito T helper 1

**Th2:** Linfócito T helper 2

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa

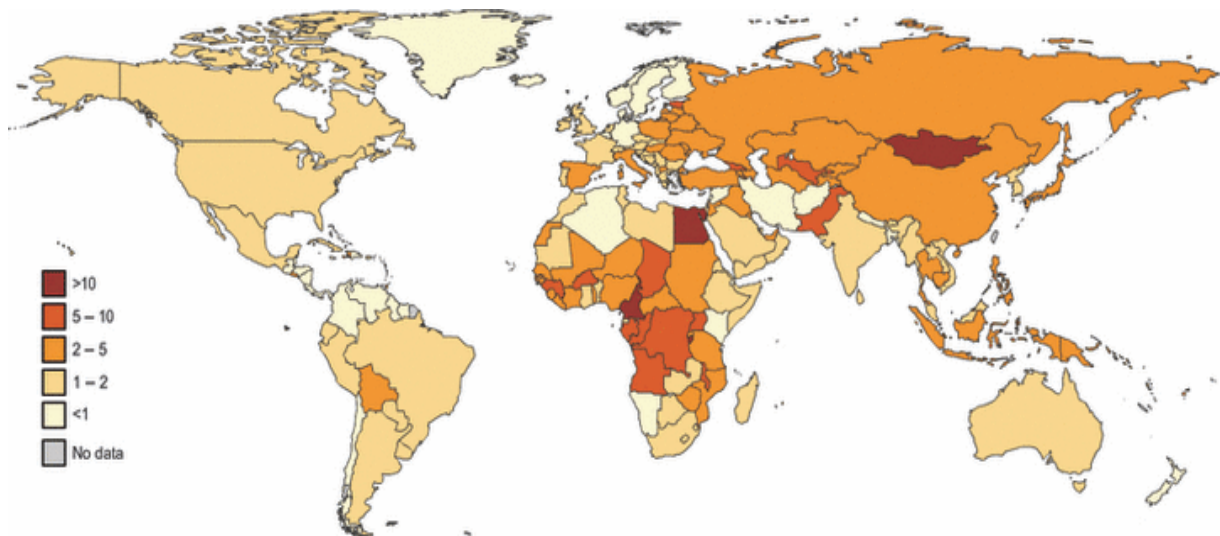
## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3 MANUSCRITO .....</b>	<b>29</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>60</b>
Anexo A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO .....	60
Anexo B – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE .....	63
Anexo C – QUESTIONÁRIO .....	64
Anexo D – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma infecção viral causada pelo vírus da hepatite C (HCV) que dependendo da intensidade e do tempo de duração pode levar a danos permanentes no fígado como cirrose e câncer. Sua prevalência está distribuída de forma variada nas diferentes regiões, podendo representar entre 123 milhões e 170 milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo que mais de 350 mil pessoas morrem devido a doenças hepáticas relacionadas com a hepatite C a cada ano. Neste contexto, o Brasil encontra-se classificado como um país de prevalência intermediária, com uma variação entre 1% e 2% como ilustrado na Figura 1 (MARTINS et al., 2011; ZHU et al., 2014).

Figura 1 - Prevalência de Hepatite C por região em percentual



Fonte: Lavanchy, 2011.

Os dados epidemiológicos referentes à Hepatite C ainda são escassos, principalmente no Brasil, sendo um difícil processo o da construção de dados com informações confiáveis. Sabe-se que a doença está distribuída no mundo todo, acometendo principalmente indivíduos de nível socioeconômico baixo, adultos jovens e predomínio do sexo masculino (FOCACCIA, BARALDO, SOUZA, 2003).

Dos indivíduos infectados pelo HCV, em média, 15% consegue a eliminação espontânea do vírus, 25% desenvolvem doença assintomática e sua grande maioria, representando em torno de 60% dos pacientes infectados desenvolve hepatite C crônica (MARCELIN, 1999).

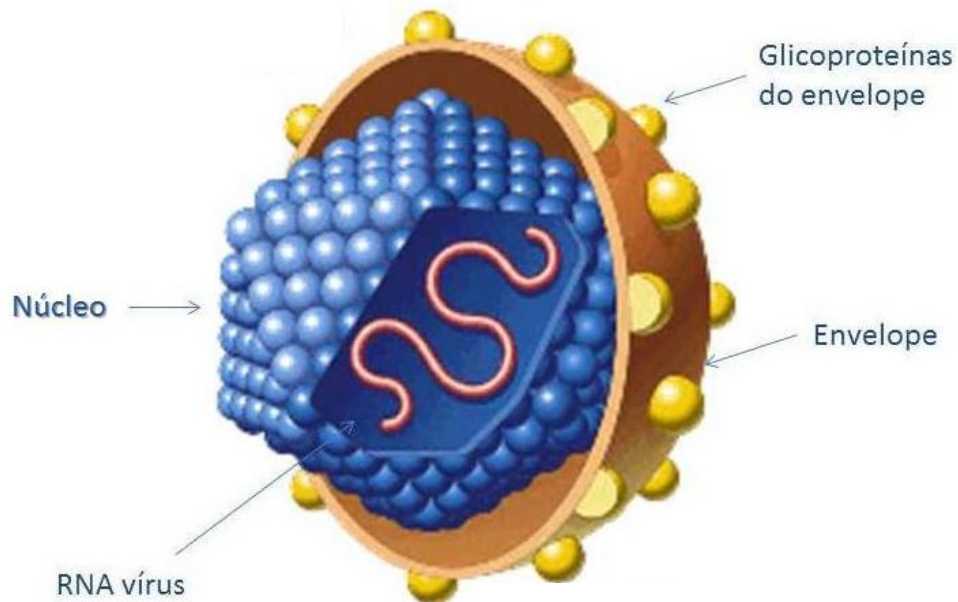
Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo HCV ainda não foram completamente elucidados. A grande capacidade mutagênica do vírus, o desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 e a possível interação entre as proteínas virais e do hospedeiro seriam alguns mecanismos responsáveis pela incapacidade de eliminação do HCV e pela gravidade da lesão hepática (STRAUSS, 2001).

A história dos conhecimentos relacionados ao processo saúde/doença das hepatites virais é encontrada na literatura há milênios, a partir de relatos chineses que faziam referência à ocorrência de icterícia em sua população (DA FONSECA, 2010). No Brasil, os relatos anteriores ao século XIX são escassos. Nos anos 80 uma constante interrogação havia entre os pesquisadores, referente à existência de uma doença sem um agente etiológico identificado, caracterizando um tipo de hepatite pós-transfusional não-A e não-B (DA FONSECA, 2010).

Apenas em 1989, após sete anos de estudo, Michel Houghton, Qui-Lim-Choo, George Kno e Daniel Bradley, conseguiram por meio de biologia molecular, a clonagem de partes do vírus C e também um teste capaz de identificar o vírus em indivíduos infectados (BRASIL, 2005).

Assim sendo, o HCV é classificado como um vírus de RNA, da família *Flaviviridae* e gênero *Hepacivirus* com genoma de sentido positivo, cadeia simples e medindo cerca de 10 kb de comprimento (FERREIRA; DA SILVEIRA, 2004; STRAUSS, 2001). Sua estrutura encontra-se representada na figura 2:

Figura 2 – Estrutura do HCV



Fonte: adaptado de [http://www.hepcentro.com.br/hepatite\\_c.htm](http://www.hepcentro.com.br/hepatite_c.htm). Acessado em 20/06/2016.

Este genoma de fita simples é responsável por codificar um grande polipeptídeo composto de aproximadamente 3.000 aminoácidos (PENIN et al., 2004). Ainda, a ação de proteases virais e celulares é responsável pela clivagem da poliproteína precursora formando assim, as proteínas estruturais do “core” e do “envelope” (E1 e E2) e as proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Figura 3) (GIANNINI; BRÉCHOT, 2003).

Figura 3 – Genoma do HCV



Fonte: Adaptado de HUGO; ROSEN, 2011.

Basicamente, a transmissão do HCV ocorre pelo contato direto com sangue infectado, decorrente de exposição percutânea, transfusão de sangue e/ou hemoderivados e transplantes realizados a partir de doadores infectados (BRASIL, 2011). Ainda, outros meios de transmissão podem ocorrer através do compartilhamento de seringas por usuários de drogas injetáveis, exposição ocupacional à sangue contaminado, transmissão vertical e relação sexual desprotegida com parceiro infectado (ALTER, 2007).

O Ministério da Saúde (MS) enquadra como populações de risco para infecção pelo HCV: indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993; usuários de drogas injetáveis e outros tipos de drogas que compartilhem de equipamentos contaminados; indivíduos que compartilham equipamentos não esterilizados utilizados por manicures e podólogos; indivíduos submetidos a procedimentos de colocação de piercing e/ou tatuagens e ainda aqueles que realizaram procedimentos cirúrgicos, odontológicos, de hemodiálise e de acupuntura sem os devidos cuidados preventivos (BRASIL, 2011).

Observando-se a importância da ocorrência de infecção pelo HCV, têm-se disponível desde 1989, ano em que foi decodificado seu genoma, testes laboratoriais para diagnóstico. Basicamente, o diagnóstico da infecção por HCV é baseado em métodos sorológicos e em técnicas de biologia molecular (BRANDÃO et al., 2001).



Dentre os testes laboratoriais realizados estão os testes de rastreamento, como os imunoenaios enzimáticos (ELISA), os quais realizam a pesquisa de anticorpos contra o HCV. A rapidez no processamento, a facilidade de automação, a alta confiabilidade e o baixo custo destes testes os caracterizam como consideravelmente vantajosos, sendo que sua única desvantagem seria a baixa especificidade, fato este que proporcionou o desenvolvimento de testes suplementares para confirmação diagnóstica de infecção pelo HCV em indivíduos com resultados positivos (DE MEDINA; SCHIFF, 1995; REIS, 1998).

Desta forma, o diagnóstico de infecção pelo HCV tem como padrão ouro a determinação do RNA do HCV através da reação em cadeia da polimerase (PCR). O método é capaz de ampliar sequências genéticas específicas de forma que uma única molécula de DNA pode ser detectada na presença de milhões de outras (BRANDÃO et al., 2001).

Em relação ao tratamento da hepatite C, o grande problema está no reconhecimento das pessoas infectadas, as quais muitas vezes não possuem conhecimento de seu estado. Portanto o rápido diagnóstico e a caracterização da doença por genotipagem são essenciais para que se inicie sua terapêutica (SALUDES, 2014).

Sabe-se que até a década de 1990 o interferon- $\alpha$  era a única medicação disponível para o tratamento da hepatite C crônica, mas infelizmente, apenas 5% a 20% dos pacientes tratados apresentavam negatificação do RNA do HCV após 48 semanas de tratamento. Esta baixa porcentagem de sucesso terapêutico incentivou o desenvolvimento de estudos que utilizassem a terapia combinada de interferon- $\alpha$  com ribavirina, um análogo nucleosídeo sintético, o que apresentou resultados positivos, havendo persistência de negatificação do RNA do HCV 24 semanas após o término do tratamento (ALVES et al., 2003).

No Brasil, o tratamento para hepatite C crônica foi estabelecido por diretrizes do MS, pelo Decreto Ministerial, revisado em 2011 (BRASIL, 2011). Esta diretriz recomenda que pacientes de genótipo tipo 2 ou 3 devem ser tratados com interferon- $\alpha$  e ribavirina durante 24 semanas e os de genótipo tipo 1 devem ser tratados com peginterferon e ribavirina por 48 semanas (GONÇALVES et al., 2012). Foi aprovada para o tratamento de infecção crônica pelo genótipo tipo 1 em diversos países, a terapia tripla que inclui um inibidor da protease específica-HCV (GHANY et al., 2011).

A variação nos tratamentos em relação aos genótipos 1, 2 e 3 pode ser explicada por estudos onde foi sugerido que pacientes infectados com genótipos 1b e, em menor grau, 1a não apresentariam uma resposta significativamente favorável ao tratamento com interferon quando comparados aos que estão infectados com o genótipo tipo 2 ou 3 (ZEIN, 2000).

Recentemente, o MS lançou o novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções visando uma melhoria na qualidade de vida do paciente e aumento da possibilidade de cura. Assim sendo, três novos medicamentos foram incluídos ao protocolo de tratamento da hepatite C, sendo eles Sofosbuvir, Daclatasvir e Simeprevir, destacando-se que a nova terapia apresenta posologia simples e administração via oral, mínimos efeitos adversos, menor interação medicamentosa e uma porcentagem de cura superior a 90%, ressaltando-se que o tratamento anterior apresenta apenas 40-47% de cura, o que promete alavancar o processo saúde/doença dos pacientes portadores de hepatite C (BRASIL, 2015).

A elevada capacidade mutagênica do HCV é responsável pela intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro, sendo que tanto a hepatite aguda quanto a hepatite crônica são geralmente observadas como assintomáticas. A evolução para hepatite crônica é caracterizada pela manutenção do RNA-HCV por mais de seis meses após a infecção, observando-se que um total de 85% da população infectada evolui para cronicidade, cirrose e carcinoma hepatocelular (FERREIRA; DA SILVEIRA, 2004; STRAUSS, 2001).

Esta potencial capacidade de cronicidade tem representado a principal razão para transplante de fígado nos Estado Unidos, de forma que este fato incentivou a busca por uma vacina universal eficaz com a finalidade de prevenir novos casos. Este processo é dificultado pela heterogeneidade do genoma do HCV, que está caracterizado em sete genótipos, os quais são subdivididos em grupos. Ainda, variações do HCV dentro de um mesmo genótipo e subtipo podem ser encontradas, sendo denominadas quasispecies (STRAUSS, 2001; ZEIN, 2000).

Para que se inicie o desenvolvimento de processo infeccioso e replicação viral, primeiramente é necessário que ocorra a entrada do vírus na célula. Poucos estudos relatam os mecanismos específicos sobre a entrada do HCV nos hepatócitos, mas acredita-se ser um processo altamente coordenado e que envolva várias moléculas de superfície celular em etapas sequenciais. Recentes pesquisas

demonstraram um papel importante desempenhado pela proteína tirosina quinase no processo de regulação da entrada do HCV na célula (ZHU et al., 2014).

Após a entrada do HCV na célula e conseqüente instalação do processo infeccioso o organismo reage exibindo dois tipos de respostas imunes, a inata e a adaptativa. A resposta inata é a primeira barreira imunológica e também atua como um ativador da segunda linha de defesa imunológica, a resposta adaptativa. Esta desempenha importante papel nas infecções virais não citopáticas, ou seja, aquelas onde não ocorrem alterações morfológicas nas células infectadas por vírus, como é o caso da hepatite C, devido à capacidade deste tipo de infecção permanecer oculto ao sistema imune inato. Permanecendo oculto, o HCV é capaz de escapar do controle imunológico, possuindo grande capacidade de permanecer em altas porcentagens em hospedeiros. Para tanto, a resposta imune adaptativa realiza papel essencial reconhecendo as células infectadas e destruindo-as por mecanismos citopáticos e não citopáticos (LARRUBIA et al., 2014).

A lesão hepática seria decorrente desta grande dificuldade de eliminação do vírus, onde o processo inflamatório contínuo seria o responsável pelo desencadeamento da fibrinogênese, a qual se desenvolve através do reconhecimento imunológico e destruição da célula infectada. Pode-se caracterizar a fibrose como um processo de cicatrização tecidual, onde o processo pode se apresentar de formas variadas dependendo da causa da doença hepática, de fatores ambientais e do estado de saúde do indivíduo (STRAUSS, 2001; YANG et al., 2003).

Pellicoro e col. (2014) sugerem que o sistema imune tenha papel importante na regulação e equilíbrio do processo fibrótico. A fibrose é precedida de inflamação e os elementos tanto da resposta imune quanto adaptativa são fundamentais na regulação do processo. Quando ocorre dano ao tecido hepático uma gama de mediadores inflamatórios são liberados para que se inicie uma cascata de coagulação anti-fibrinogênica. Leucócitos são recrutados ao local da lesão para que fagocitem células mortas e amplifiquem a resposta inflamatória através da geração de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6), IL-1, e recrutamento de células T (BATALLER; BRENNER, 2005).

Outro processo ativado em decorrência à lesão hepática é conhecido como ativação ou transdiferenciação das células estreladas hepáticas, onde elas passam a expressar um fenótipo miofibroblástico. Estas células, no fígado normal se

apresentam no estado quiescente, caracterizado pela presença de gotas lipídicas no citoplasma contendo vitamina A na forma de éster de retinila. Quando ativadas, as células estreladas hepáticas perdem esta capacidade de armazenar retinóides, mudam a organização e morfologia do citoesqueleto, produzem substâncias quimiotáticas responsáveis por recrutar células inflamatórias e outras células estreladas hepáticas tornam-se fibrinogênicas (FRIEDMAN, 2008).

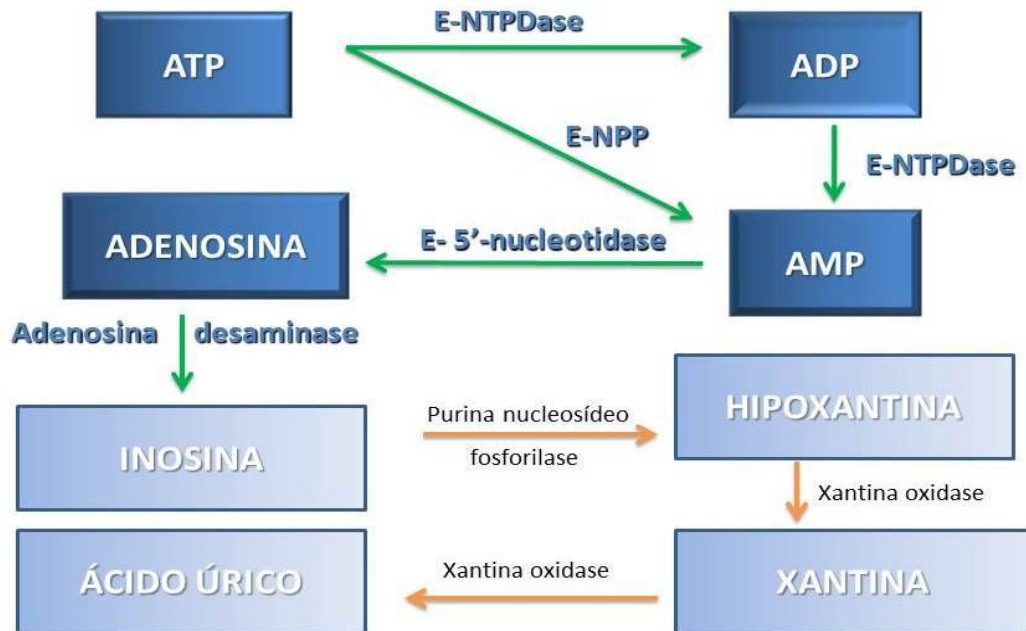
Representando uma importante via de sinalização em diferentes tecidos, o sistema purinérgico está diretamente envolvido em eventos de curta e longa duração como a resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, proliferação e morte celular (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; YEGUTKIN, 2008).

Possui três componentes principais, representados na figura 4 (ATKINSON et al., 2006):

- 1) os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares como moléculas mediadoras da sinalização;
- 2) os receptores purinérgicos específicos através dos quais os nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos;
- 3) as ecto-enzimas, responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas.

Diferentes tipos celulares são capazes de expressar componentes da sinalização purinérgica, como plaquetas, linfócitos e células endoteliais, de forma que possibilitam a formação de complexos personalizados de sinalização purinérgica (JUNGER, 2011).

Figura 4 – Representação esquemática da cascata purinérgica



Fonte: Adaptado de JUNGER, 2011.

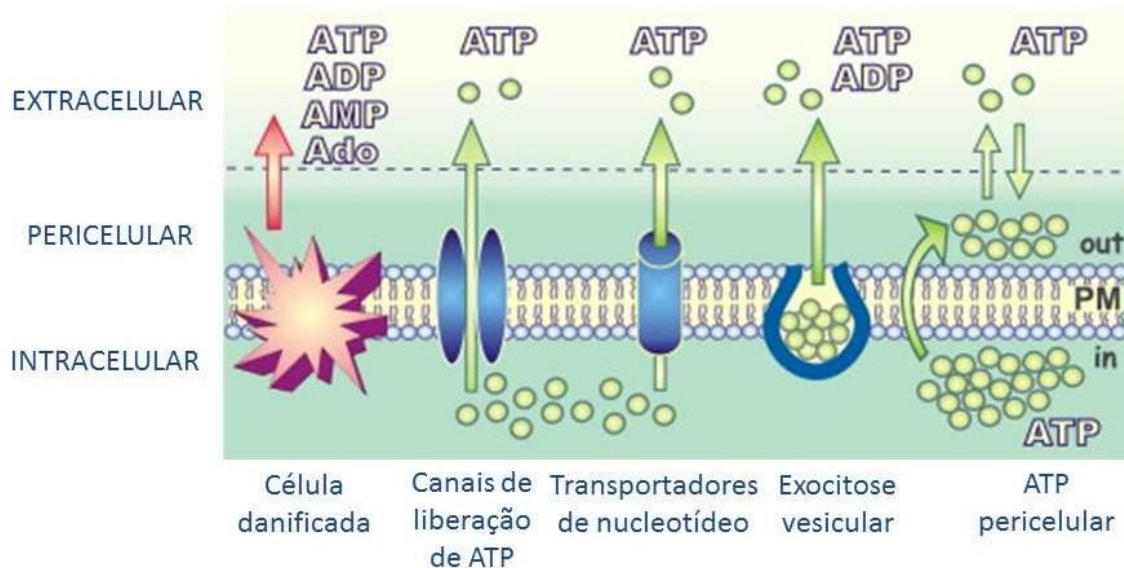
Formados a partir da união de uma base nitrogenada (púrica ou pirimídica) e uma pentose, os nucleotídeos e seu derivado nucleosídeo caracterizam-se como moléculas extracelulares que desempenham importantes atividades biológicas como a modulação da resposta imune (ATKINSON et al., 2006; BIRK et al., 2002).

Esses nucleotídeos e nucleosídeo extracelulares são considerados importantes moléculas sinalizadoras necessárias para o início e manutenção das reações inflamatórias, tendo seus efeitos mediados através dos receptores purinérgicos P1 e P2 localizados na superfície celular (BIRK et al., 2002).

O início da cascata de sinalização purinérgica acontece quando há liberação do nucleotídeo ATP em meio externo, o que pode ser provocado por diferentes estímulos, como a lise de células decorrente de dano celular (Figura 5) (YEGUTKIN, 2008). O proporcional aumento de ATP em meio externo é interpretado pelo sistema imune como um “sinal de perigo”, considerando-se os efeitos danosos deste nucleotídeo quando em meio extracelular. Assim, é estabelecido um processo inflamatório local, havendo recrutando de linfócitos, citocinas pró-inflamatórias e

liberação de histamina pelos mastócitos (DI VIRGILIO 1998, LANGSTON et al., 2003).

Figura 5 – Liberação de ATP extracelular



Fonte: Adaptado de YEGUTKIN, 2008.

Sendo gerado a partir da hidrólise de ATP, o ADP possui importante função por estimular a adesão, ativação e agregação plaquetária, podendo assim, colaborar na formação de processos trombóticos (PILLA et al., 1996).

O AMP é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP (BARSOTTI; IPATA, 2004) que possui função como sinalizador em situações de desequilíbrio no metabolismo, servindo também como substrato para a formação de adenosina (CUNHA, 2001; LATINI; PEDATA, 2001).

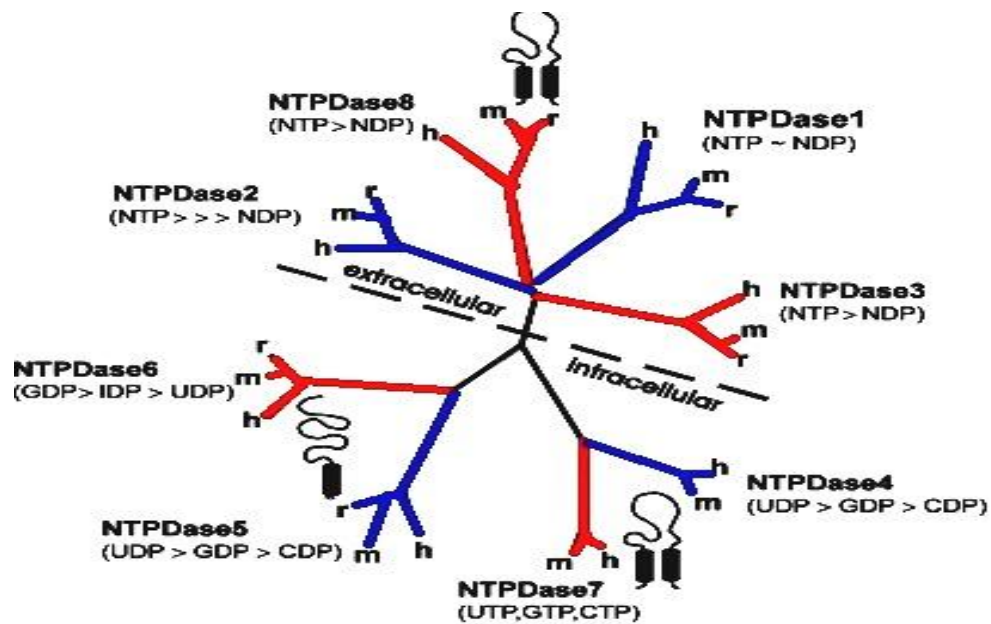
Sendo formada a partir do precursor ATP (BARSOTTI; IPATA, 2004), a adenosina é reconhecida por suas propriedades anti-inflamatórias (CRONSTEIN, 1994), vasodilatadoras, neuroprotetoras (JACOBSON et al., 2006), e imunossupressoras (SPYCHALA et al., 1997), além de atuar como um potente inibidor da agregação plaquetária induzida pelo ADP (BOROWIEC et al., 2006). Ainda, tem função cardioprotetora em episódios de isquemia ou hipóxia e insuficiência cardíaca (MINAMINO et al., 1996, HASKO; CRONSTEIN, 2004).

Esses nucleotídeos extracelulares são considerados importantes moléculas sinalizadoras necessárias para o início e manutenção das reações inflamatórias, tendo seus efeitos mediados através dos receptores purinérgicos P1 e P2 localizados na superfície celular (BIRK et al, 2002). Os receptores P1 são responsivos à adenosina, enquanto os receptores P2 ligam preferencialmente nucleosídeos tri e difosfatados, possuindo baixa afinidade pelos monofosfatados. (SEVIGNY et al, 2000). Os purinoreceptores P2 podem ainda ser divididos em duas subclasses: acoplados à proteína G (metabotrópicos), chamados de P2Y e os ligados a canais iônicos (ionotrópicos), designados P2X (DI VIRGÍLIO et al, 2001). Em especial, o receptor subtipo P2X7 pode funcionar como um poro iônico não-seletivo em mastócitos, plaquetas, macrófagos e linfócitos (DI VIRGILIO et al., 1999; DUBYAK; EL MOATASSIM, 1993). A liberação de grande quantidade de ATP intracelular durante o processo inflamatório aumenta a sinalização purinérgica através da ativação do receptor P2X7 desencadeando eventos pró-inflamatórios (LISTER et al., 2007).

Uma variedade de enzimas conhecidas como ectonucleotidases são diretamente responsáveis por todo o processo de controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos da adenina e da adenosina pelo fato de hidrolisarem nucleotídeos trifosfatados até seus respectivos nucleosídeos (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; YEGUTKIN, 2008).

Ainda, são responsáveis por ações de extrema importância no sistema imunológico, sendo classificadas como ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), ecto-nucleotídeo pirofosfatase fosfodiesterase (E-NPP), fosfatase alcalina e ecto-5'-nucleotidase (Figura 6) (ANDRADE, 2008).

Figura 6 – Membros da família das NTPDases



Fonte: Adaptado de ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006.

Nas últimas décadas, têm sido descobertas várias ectonucleotidases pertencentes a diversas famílias de enzimas. A família ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) (EC 3.6.1.5) são responsáveis por hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados extracelulares, produzindo assim, monofosfonucleotídeos correspondentes, tendo um papel farmacológico bem estabelecido (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

Oito diferentes genes E-NTPD codificam os membros da família E-NTPDase. Sua classificação e nomenclatura é composta inicialmente por NTPDase em seguida o número que é referente à sua ordem de descoberta e caracterização (ROBSON et al., 2006) de acordo com a preferência por um ou outro substrato, pela presença de cátions divalente, localização celular e tipo de produto formado (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

A E-NTPDase-1, primeira a ser identificada, é conhecida como um marcador de superfície celular (CD39). Inicialmente identificada em células linfoides e subsequentemente em linfócitos NK, linfócitos T ativados, monócitos, células dendríticas e plaquetas (YEGUTKIN, 2008; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; ATKINSON et al., 2006).



Dentre as principais funções de NTPDase-1 está seu envolvimento no sistema hemostático, considerando que ela controla os efeitos de nucleotídeos como ATP e ADP, reduzindo ou inibindo seus efeitos pró-trombóticos e pró-inflamatórios, reduzindo assim, o risco de formação de coágulos e a vaso-oclusão (YEGUTKIN, 2008). Ainda, possui importante papel imunossupressor e na formação de adenosina (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

A NTPDase-2 possui atividade hidrolítica com preferência por nucleosídeos trifosfatados, de forma que a maior hidrólise deste pode levar a um aumento na formação de ADP, podendo assim, induzir o aumento da ativação plaquetária (ZIMMERMANN, 2001).

A enzima E-5'-nucleotidase (E-5'-NT; EC 3.1.3.5) encontra-se distribuída em bactérias, plantas e animais. É responsável por catalisar a hidrólise da ligação fosfodiéster de vários nucleosídeos 5'-monofosfatados (ex.: AMP) a seus respectivos nucleosídeos (ex.: adenosina) (ZIMMERMANN, 1996).

Até o momento, sete membros da enzima E-5'-nucleotidase foram isolados e caracterizados em humanos, diferindo entre si através das suas propriedades moleculares e cinéticas, bem como de sua especificidade pelo substrato e localização celular (BOROWIEC et al., 2006). Destes sete membros, cinco deles estão localizados no citoplasma, um na matriz mitocondrial e um ancorado à membrana plasmática externa, sendo este caracterizado uma ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) (HUNSUCKER et al., 2005).

A enzima E-5'-NT demonstrou possuir maior afinidade pelo nucleotídeo AMP, com valores de  $K_m$  da faixa de micromolaridade, de forma que é caracterizada como a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN, 2001).

Também possui importante função de reciclagem de nucleotídeos extracelulares ao realizar sua conversão e então internalizá-los através de transportadores de nucleotídeos específicos. Ainda, como outras enzimas localizadas na superfície celular, a E-5'-NT, também conhecida como CD73, tem sido relacionada com funções não-enzimáticas como a ativação de células T, adesão célula-célula (RESTA et al., 1998; ZIMMERMANN, 2001; STRATER, 2006) e sinalizações transmembranas (KAWASHIMA et al., 2000).

A enzima adenosina desaminase (ADA; E.C. 3.5.4.4) é uma metaloenzima que faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação dos

nucleotídeos e nucleosídeos da adenina (YEGUTKIN, 2008). Ainda, é responsável por catalisar a desaminação da adenosina e da desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina, respectivamente (BOTA et al., 2001).

Pode ser encontrada principalmente no citoplasma e na superfície das células, encontrando-se também distribuída em todo o organismo, sendo que nos humanos existe na forma de duas isoenzimas classificadas como ADA1 e ADA2, cada uma com suas particulares propriedades bioquímicas (SHAROYAN et al., 2006).

Diferenças estruturais, cinéticas e de localização existem entre ADA1 e ADA2. A primeira possui localização intracelular, podendo estar combinada a uma glicoproteína dimérica de aproximadamente 200 kDa, designada proteína recombinante (CP), formando assim o complexo ADA-CP, que constitui uma ecto-ADA, situada na superfície celular (TSUBOI, et al., 1995). Já a ADA2 é encontrada predominantemente no soro de indivíduos normais, possui massa molecular de aproximadamente 100 kDa e representa a menor parte da atividade da ADA total em tecidos (UNGERER, et al., 1992; GAKIS, 1996).

A regulação da concentração extracelular de adenosina foi uma das primeiras funções fisiológicas atribuídas a E-ADA, logo após sua descoberta na membrana celular (FRANCO et al., 1997). A adenosina pode ser liberada de células, dependendo da sua concentração intracelular ou ser proveniente da degradação do ATP extracelular devido à ação de ectonucleotidasas. O controle da sinalização adenosinérgica também pode ser exercido através da via de recuperação da adenosina através de transportadores de nucleosídeos, seguida por fosforilação à AMP pela adenosina quinase ou desaminação à inosina pela ADA citosólica (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004).

Ainda, a adenosina é considerada uma biomolécula capaz de sinalizar processos endógenos a fim de regular diversos processos tanto fisiológicos como patológicos (FREDHOLM et al., 2001). Este nucleosídeo é produzido em resposta a situações de estresse metabólico ou dano celular e altas concentrações de adenosina extracelular ocorrem em situações de isquemia, hipóxia, inflamação e trauma (HASKÓ; CROSTEIN, 2004).

Diversas citocinas têm sido implicadas na patogênese da hepatite C crônica. Na maioria dos tecidos, como no fígado, a produção de citocinas é ausente ou baixa, mas frente a alguma lesão, como infecção pelo HCV é estimulada. Várias citocinas

mediadoras da inflamação hepática têm sido relacionadas à morte do hepatócito e processos fibróticos e, paradoxalmente, são mediadoras da regeneração após o dano hepático. Na hepatite C crônica, o desequilíbrio entre a produção de citocinas Th1 e Th2 está relacionado com a progressão da doença. As citocinas envolvidas nas doenças hepáticas podem ser classificadas como pró-inflamatórias, como IL-1 (a e b), IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , já que estimulam a síntese de IFN- $\alpha$ , além de ter ação imunoregulatória de Th1; citocinas anti-inflamatórias como IL-10; citocinas envolvidas na resposta imune Th1 como IL-2, IFN- $\alpha$ ; citocinas envolvidas na resposta Th2 como IL-4 e IL-5; além de citocinas fibrogênicas como TGF- $\beta$  e anti-fibrogênicas como o IFN- $\alpha$  (TILG et al., 2006).

A IL-2 está diretamente envolvida na expansão celular, sendo a principal citocina responsável pela maturação e proliferação dos LTCD8<sup>+</sup>, estimulando a secreção de IFN- $\gamma$  e de outras moléculas que vão mediar a resposta imune (NAPOLI et al., 1996).

A IL-4 é caracterizada como um fator de crescimento e diferenciação de células T (Th2), inibe a ativação de macrófagos e bloqueia os efeitos do IFN- $\gamma$  e IL-1 (JANEWAY et al., 2007). Também estimula a produção de anticorpos neutralizantes e induz a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (CACCIARELLI et al., 1996).

A IL-6 está associada à necrose, inflamação de hepatócitos e produção de matriz extracelular com proliferação celular (ABRIGNANI, 1997). É produzida por fagócitos mononucleares, células endoteliais e outras em resposta a IL-1 e ao TNF (WINNOCK et al., 1993), sendo que em portadores de HCV crônica foi encontrada tanto no sangue como no fígado (OYANAGI et al., 1999).

A IL-10 é produzida por diversas populações celulares, como LT, células dendríticas, LB e monócitos (TILG et al., 2006; JANEWAY et al., 2007). Ela participa da resposta inflamatória inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (CURFS et al., 1997). Há evidências do aumento desta citocina na hepatite C crônica (CACCIARELLI et al., 1996), sendo que alguns trabalhos relatam a redução da atividade inflamatória (NELSON et al., 2003).

O interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) secretado por células Th1 e é um potente ativador de macrófagos (fator pró-inflamatório). É uma importante citocina pró-inflamatória com

efeitos pleiotrópicos na replicação viral e regulação das células T, B, NK e macrófagos (NAPOLI et al., 1996).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados (DING E YIN, 2004). Exerce proteção contra vírus, aumenta a expressão de MHC classe I, potencializa a lise mediada por LT de células infectadas por vírus, além de estimular células como fagócitos a produzir interleucinas (JANEWAY et al., 2007). O TNF- $\alpha$  Está associado à necrose, inflamação e produção de matriz extra-celular com proliferação celular (TSUKAMOTO, 1999).

Em resumo, pode-se observar o o envolvimento direto do sistema purinérgico com a manutenção da homeostasia normal e também sua ligação com os processos de fibrinogênese e de resposta inflamatória. Desta forma, sabendo-se que a hepatite C é caracterizada pelo desencadeamento de resposta inflamatória e em sua forma crônica o desenvolvimento de processo fibrótico, é interesse científico se avaliar o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em pacientes acometidos com esta patologia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos e plaquetas de pacientes com hepatite C.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em pacientes com hepatite C e grupo controle avaliou-se:

- a atividade da enzima E-NTPDase em linfócitos e plaquetas;
- a atividade da enzima E-ADA em linfócitos e plaquetas;
- a atividade da enzima E-5'-nucleotidase em plaquetas;
- o efeito *in vitro* dos fármacos interferon alfa-2a e alfa 2b, ribavirina e telaprevir sobre a atividade das enzimas E-NTPDase e E-5'-nucleotidase em linfócitos e plaquetas;
- os níveis séricos de citocinas referentes às respostas Th1 e Th2.

### 3 MANUSCRITO

#### **E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-ADA Activities in lymphocytes and platelets and Levels of Serum Cytokine from Hepatitis C Patients**

Maria E. Basso<sup>a</sup>; Livia G. Castilhos<sup>a</sup>; Stephen A. Adefegha<sup>a,b</sup>; Mariana B. Stoever<sup>a</sup>; Assis Ecker<sup>a</sup>; Cláudia B. dos Santos<sup>a</sup>; Eduardo O. Chielle<sup>a</sup>; Daniela B. Leal<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>b</sup>Post-Graduate Program in Biochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Technology, P. M. B 704, Akure, Nigeria

maria-emilha@hotmail.com

liviagelain@gmail.com

fegha2000@yahoo.com

mari\_stoever@hotmail.com

assisecker@hotmail.com

c\_bertoncheli@yahoo.com.br

eduardochielle@yahoo.com.br

daniela.leal@ufsm.br

#### **Corresponding author:**

Prof. Dr. Daniela Bitencourt Rosa Leal (daniela.leal@ufsm.br) e Maria Emilha Basso (maria-emilha@hotmail.com)

Departamento de Microbiologia e Parasitologia/CCS/UFSM - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prédio 20 – Sala 4102

Phone: + 55 55 3220 9581

**Abstract**

Hepatitis C is an infectious disease caused by Hepatitis C virus (HCV) and characterized by development of inflammation as well as fibrosis. On the other hand, the extracellular nucleotides and adenine nucleosides are important signaling molecules that can modulate inflammatory responses in platelets and lymphocytes. This study sought to determine the activities of ectoenzymes [ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) and ecto-adenosine deaminase (E-ADA)] that metabolize nucleotides in platelets and lymphocytes and to evaluate cytokine levels of patients with HCV. Twenty five HCV patients and fifty healthy subjects (control group) were selected for this study. In lymphocytes, was observed a lower ATP hydrolysis ( $P<0.001$ ), and higher ADP hydrolysis ( $P<0.001$ ) and E- ADA activity ( $P<0.001$ ) in HCV patients when compared to the control group. In addition, the results revealed a higher ATP and ADP hydrolysis by E-NTPDase and higher E-ADA activity in platelets of HCV patients when compared with the control group. Also, IL-4 and IL-10 were significantly ( $P<0.05$ ) increased while IL-6 was decreased ( $P<0.05$ ) in HCV patients. In conclusion, the results showed that the activities of E-NTPDase and E-ADA were altered in both lymphocytes and platelets of HCV patients. These alterations in enzymes activities may be possible regulatory mechanisms in an attempt to manage liver damage and ongoing inflammatory process. Furthermore, decreased IL-6 as well as increased IL-4 and IL-10 in HCV patients may suggest an antiinflammatory process and possible compensatory mechanisms in minimizing liver injury.

**Keywords:** Hepatitis C, lymphocytes, platelets, ectoenzymes, cytokines, purinergic signaling.

## 1. Introduction

Hepatitis C is one of the causes of chronic hepatic disease with 170 million people estimated to be infected worldwide [1]. This infection is caused by the hepatitis C virus (HCV), a RNA virus from the *Flaviviridae* family found in human pathogen [2]. Some risk factors such as injection, organ transplantation, hemodialysis, vertical transmission, sexual and occupational exposure are directly linked to HCV. Since there is no available vaccine and effective post-exposure prophylaxis, the prevention of HCV infection is concentrated on recognition and control of risk factors [3]. This condition is characterized by an infectious process which starts with the entry of the virus into the hepatocytes and triggers the host innate and adaptive responses [4]. Once the virus has penetrated, around 85% of infected individuals develop chronic hepatic diseases, cirrhosis, and hepatic carcinoma [5]. The initial stage is characterized by the development of fibrosis and inflammation [6].

The immune system plays an important role in the regulation of inflammation. This involves the activation of inflammatory cells such as leukocytes, tissue macrophages, dendritic cells and eosinophils [6]. Cellular immunity mediated by T lymphocytes (LT) may play crucial role in liver injury and of fundamental importance in viral diseases [7]. Gruner et al. (2000) [8] reported that the LT cytotoxic reactivity may be essential for HCV shedding. After activation, the LT may lead into clonal proliferation by secreting cytokines and other substances that are capable of affecting variable hepatic function [9]. The imbalance between the production of Th1 and Th2 cytokines may be associated with the progression of chronic hepatitis C [10]. Some cytokines stimulate the synthesis of collagen by fibroblasts, formation of fibrosis, distortion of liver architecture and cirrhosis in chronic hepatitis C [9].

The purinergic system represents an important signaling pathway in several tissues and comprises of three components: extracellular nucleotides and nucleosides, purinergic receptors and ectoenzymes. It is directly involved in the immune response, inflammation, pain, platelet aggregation, cell proliferation and death [11]. Extracellular nucleotides interact with their respective receptors and elicit several tissue functions. Seven of these receptors are ionotropic (P2X) which respond to ATP, and at least eight are metabotropic (P2Y) responsive to ATP and ADP. Ectoenzymes are also part of the purinergic system, act by



hydrolysing extracellular nucleotides and their respective nucleosides such as ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase; EC 3.6.1.5), ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase (E-NPPs; EC 3.1.4.1), E-5'-nucleotidase (5'-NT; EC 3.1.3.5) and ecto-adenosine deaminase (E-ADA; E.C. 3.5.4.4). E-NTPDases are responsible for the hydrolysis of ATP and ADP into AMP. AMP is subsequently hydrolyzed by E-5'-nucleotidase into adenosine. Adenosine undergoes deamination into inosine by E-ADA activity [12]. It is well known that extracellular ATP, for example, when in micromolar concentrations, can induce the formation of pores in the cell membranes, resulting in osmotic changes [13]. Under physiological conditions, the nucleotides are present in the extracellular environment in low concentrations, usually in nanomolar, but may occur in micromolar levels [14]. It can also induce two antagonistic effects: cell proliferation, when in low concentrations, and cell death, when in high concentrations [14]. These enzymes play an important role in maintaining proper vascular hemostasis and thrombogenesis [15]. The enzymes of this family are widely distributed in animal tissues and represent the main ectoenzyme expressed by endothelial cells and muscle cells of the circulatory system [16;17].

Cytokines may be secreted upon HCV-mediated activation of immune cells and exhibit essential adaptable functions in the immune response during the course of infection and liver damage. In HCV infection, we speculate that there may be correlation between the purinergic system, cytokine secretion and maintenance of normal homeostasis in HCV infected patients. Despite the importance of E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-ADA in modulating inflammatory and immune responses, to the best of our knowledge, there is dearth of information on these enzymes in platelets and lymphocytes of HCV infected patients. Considering the alterations in platelet and lymphocyte functions observed in HCV infection, this study aimed to evaluate E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-ADA activities in platelets and lymphocytes as well as the serum pro inflammatory and inflammatory cytokine levels of HCV infected patients.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Chemicals**

The substrates ATP, ADP, AMP, adenosine, as well as Trizma base, Coomassie Brilliant Blue G, bovine serum albumin and HEPES were obtained from Sigma Chemical Co and  $K_2HPO_4$ , from Reagen. All the other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

## **2.2 Patients and samples**

The sample consisted of 25 patients with hepatitis C and 50 healthy subjects as a control group. The diagnosis of hepatitis C was based on International Statistical Classification of Diseases (ICD 10) (B 17.1/18.2) [18]. The subjects gave written consent to participate in this study and the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 832.436. In this study, subjects with altered blood pressure, alcoholism, cigarette smoking or diagnosed of diabetes mellitus, autoimmune diseases and immunodeficiencies were excluded from this study. Patients who received blood transfusion at least two months earlier were also excluded. Ten milliliters of blood was obtained from each patient or control and used for the preparation of lymphocytes and platelets. Biochemical determinations of enzymes activities and cytokines secretion were subsequently performed.

## **2.3 Isolation of lymphocytes from human blood**

Lymphocytes-rich mononuclear cells were isolated from peripheral human blood collected with 7.2 mg dipotassium EDTA as anticoagulant and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum (1968) [19]. The percentage of lymphocytes was superior to 93% as previously outlined [20]. Right after lymphocytes separation, cell viability was determined by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH) present in the sample, using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer). The procedure was repeated before and after the incubation period and samples with more than 10% of disrupted cells were excluded.

## **2.4 Isolation of platelets from human blood**

PRP was prepared by the method of Pilla et al. (1996) [21] with slight modification by Lunkes et al. (2003) [22]. Briefly, peripheral blood was collected in 129 mM sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 1600g for 15 min. Afterwards, the PRP was centrifuged at 1400g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were suspended in 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0.

## **2.5 Protein content determination**

Protein content was measured by the Comassie Blue method according to the method described by Bradford (1976) [23] using serum albumin as standard.

## **2.6 E-NTPDase activity in lymphocytes**

The E-NTPDase activity in lymphocytes was determined according to the method described by Leal et al (2005) [24], in which the reaction medium contained 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0, with a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction medium (2-4  $\mu\text{g}$  of protein), and pre-incubated for 10 min at 37°C. The mixture was further incubated for 70 min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mM and stopped with 200  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by a method previously described by Chan et al (1986) [25] using malachite green as colorimetric reagent and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. The analyses on all samples and standard were performed in triplicate and the specific activity reported as nmol of Pi released/min/mg of protein.

## **2.7 E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities in platelets**

The E-NTPDase enzymatic assay in platelets was carried out in a reaction medium containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200  $\mu\text{L}$  as described by Pilla et al. (1996)

[21]. For AMP hydrolysis, the E-5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, except that the 5 mM CaCl<sub>2</sub> was replaced by 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Twenty microliters of the isolated platelets (8 -12 µg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubated for 10 min at 37°C. The reaction was started by the addition of ATP or ADP for N-TPDase activity at a final concentration of 1 mM, and AMP for E-5'-nucleotidase activity at a final concentration of 2 mM. The mixture was further incubated for 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 µL of 10% TCA and the tubes were subsequently placed on ice for 10 min. The Pi released was measured using malachite green as the colorimetric reagent and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as standard. Controls were carried out to correct for nonenzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after 10% TCA addition. The analyses on all samples and standard were performed in triplicate. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

## **2.8 E-ADA activity in lymphocytes and platelets**

E-ADA activity in lymphocytes and platelets was measured by the method of Giusti and Galanti (1984) [26]. This is based on the direct measurement of the formation of ammonia produced, when E-ADA acts in excess of adenosine. Briefly, 25 µL of lymphocytes and 50 µL of platelets separately was added to 21 mM of the substrate (adenosine), pH 6.5, and incubation was carried out for 1 h at 37° C. The reaction was stopped by adding 106 mM and 167.8 mM sodium nitroprusside and hypochlorite solution. Seventy five micromolar of Ammonium sulfate was used as ammonium standard. All the experiments were performed in triplicate, ADA activity was calculated and expressed in U/mg protein. One unit (1U) of E-ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

## **2.9 *In vitro* effects of drugs used in the treatment of patients with Hepatitis C on E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities**

The *in vitro* effects of peginterferon alfa-2a, peginterferon alfa-2b, ribavirin and telaprevir on E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities were evaluated. Isolated lymphocytes and platelets from health subjects were incubated with the drugs in the

medium reaction as previously described. The concentrations of these drugs used *in vitro* were based on the mean plasma values of the medications (peginterferon alfa 2a (0.00077  $\mu\text{M}$ ), peginterferon alfa-2b (0.00077  $\mu\text{M}$ ), ribavirin (28  $\mu\text{M}$ ) and telaprevir (5  $\mu\text{M}$ ).

## **2.10 Separation of blood serum**

The blood samples were collected in tubes without anticoagulant, clots were formed and the clotted samples were centrifuged at 1400 g for 15 min at room temperature. The resultant serum samples were aliquotted in microtubes and used for the quantification of cytokines.

## **2.11 Cytokines measurement**

Serum cytokines were simultaneously measured by flow cytometry by means of CBA. The human Th1/Th2/Th17 kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was used in accordance to the manufacturer's instructions. Quantitative results were generated using Accuri Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and FCAP Array software.

## **2.12 Statistical analysis**

Values were expressed as mean  $\pm$  standard errors of mean (SEM). The data obtained were statistically analyzed using the Student's *t* test for independent samples and one-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test. Differences were considered significant when probability was  $P < 0.05$ .

# **3. Results**

## **3.1 General characteristics of the patients**

Fifty healthy individuals consisting of 25 males with mean age of 29 (range: 19–37 years old) and 25 females with mean age of 25 (range: 18–35 years old), as the control and the HCV patients comprised of 15 males with mean age of 45 (range:

40-54 years old) and 10 females with mean age of 31 (range: 24-35 years old). Nine of the HCV patients are currently on medication as prescribed by the consultant physician (peginterferon alfa-2a, peginterferon alfa-2b, ribavirin and telaprevir) while 15 HCV patients are not under medication at the period of sample collection. The HCV patients had the following genotypes G1 (12%), G2 (34%) e G3 (40%).

### **3.2 E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes of HCV patients**

The results obtained for ATP and ADP hydrolysis are shown in Figure 1. It was observed that ATP hydrolysis by E-NTPDase was significantly reduced ( $P<0.001$ ) in HCV patients when compared to the controls. However, ADP hydrolysis by E-NTPDase was significantly increased ( $P<0.001$ ) in HCV patients when compared to the control group. In a similar manner, E-ADA activity was significantly elevated ( $P<0.001$ ) in HCV patients when compared to the control group (Figure 3A).

### **3.3 E-NTPDase, E-5'- Nucleotidase and E-ADA activities in platelets of HCV patients**

The activities of E-NTPDases in platelets using ATP and ADP as substrate and E-ADA activity were significantly higher ( $P<0.05$ ) in HCV patients when compared to the control group (Figures 2 and 3). However, there was no significant ( $P>0.05$ ) difference in AMP hydrolysis of HCV patients when compared to the control group, as shown in Figure 2.

### **3.4 *In vitro* effects of drugs used in the treatment of HCV patients on E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities**

The *in vitro* effects of some antiretroviral drugs (Ribavirin, Telaprevir, Peginterferon alpha-2a and Peginterferon alpha-2b) on E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities in lymphocytes and platelets were evaluated as shown in Table 1 and Table 2. The results revealed that the enzymes activities were not altered when the isolated platelets and lymphocytes from health subjects were incubated with Ribavirin, Telaprevir, Peginterferon alpha-2a and Peginterferon alpha-2b in the reaction medium as previously described ( $P>0.05$ ,  $n=15$ ).

### 3.5 Evaluation of cytokines levels

Serum concentrations of cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) are shown in Figure 4. The results revealed that there was significant ( $P < 0.05$ ) increase in IL-4 and IL-10 while IL-6 was observed to be significantly decreased ( $P > 0.05$ ) in HCV patients when compared to the control group. However, there were no significant differences ( $P > 0.05$ ) in the levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  and IL-2 of HCV patients when compared to the control group.

## 4. Discussion

Unlike other viruses that cause hepatitis, hepatitis C virus does not produce a sufficient immune response in the body. However, it has the ability to evade the immune system of highly efficient host, enabling it to stay in the infected tissue [4]. Therefore, the virus can cause acute infection, which may be less symptomatic in that most of the people infected may become carriers of chronic hepatitis and display long-term consequences [27]. In this study, there was a higher prevalence of HCV infection in males than in females. This agrees with reports from earlier studies where the prevalence of HCV was higher in males than in females [28;29;30].

One of the major causes of liver damage may involve HCV infection [31]. Hepatocyte apoptosis may be triggered as a response of the host defense against viral infection and this may represent the molecular mechanisms of liver apoptosis [31]. This may be responsible for promoting the release of cellular contents such as ATP and ADP to the extracellular space thereby modulating the immune response through the purinergic nucleotide mediated signaling receptors [32]. Therefore, purinergic signaling pathways may be involved in the modulation of viral entry and penetration of HCV infection [33]. Also, cascade of purinergic signaling enzymes may be involved in the regulatory mechanism against inflammation in cells [34]. In this study, we observed a lower E-NTPDase activity with ATP as substrate in lymphocytes of HCV patients. However, it is possible that ATP is hydrolysed by other enzymes including E-NPP, alkaline phosphatase and soluble ATPase [35;36;37].

In addition, increased activities of E-NTPDase (ADP hydrolysis) and E-ADA in lymphocytes of treated and non-treated hepatitis C patients may be attributed to the increased extracellular ADP hydrolysis in order to achieve homeostasis, thereby

removing the excessive nucleotides from the external environment [38]. In a similar manner, the observed elevation in the activity of E-ADA in lymphocytes of patients with HCV may be linked to the resultant inflammatory processes in HCV patients that require a high activity of E-ADA in order to produce an anti-inflammatory effect [39]. This effect may reduce the extracellular levels of adenosine and convert it to inosine, a purine that is directly associated with immunoregulatory effects by possible modulation of inflammatory processes and regulation of cytokines levels [40].

Thrombocytopenia is one of the hallmarks of chronic liver disease. It may occur as a result of platelet accumulation in liver tissue and contribute to the progression of hepatic fibrosis via the activation of hepatic stellate cells [41]. This culminated into the investigation of the possible alteration of the purinergic signaling enzymes in platelets of HCV patients. The observed a higher E-NTPDases activity (ATP and ADP as substrate) in platelets of HCV patients may suggest the association of liver damage in these patients, affecting the tissue and persistent inflammatory mediators, prior to fibrogenesis. These results are in agreement with previous studies in our research group, where E-NTPDase activity was reported to be elevated in inflammatory conditions [42; 43].

The AMP formed from the hydrolysis of ADP can be metabolized by E-5'-nucleotidase. In this study, the non-significant difference observed in platelets of HCV patients when compared to the control may suggest to a compensatory mechanism arising from the increase in adenylate kinase 1 (AK1), that catalyzes the conversion of AMP to ADP [44]. Furthermore, result from this study revealed that there was a higher E-ADA activity in platelets of HCV patients when compared to healthy individuals. This is in agreement with the results obtained for E-ADA activity in lymphocytes of HCV patients. These results suggest that a higher E-ADA activity can elevate the levels of extracellular inosine, which has anti-platelet properties and can reduce the accumulation of platelets in the liver tissue [45]. We also conducted an *in vitro* assay with some standard drugs used for the treatment of hepatitis C, in order to validate the results obtained for the enzymes activities in HCV patients. The results showed that the ribavirin drugs, telaprevir, interferon 2a and 2b do not interfere in the activity of E-NTPDase and E-5'-nucleotidase in lymphocytes and platelets. Therefore, we suggest that the observed E-NTPDase and E-ADA activities are solely the enzyme activities on the surface of lymphocytes and platelets in HCV patients and healthy individuals used as control in this study.



Cytokines can be characterized as heterogeneous soluble proteins, capable of modulating and regulating the pattern of the host immune response due to their ability to act on different cell types and produce distinct biological effects [46]. They can be classified into groups based on the type of biological effects they trigger, as pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Hepatitis C is characterized by persistent inflammatory process, and cytokines are directly involved in the modulation of this process. In this study, our results revealed that there was no significant difference in the serum levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2 between the HCV patients and control group. However, serum IL-4 and IL-10 were increased while serum IL-6 was decreased in HCV patients when compared to the healthy individuals [47]. This may suggest an important cellular indication for possible alteration in the Th1/Th2 response in HCV patients. The result obtained from our study also agrees with that of Sofian and colleagues (2012) [48] who reported that regulatory cytokines (IL-4 and IL-10) are increased in serum of HCV patients. IL-10 may protect against the progression of hepatic fibrosis in HCV patients [49]. Therefore, we suggest that the observed increase may be regulatory and compensatory mechanisms involved in minimizing liver injury. On the other hand, the decreased IL-6 level observed in this study may suggest an anti-inflammatory process response in HCV patients [50].

In conclusion, the results showed that the activities of E-NTPDase and E-ADA are altered in both lymphocytes and platelets of HCV patients. These alterations in enzymes activities may be attributed to regulatory mechanisms in response to the presence of liver damage and ongoing inflammatory process. Furthermore, decreased IL-6 as well as increased IL-4 and IL-10 in HCV patients may suggest that decreased proinflammatory process and possible compensatory mechanisms in minimizing liver injury. Further studies are ongoing to investigate the purines levels as well as the enzyme expression in HCV patients.

### **Conflict of interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

We sincerely thank the hepatitis C patients who accepted to participate in the study and the Gastroenterology Department of the University Hospital, Santa Maria, Brazil, for obliging us to use their facilities. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

## References

- [1] Y.Z. Zhu, X.J. Qian, P. Zhao, Z.T. Qi, How hepatitis C virus invades hepatocytes: The Mystery of viral entry, *World J Gastroenterol*, 20 (2014), pp. 3457-3467.
- [2] E. Strauss, Hepatite C, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 34 (2001), pp. 69-82.
- [3] T. Martins, J.L. Narciso-Schiavon, L.L. Schiavon. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C, *Revista da Associação Médica Brasileira*, 57 (2011), pp. 107-112.
- [4] J.R. Larrubia, E. Moreno-Cubero, M.U. Lokhande, et al. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection, *World J Gastroenterol*, 20 (2014), pp. 3418-3430.
- [5] A. PELLICORO, P. Ramachandran, J.P. Iredale, J.A. Fallowfield. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ, *Nat Rev Immunol*, 14 (2014), pp. 181-194.
- [6] C. YANG, M. Zeisberg, B. Mosterman, et al. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors, *Gastroenterology*, 124 (2003), pp. 147-159.
- [7] E. B. G. MARTINS. O fígado e o sistema imunológico. In: GAYOTTO L. C. C.; ALVES V. A. F. Doenças do fígado e vias biliares. São Paulo: Atheneu, 2001. pp. 93-101.
- [8] N.H. Gruner, T.J. Gerlach, M.C. Jung, et al. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C, *J Infect Dis*, v. 181 (2000), pp. 1528-1536.
- [9] J.F. Kerr, W.G. Cooksley, J. Searle, et al. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis, *Lancet*, 2 (1979), pp. 827-828.
- [10] H. Tilg, A. Kaser, A.R. Moschen. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases, *Liver Int*, 26 (2006), pp. 1029-1039.
- [11] G. Burnstock, G.E. Knight. Cellular distribution and functions of P2 receptors subtypes in different systems, *Int Rev Cytol*, 240 (2004), pp. 31-304.
- [12] S.C. Robson, J. Sévigny, H. Zimmermann. The NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationship and pathophysiological significance, *Purinergic Signal*, 2 (2006), pp. 409-430.
- [13] A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, et al. The cytolytic P<sub>2Z</sub> receptor for extracellular ATP identified as a P<sub>2X</sub> receptor (P2X<sub>7</sub>), *Science*, 5262 (1996), pp. 735-738.

- [14] F. Di Virgilio, P. Chiozzi, D. Ferrari, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells, *Blood*, 3 (2001), pp. 587–600.
- [15] B. Atkinson, K. Dwyer, K. Enyoji, S.C. Robson. Ectonucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets, *Blood Cells Mol Dis*, 2 (2006), pp. 217–222.
- [16] R. B. Gayle III, C. R. Maliszewski, S. D. Gimpel, et al. Inhibition of platelet function by recombinant soluble Ecto-ADPase/CD39, *J Clin Invest*, 9 (1998), pp. 1851–1859.
- [17] M. R. C. Schetinger, V.L. Vieira, V.M. Morsch, D. Balz. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 4 (2001), pp. 731–741.
- [18] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Hepatite viral C e coinfeções – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- [19] A. Böyum. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g, *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97 (1968), pp. 77-89.
- [20] J. A. S. Jaques, J.F.P. Rezer, J.B. Ruchel. et al. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity, *Analytical Biochemistry*, 410 (2011), pp. 34-39.
- [21] C. Pilla, T. Emanuelli, S.S. Frassetto, et al. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets, *Platelets*, 4 (1996), pp. 225–230.
- [22] G.I. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb Res*, 4 (2003), pp. 189–194.
- [23] M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1976), pp. 248-54.
- [24] D.B. Leal, C.A. Streher, T.N. Neu, et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in humans lymphocytes, *Biochim Biophys Acta*, 1721 (2005), pp. 9-15.
- [25] K.M. Chan, D. Delfert, K.D. Junger. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity, *Analytical Biochemistry*, 157 (1986), pp. 375-380.
- [26] G. Giusti, B. Galanti. Colorimetric Method, In: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 315-23.

- [27] B. Carneiro, A.C. Braga, M.N. Batista, et al. Evaluation of canonical siRNA and Dicer substrate RNA for inhibition of hepatitis C virus genome replication--a comparative study, *Plos One*, 2 (2015).
- [28] J.A. Josahkian, G.M. Lima, J.M.J. Eustáquio, et al. Prevalência de inaptidão sorológica pelo vírus HCV em doadores de sangue no hemocentro regional de uberaba (MG), Fundação Hemominas, *Rev Patol Trop*, 4 (2010), pp. 261-271.
- [29] A.S.R. Araújo, C.M. Almeida, L. Fraporti, et al. Caracterização do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite crônica: genótipos no Estado do Amazonas, *Rev Soc Bras Med Trop*, 5 (2011), pp. 638-640.
- [30] J.F. Leão, F.H.L. Pace, J.M.F. Chebli. Infecção pelo vírus da hepatite c em pacientes em hemodiálise: prevalência e fatores de risco, *Arq Gastroenterol*, 47 (2010), pp. 28-34.
- [31] K. Wang. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis, *Cell Death and Disease*, 5 (2014), pp. 1-10.
- [32] M.J. Bours, E.L. Swennen, F. Di Virgilio, et al. Adenosine 59-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation, *Pharmacol Ther*, 2 (2006), pp. 358–404.
- [33] A. Paoletti, S.Q. Raza, L. Voisin, et al. Multifaceted roles of purinergic receptors in viral infection, *Microbe and Infection*, 14 (2012), pp. 1278-1283.
- [34] M. Che, Z. Gatmaitan, I.M. Arias. Ectonucleotidases, purine nucleoside transporter, and function of the bile canalicular plasma membrane of the hepatocyte, *FASEB J*, 2 (1997), pp. 101-108.
- [35] C. Stefan, S. Jansen, M. Bollen. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterase, *Purinergic Signal*, 2 (2006), pp. 361-370.
- [36] D.W. Moss, A.K. Walli. Intermediates in the hydrolysis of ATP by human alkaline phosphatase, *Biochim Biophys Acta*, 2 (1969), 476-477.
- [37] G. Yegutkin, P. Bodin, G. Burnstock. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells, *Br J Pharmacol*, 5 (2000), pp. 921-926.
- [38] F. Di Virgilio. The P2Z purinoreceptor: intriguing role in immunity, inflammation and cell death, *Immunol Today*, 11 (1995), pp. 524-528.
- [39] S. Colgan, H.K. Eltzschig. Adenosine and hypoxia-inducible factor signaling in intestinal injury and recovery, *Annu Rev Physiol*, 74 (2012), pp. 153–175.
- [40] L.G. Castilhos, P.H. Doleski, T.M. Bertoldo, et al. Sick cell anemia induces changes in peripheral lymphocytes E-NTPDase/E-ADA activities and cytokines secretion in patients under treatment, *Biomed Pharmacother*, 73 (2015), pp. 102-108.

- [41] R. Kondo, H. Yano, O. Nakashima, et al. Accumulation of platelets in the liver may be an important contributory factor to thrombocytopenia and liver fibrosis in chronic hepatitis C, *J Gastroenterol*, 4 (2013), pp. 526-534.
- [42] L.G. Castilhos, P.H. Doleski, S.A. Adefegha, et al. Altered E-NTPDase/E-ADA activities and CD39 expression in platelets of sickle cell anemia patients, *Biomed Pharmacother*, 79 (2016), pp. 241-246.
- [43] L.V. Becker, C.S. Rosa, V. C Souza, et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis, *Clin Biochem*, 43 (2010), pp. 1096-1100.
- [44] B. Jana, B.V. Adkar, R. Biswas, B. Bagchi. Dynamic coupling between the LID and NMP domain motions in the catalytic conversion of ATP and AMP to ADP by adenylate kinase, *J Chem Phys*, 134 (2011).
- [45] E. Fuentes, J. Pereira, D. Mezzano, et al. Inhibition of platelet activation and thrombus formation by adenosine and inosine: studies on their relative contribution and molecular modeling, *PLoS One*, 9 (2014), pp. 1-9.
- [46] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai. *Imunologia Celular e Molecular*, 7. ed. Brasil: Elsevier, 2011.
- [47] S. Selvarajah, S. Keating, J. Heitman, et al. Detection of host immune responses in acute phase sera of spontaneous resolution versus persistent hepatitis C virus infection, *J Gen Virol*, 93 (2012), pp. 1673-1679.
- [48] M. Sofian, A. Aghakhani, A.A. Farazi, et al. Serum Profile of T Helper 1 and T Helper 2 Cytokines in Hepatitis C Virus Infected Patients, *Hepat Mon*, 12 (2012), pp. 1-4.
- [49] S. De Souza-Cruz, M.B. Victória, A M. Tarragô, et al. Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver fibrosis score: a proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned by IL-10, *BMC Microbiology*, 16 (2016), pp 1-12.
- [50] M.K. JAIN, B. Adams-Huet, D. Terekhova, et al. Acute and Chronic Immune Biomarker Changes During Interferon/Ribavirin Treatment in HIV-HCV Co-infected Patients, *J Viral Hepat*, 1 (2015), PP. 25-36.

## Figures legend

**Figura 1.** ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by E-NTPDase in lymphocytes of Hepatitis C patients and controls. Enzyme specific activities were reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*\*\*”) indicates a significant difference ( $P<0.001$ ) between the Hepatitis C patients (n=25) and controls (n=50). Student's *t* test for independent samples was used for all the analyses.

**Figura 2.** ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis by E-NTPDase and E-5'-nucleotidase in platelets of Hepatitis C patients (n=25) and controls (n=50). Enzyme specific activities were reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*\*\*”) and (“\*\*”) represents significant difference of  $P<0.001$  and  $P<0.01$ , respectively. Student's *t* test for independent samples was used for all the analyses.

**Figura 3.** Adenosine deamination in lymphocytes (A) and platelets (B) of Hepatitis C patients and controls. Enzyme activities were reported as U/mg protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*\*\*”) indicates a significant difference ( $P<0.001$ ) and (“\*\*”) indicates a significant difference ( $P<0.05$ ), with n=50 (controls) and n=25 (Hepatitis C patients) (Student's *t* test for independent samples).

**Figura 4.** Serum levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 from patients with Hepatitis C and control group. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*”) indicates a significant difference ( $P<0.05$ ), with controls (n=50) and Hepatitis C patients (n=25) (Student's *t* test for independent samples).

Table 1: *In vitro* effects of antiretrovirals on E-NTPDase activity in lymphocytes.

	<b>ATP hydrolysis (nmol Pi/min/mg protein)</b>	<b>ADP hydrolysis (nmol Pi/min/mg protein)</b>
<b>Control</b>	59.96±2.69	51.81±2.04
<b>Ribavirin</b>	56.93±6.72	51.80±4.18
<b>Telaprevir</b>	54.99±5.77	53.62±3.79
<b>Peginterferon alpha-2a</b>	64.57±5.94	52.64±5.97
<b>Peginterferon alpha-2b</b>	63.36±6.80	48.69±5.28

Enzyme specific activities are reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Groups: Control, Rivavirin, Telaprevir, Peginterferon alpha-2a, Peginterferon alpha-2b. Variables were expressed as mean±standard error of the mean (SEM).  $P>0.05$ , with n=15 (one-way ANOVA- Dunnett's Multiple Comparison Test).



Table 2: *In vitro* effects of antiretrovirals on E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities in platelets.

	<b>ATP hydrolysis (nmol Pi/min/mg protein)</b>	<b>ADP hydrolysis (nmol Pi/min/mg protein)</b>	<b>AMP hydrolysis (nmol Pi/min/mg protein)</b>
<b>Control</b>	40.49±0.97	43.17±1.99	13.83±0.38
<b>Ribavirin</b>	37.94±1.76	43.48±4.87	12.73±0.50
<b>Telaprevir</b>	40.64±2.87	42.12±2.35	14.07±2.19
<b>Peginterferon alpha-2a</b>	40.05±3.75	43.63±3.25	12.97±0.29
<b>Peginterferon alpha-2b</b>	41.88±3.38	43.44±5.42	14.32±1.08

Enzyme specific activities are reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Groups: Control, Ribavirin, Telaprevir, Peginterferon alpha-2a, Peginterferon alpha-2b. Variables were expressed as mean±standard error of the mean (SEM).  $P>0.05$ , with n=15 (one-way ANOVA- Dunnett's Multiple Comparison Test).

Figure 1

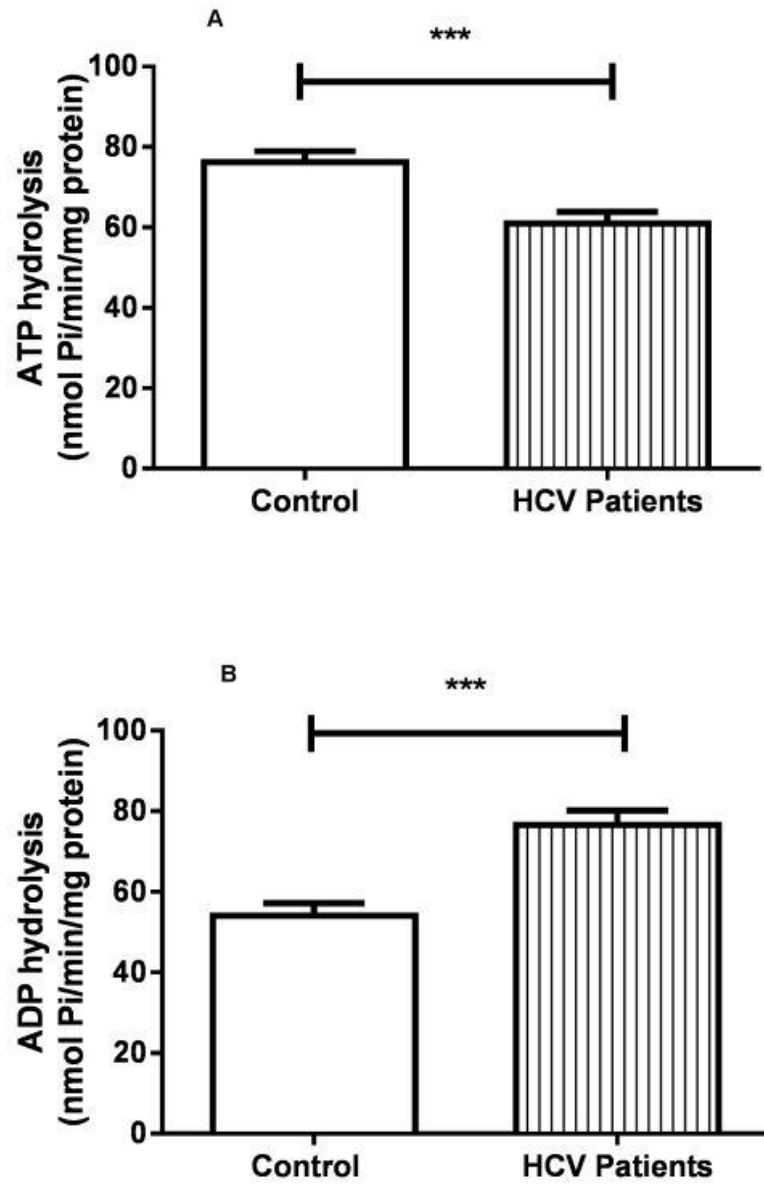


Figure 2

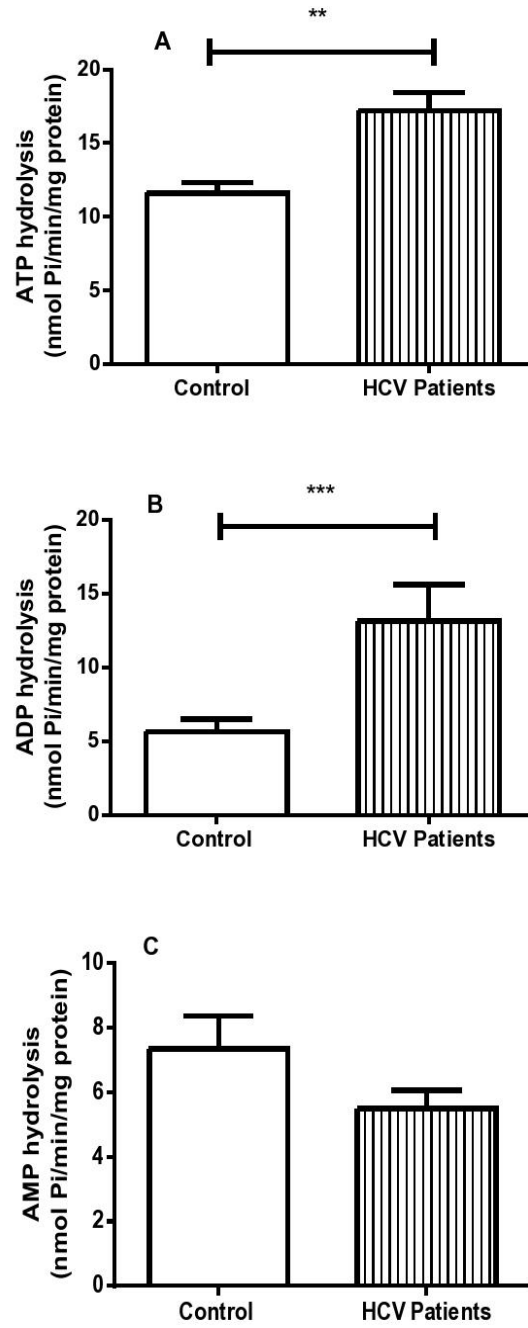


Figure 3

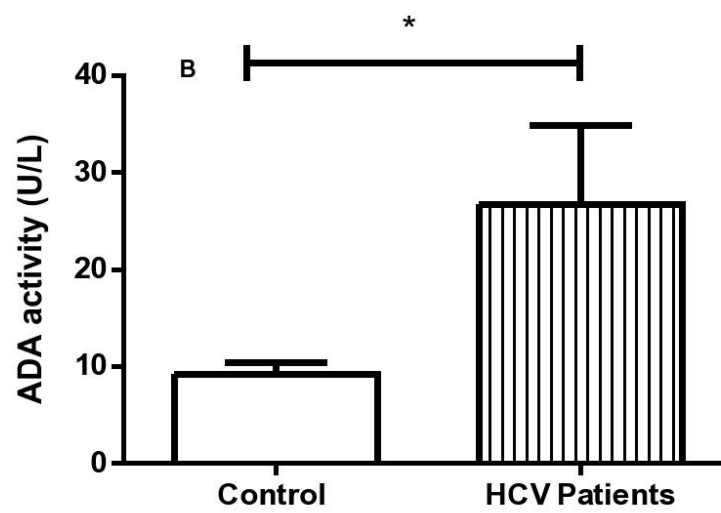
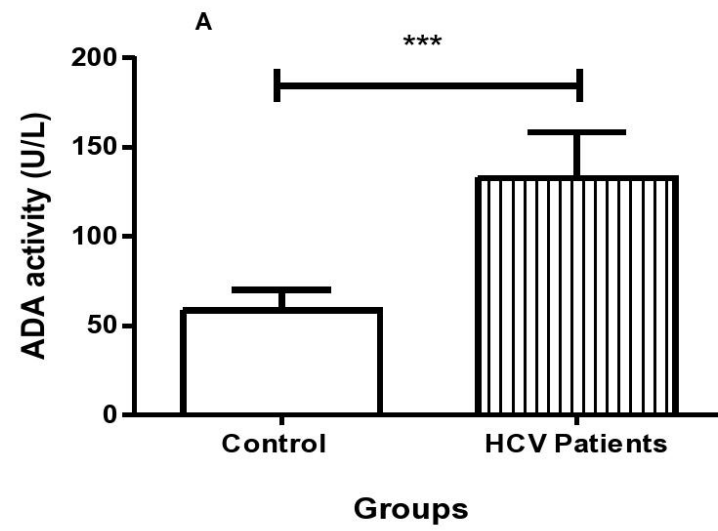
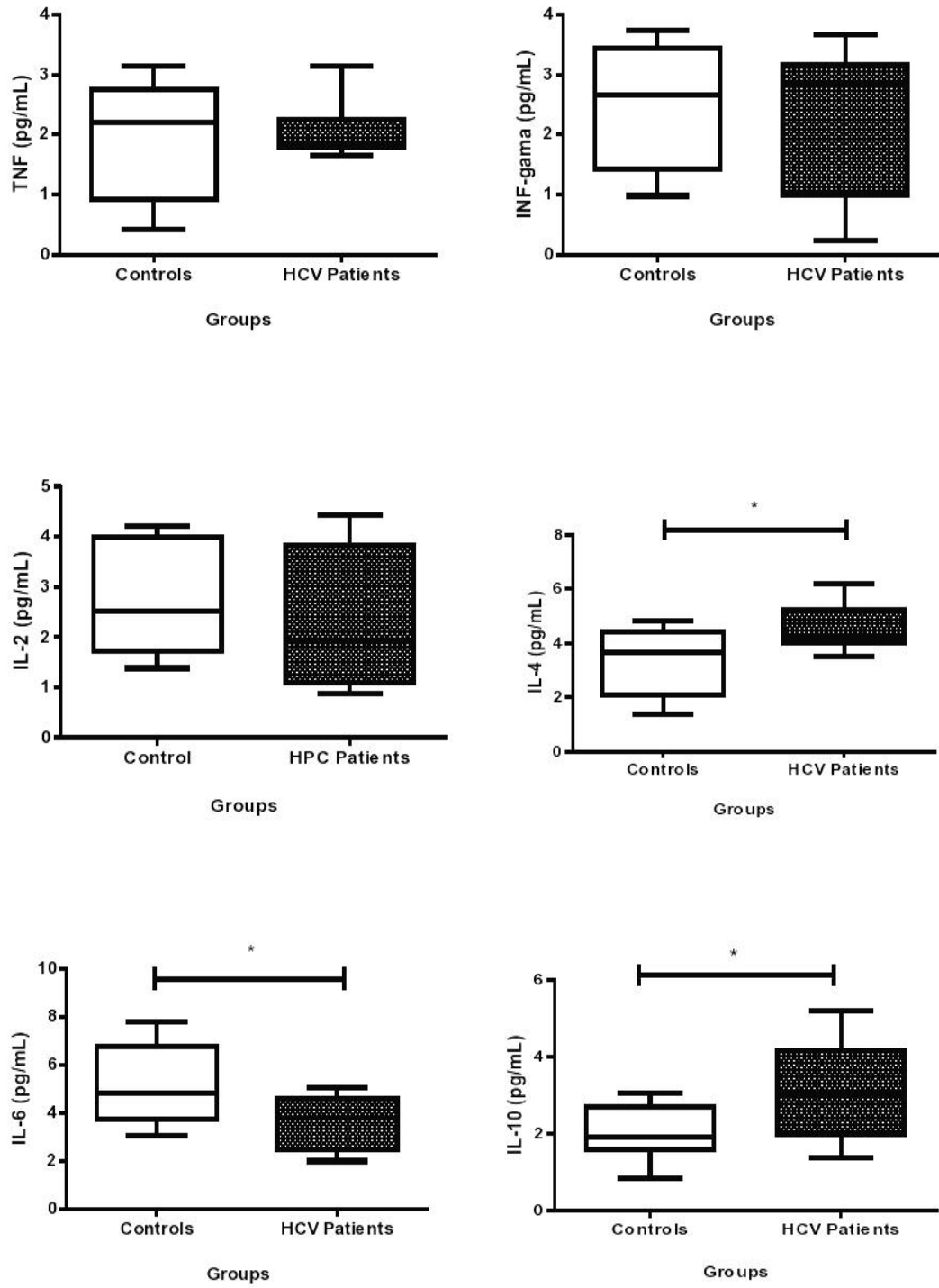


Figure 4



## 5 CONCLUSÕES

- A sinalização purinérgica mostrou estar envolvida nas respostas imunes dos pacientes com hepatite C.
- Sugere-se que a redução da atividade de E-NTPDase quando utilizado ATP como substrato possa se dar pela ação de outra enzima como E-NPP ou fosfatase alcalina, resultando na formação de ADP, promovendo assim elevação na atividade de E-NTPDase em pacientes HCV a fim de desenvolver mecanismos regulatórios em resposta à presença de lesões hepáticas e processo inflamatório constante.
- A manutenção de baixas concentrações de ATP e ADP extracelular exercida pela E-NTPDase presente nas plaquetas induz a um equilíbrio destes nucleotídeos a nível extracelular a fim de reduzir o acúmulo de plaquetas no tecido hepático e conseqüentemente o processo fibrótico.
- A elevada atividade de E-ADA observada em linfócitos e plaquetas vem a favorecer a produção de inosina, a qual apresenta atividade antiplaquetária e imunossupressora, contribuindo na redução do acúmulo plaquetário no fígado.
- Os fármacos utilizados no tratamento de portadores de HCV não interferiram nas atividades das enzimas analisadas;
- A diminuição da IL-6, bem como produção aumentada de IL-4 e IL-10 em pacientes com HCV sugere uma tentativa de diminuição do processo pró-inflamatório e o desenvolvimento de possíveis mecanismos compensatórios a fim de minimizar a lesão hepática.

## REFERÊNCIAS

- ABRIGNANI, S. Bystander activation by cytokines of intrahepatic T cell in chronic viral hepatitis. **Semin Liver Dis.**, v. 17, p. 319-322, 1997.
- ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 2436-2441, 2007.
- ALVES, A.V. et al. Tratamento de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C com interferon- $\alpha$  e ribavirina: a experiência da Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 40, n. 4, 2003.
- ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S.C. Ecto-nucleotidases of the cd-39/ntpdase family modulated platelet activation on thrombous formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells Mol Dis**, v. 36, p. 217-22, 2006.
- BARSOZZI, C.; IPATA, P.L. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 2214-2225, 2004.
- BATALLER, R; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 209-218, 2005.
- BIRK, A. V. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, n. 140 ,p. 166-175, 2002.
- BOROWIEC, A.; LECHWARD, K.; TKACZ-STACHOWSKA, K.; SKLADANOWSKI, A.C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 269-278, 2006.
- BOTA, A. et al. Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BRC 647). **Clinica Chimica Acta**, v. 306, p. 79-89, 2001.
- BRANDÃO, A. B. M. et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana de la Salud Publica/ Pan American Journal of Public Health**, v. 9, n. 3, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de aconselhamento em hepatites virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 221, de 13 de julho de 2011. **Dispõe sobre Protocolo Clínico e Diretrizes terapêuticas parágrafo hepatite viral C e co-infecções**. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptors subtypes in different systems. **International Reviews of Cytology**, v. 240, p. 31-304, 2004.

CRONSTEIN, B.N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 76, p. 5-13, 1994.

CACCIARELLI, T.V.; MARTINEZ, O.M.; GISH, R.G. et al. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre and post treatment with interferon alfa. **Hepatology**, v. 24, p. 6-9, 1996.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, p. 107-25, 2001.

CURFS, J.H.A.J.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J.A.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, p. 742-780, 1997.

DA FONSECA, José Carlos Ferraz. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 322-330, 2010.

DE MEDINA, M; SCHIFF, E.R. Hepatitis C: diagnostic assays. **Seminars in Liver Disease**, v. 15, n. 1, p. 33-40, 1995.

DING, W.X.; YIN, X.M. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. **J Cell Mol Med**, v. 8, p. 445-454, 2004.

DI VIRGILIO, F. ATP as a death factor. **Biofactors**, v. 8, p. 301-303, 1998.

DI VIRGILIO, F. et al. The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: A novel immunomodulatory receptor. **Progress in Brain Research**, v. 120, p. 355-370, 1999.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587-600, 2001.

DUBYAK, G. R.; EL-MOATASSIM, C. Signal transduction via p2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. **The American Journal of Physiology**, v. 34, n. C577-C606, 1993.

FERREIRA, C. T.; DA SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 4, p. 473-487, 2004.

FOCACCIA, R.; BARALDO, D. C. O. M.; SOUZA, F. V. **Hepatite C**: Epidemiologia. In: FOCACCIA, R. (Org). Tratado de hepatites virais. São Paulo: Atheneu, Cap 4.5, p 221-228, 2003.

FRANCO, R.; CASADÓ, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E.I.; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than na ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 283-294, 1997.



FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, v. 134, n. 6, p. 1655-1669, 2008.

GAKIS, C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. **The European Respiratory Journal**, v. 9, p. 623-624, 1996.

GHANY, M. G. et al. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 54, p. 1433-1444, 2011.

GIANNINI, C.; BRÉCHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 27-38, 2003.

GONÇALVES, C. B. T. et al. Effectiveness of alpha interferon (+ ribavirin) in the treatment of chronic viral hepatitis C genotypes 2 and 3 in Brazilian sample, **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 49, n. 2, 2012.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 33-39, 2004.

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

JACOBSON, K.A.; GAO, Z.G. Adenosine receptor as therapeutic targets. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v.5, p.247-264, 2006.

JANEWAY, C.A.; TAVARES, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. Tradução Ana Cristina Aramburu da Silva, Cristina Bonorino, Denise Cantarelli Machado, Gaby Renard, Isabel Cristina Ribas Werlang, Moisés Evandro Bauer, 6. ed. Poorto Alegre: Artmed, 2007c. Cap. 10, p. 409-431: Imunidade adaptativa contra a infecção.

JUNGER, 2011). JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, p. 201-212, 2011.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v. 96, p. 2157-2162, 2000.

LANGSTON, H.P.; KE, Y.; GEWIRTZ, A.T.; DOMBROWSKI, K.E.; KAPP, J.A. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LARRUBIA, J. R. et al. Adaptative immune response during hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 13, p. 3418-3430, 2014.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 463-484, 2001.

LAVANCHY, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 107-115, 2011.

LISTER, M.F. et al. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. **Journal of Inflammation (London England)** v. 4, p. 542–548, 2007.

MARTINS, T. et al. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 107-112, 2011.

MINAMINO, T.; KITAKAZE, M.; MORIOKA, T.; NODE, K.; KOMAMURA, K.; TAKEDA, H.; INOUE, M.; HORI, M.; KAMADA, T. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. 238–244, 1996.

NAPOLI, J.; BISHOP, G.A; MCGUINNESS, P.H. et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. **Hepatology**, v. 24, p. 749-765, 1996.

NELSON, D.R.; TU, Z.; SOLDEVILA-PICO, C. et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. **Hepatology**, v. 38, p. 859-868, 2003.

OYANAGI, Y.; TAKAHASHI, T.; MATSUI, S. et al. Enhanced expression. Of interleukin-6 in chronic hepatitis C. **Liver**, v. 19, p. 464-472, 1999.

PELLICORO, A. et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nature Reviews/Immunology**, v. 14, p. 181-194, 2014.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, p. 5-19, 2004.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v.7, p. 225–230, 1996.

REIS, M. M. Testes imunológicos. **Manual ilustrado para profissionais de saúde**. Porto Alegre: AGE Editora, 1998.

RESTA, R.; YAMASHITA, Y.; THOMPSON, L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. **Immunological Reviews**, v.161, p.95-109, 1998.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signaling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

ROSEN, H.R. Chronic hepatitis C infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 2429-2438, 2011.

SALUDES, V. et al. Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 12, p. 3431-3442, 2014.

SEVIGNY, J. et al. Identification and characterization of a novel hepatic canalicular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5640-5647, 2000.

SHAROYAN, S.; ANTONYAN, A.; MARDANYAN, S.; LUPIDI, G.; CRISTALLI, G. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochimica Polonica**, v.53, p. 539- 546, 2006.

SHIMODA, K.; BEGUM, N.A.; SHIBUTA, K. et al. Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression. And histological anctivity index in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 28, p. 108-115, 1998.

SPYCHALA, J.; MITCHEL, B.S.; BARANKIEWICZ. Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase and 5"-nucleotidase. **Journal of Immunology**, v.158, p.158:4947-4952, 1997.

STRATER, N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 343-350, 2006.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-82, 2001.

TILG H.; KASER A.; MOSCHEN, A.R. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. **Liver Internacional**, v. 26, p. 1029-1039, 2006.

TSUBOI, I.; SAGAWA, K.; SHICHIJO, S. et al. Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus Type 1 and human and immunodeficiency virus Type 1 infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, p. 626-630, 1995.

TSUKAMOTO, H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 23, p. 911-916, 1999.

YANG, C. et al. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. **Gastroenterology**, v. 124, n. 1, p 147-159, 2003.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide - and nucleoside - converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. **Biochimica et Biophysica**, p.673-694, 2008.

UNGERER, J.P.J.; OOSTHUIZEN, H.M.; BISSBORT, S.H. et al. Serum adenosine deaminase: isoenzyme and diagnostic application. **Clinical Chemistry**, v. 38, p. 1322-1326, 1992.

WINNOCK, M. et al. Liver associated lymphocytes: role in tumor defense. **Semin Liver Dis**, v. 13, p. 81-92, 1993.

ZEIN, N. N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, 2000.

ZHU, Y. Z. et al. How hepatitis C virus invades hepatocytes: The Mystery of viral entry. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 13, p. 3457-3467, 2014.

ZIMMERMANN, H. Extracellular purine metabolism. **Drug Development Research**, v. 39, p. 337–352, 1996.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. **Drug Developmental Research**, v. 52, p. 44-56, 2001.

## ANEXOS

Anexo A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Título do projeto: “**Metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de pacientes com hepatite C**”.

Pesquisadora responsável: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal**

Instituição/Departamento: **Departamento de Microbiologia e Parasitologia– UFSM**

Telefone para contato: (55) 3220-9581 ou (55) 99467672

Local de coleta de dados: \_\_\_\_\_

Nome da paciente: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos

Responsável legal: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia com atenção o que está escrito e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será punido (a) de forma alguma. Convidamos você também a responder algumas perguntas, de forma voluntária, tendo o direito de desistir a qualquer momento.

**Objetivo:** A pesquisa avaliará algumas substâncias que compõem o sangue de pacientes com hepatite C. Buscamos um melhor entendimento sobre esta doença e gerando informações capazes de no futuro auxiliar no controle e no estabelecimento de novos tratamentos bem como melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores da hepatite C.

**Procedimento e riscos:** Será realizada uma coleta de sangue de 10mL da veia. É importante informar que a participação na pesquisa não oferece danos à sua saúde. A coleta será realizada por um profissional especializado, sendo este procedimento seguro, mas que pode, às vezes, trazer algum leve desconforto devido à picada da agulha. O local da coleta de sangue poderá ficar dolorido ou arroxado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde. Providências serão tomadas a fim de se evitar os riscos da coleta, portanto, se o local da coleta ficar

arroxeadado, será realizado uma compressão no local durante pelo menos dois minutos e compressas frias serão utilizadas auxiliando na redução da dor. Ao responder ao questionário você poderá sentir um leve cansaço.

**Benefícios:** Os resultados não irão trazer benefícios diretos para você, porém sua contribuição é importante para melhorar nossos conhecimentos sobre a hepatite C. Ao participar desta pesquisa o senhor não terá gasto ou lucro financeiro e não será feito qualquer tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa.

**Garantia de acesso:** Em caso de dúvidas os pesquisadores responsáveis estarão à disposição para esclarecê-las através do contato pelos telefones: (55) 99467672 – Daniela Bitencourt Rosa Leal; (55) 97069621- Maria Emilha Basso.

**Confidencialidade:** as informações fornecidas no questionário serão de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Em nenhum momento será revelado ou utilizado seu nome. Os dados serão arquivados por um período de 5 anos, e depois destruídos. O material biológico será coletado e guardado em local seguro por até 1 (um) ano, utilizados unicamente para os fins descritos e após este período serão descartados.

#### **Consentimento da participação da pessoa como sujeito**

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo que fui convidado. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de pacientes com hepatite C”. Eu discuti com a pesquisadora Maria Emilha Basso sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu acompanhamento/ assistência/tratamento neste Serviço.

Declaro, também, que recebi cópia do presente Consentimento Livre e Esclarecido.

Santa Maria, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ .

---

Assinatura do participante

---

Assinatura do coordenador do projeto

---

Assinatura do pesquisador

**Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:**

Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM - Cidade Universitária - Bairro Camobi, Av. Roraima, nº1000 - CEP: 97.105.900 Santa Maria – RS. Telefone: (55) 3220-9362 –

Fax: (55)3220-8009- E-mail: [comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br](mailto:comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br) - Web:

[www.ufsm.br/cep](http://www.ufsm.br/cep)

Anexo B – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Título do projeto: “**Metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de pacientes com hepatite C**”.

**Pesquisadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal (Coordenadora)

**Instituição/Departamento:** Departamento de Microbiologia e Parasitologia

**Telefone para contato:** (55) 3220 – 9581

**Local da coleta de dados:** Hospital Universitário de Santa Maria

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade das pacientes cujos dados serão coletados do registro do paciente no arquivo do HUSM. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas na sala 4102 do prédio 20 do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (UFMS) por um período de cinco anos, sob a responsabilidade da Pesquisadora responsável. Após este período, os dados serão destruídos.

Santa Maria, Maio de 2014.

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **Daniela Bitencourt Rosa Leal**



## Anexo C – QUESTIONÁRIO

Título do projeto: “**Metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de pacientes com hepatite C**”.

Pesquisadora responsável: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM.

Telefone para contato: (55) 3220-9581 ou (55) 99467672

Identificação número: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_\_\_

**PACIENTE:**

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) M ( ) F

Raça: ( ) negra ( ) branca ( ) mulato ( ) asiático

Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Local de nascimento: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

SAME: \_\_\_\_\_

Responsável pela coleta:.....

1. Grupo em que pertence o paciente:

( ) com hepatite C

( ) sem hepatite C

2. Faz uso de alguma medicação?

( ) Não

( ) Sim. Quais? ( ) ribavirina ( ) interferon ( ) analgésicos ( ) outros

Outros: \_\_\_\_\_ Miligramas: \_\_\_\_\_

Quantas vezes ao dia? \_\_\_\_\_

3. É fumante? ( ) Sim ( ) Não

4. Possui uma das seguintes doenças? Quais?

( ) Hipertensão ( ) Diabetes ( ) Artrite reumatóide ( ) Coagulopatia

( ) Outras \_\_\_\_\_

5. Como e há quanto tempo descobriu ter hepatite C?

---

6. Quando iniciou a terapia medicamentosa?

---

7. Existem outras pessoas com hepatite C na família? Qual o parentesco?

---

Outras informações relevantes:

---

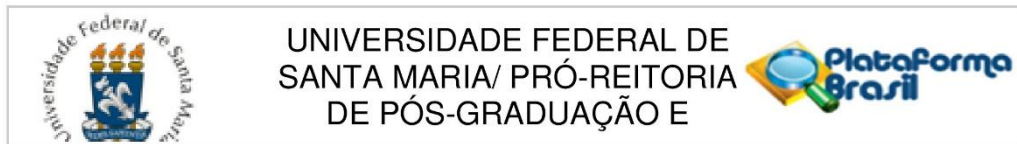
---

---

---

---

## Anexo D – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DA ADENINA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM HEPATITE C

**Pesquisador:** Daniela Bitencourt Rosa Leal

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 36333914.4.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 832.436

**Data da Relatoria:** 14/10/2014

**Apresentação do Projeto:**

A hepatite C constitui-se na maior causa de doença crônica hepática a qual pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular representando, assim, um problema de saúde pública. Sua transmissão se dá pelo vírus da hepatite C (HCV ou VHC), ocorrendo principalmente por via pós-transfusional e também por procedimentos médicos, odontológicos, pelo uso de drogas injetáveis, procedimentos de tatuagem e injeções. O processo infeccioso se inicia após entrada do HCV nos hepatócitos, onde pode permanecer oculto ao sistema imune inato, apresentando altas porcentagens em hospedeiros e processo inflamatório contínuo, fazendo-se necessária atuação do sistema imune adaptativo, reconhecendo e destruindo estas células. Atuando de forma essencial para o início e a manutenção das reações inflamatórias, os nucleotídeos extracelulares ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina são importantes moléculas sinalizadoras que modulam as ações dos linfócitos. Estas moléculas tem seus efeitos promovidos pela ativação de receptores purinérgicos específicos, tais como o receptor P2X7, e são catabolizadas através de um complexo enzimático, formado por E-NTPDase, E-NPP, E-5'-nucleotidase e adenosina desaminase. Tais enzimas localizam-se na superfície de linfócitos e atuam modulando a resposta inflamatória e as reações imunes.

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

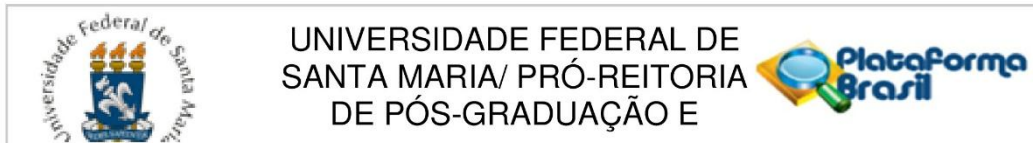
**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 832.436

Sendo assim, sabendo-se que a patologia da hepatite C está diretamente associada à intensa resposta imunológica e ao processo inflamatório, este projeto propõe-se avaliar o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de pacientes com hepatite C.

Trata-se de um estudo transversal que visa a estudar o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de pacientes com hepatite C.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em linfócitos de pacientes com hepatite C.

Objetivos específicos

Em pacientes com hepatite C pretende-se:

- 1) avaliar a atividade da enzima E-NTPDase em linfócitos;
- 2) avaliar a atividade da enzima E-ADA em linfócitos;
- 3) quantificar os nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em soro;
- 4) determinar a expressão de CD73 e CD39 em linfócitos;
- 5) determinar a expressão do receptor purinérgico P2X7 em linfócitos;
- 6) determinar os níveis séricos de citocinas referentes às respostas Th1, Th2 e Th17.

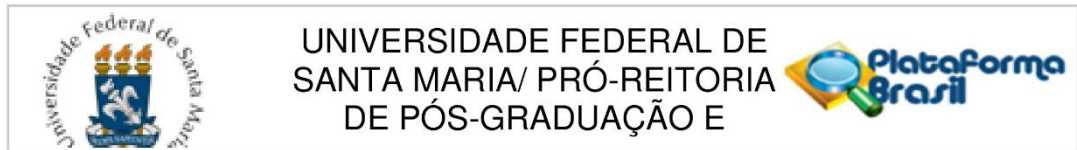
**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os resultados da pesquisa, não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é muito importante para o conhecimento sobre a evolução e tratamento da doença ser aprimorado. Ao participar desta pesquisa o paciente não terá gasto ou lucro financeiro e não será feito pagamento pela participação na pesquisa.

Os riscos são mínimos e derivam-se da coleta de sangue. Providências serão tomadas a fim de se evitar os riscos da coleta, portanto, se o local da coleta ficar arroxado, será realizado uma compressão no local durante pelo menos dois minutos e compressas frias serão utilizadas auxiliando na redução da dor. O preenchimento do questionário poderia causar algum cansaço.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

<b>Endereço:</b> Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar	
<b>Bairro:</b> Camobi	<b>CEP:</b> 97.105-970
<b>UF:</b> RS	<b>Município:</b> SANTA MARIA
<b>Telefone:</b> (55)3220-9362	<b>E-mail:</b> cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 832.436

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE está muito bem escrito.

O termo de confidencialidade também está presente e adequado.

**Recomendações:**

Acesse ao site do CEP - <http://coral.ufsm.br/cep> - e, na aba "Orientações gerais", encontre modelos para apresentação de documentos.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SANTA MARIA, 15 de Outubro de 2014

---

**Assinado por:**  
**CLAUDEMIR DE QUADROS**  
 (Coordenador)

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com