



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

HIDRÓLISE DE ATP E ADP EM LÍQUOR HUMANO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rita Leal Sperotto

**Santa Maria - RS, Brasil
2008**

HIDRÓLISE DE ATP E ADP LÍQUOR HUMANO

por

Rita Leal Sperotto

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

Orientador: Prof^a. Dr^a Vânia Lucia Loro

Santa Maria – RS, Brasil
2008

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

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

HIDRÓLISE DE ATP E ADP EM LÍQUOR HUMANO

elaborada por

Rita Leal Sperotto

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

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Schetinger (UFSM)

Prof^a Dr^a Maria Amália Pavanato (UFSM)

Santa Maria, 27 de março de 2008.

Aos meus avós, Dinah e Pedro:

“Por todo o tempo que eu ainda viver,
eternizarei vossa memória, pois uma
árvore morre, mas deixa dentro de
seus frutos a semente de sua vida.”

Vocês estarão sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora prof.^a Dra. Vânia Lúcia Loro, pela oportunidade de me inserir neste grupo de pesquisa, assim como pela confiança, amizade, compreensão, pelo incansável incentivo, além de toda a orientação segura para a conclusão deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica que, de alguma forma, incrementaram o meu conhecimento.

As colegas de laboratório Alexandra Pretto, Bibiana Moraes e Adriana Santi, obrigada por me transmitirem paz, através de seus sorrisos, nos meus momentos de aflição.

A Milene Fonseca, apesar de não mais tão próximas, te serei grata por toda ajuda que sempre me prestaste.

A Denise Miron, obrigada por todo o auxílio nas horas de maior aperto.

As companheiras Bárbara Clasen e Roberta Cattaneo, pela descontração e bom humor constantes, tornando o nosso laboratório mais agradável.

A Charlene Menezes, por todos os ensinamentos, pela paciência, pela disponibilidade, apoio técnico e valiosa colaboração. Esta conquista também é tua!

A Aracélli Gnatta, pela amizade e auxílio em todas as etapas deste trabalho.

A amiga Lissandra Gluczak, meu primeiro contato no laboratório, que me fez ver que nada é por acaso, e me fez acreditar no potencial que me trouxe até aqui.

Gurias, vocês estarão sempre no meu coração!

As amigas Vanessa Naumann e Carina Garlet, do Laboratório de Análises Clínicas da UNICRUZ, pelo exemplo de profissionalismo, incessante apoio e incentivo.

Agradeço as colegas e amigas Elisabete Ávila da Silva, Elisa Stefanon e Patrícia Marisco pelas contínuas palavras de encorajamento e também por transformarem os meus momentos de angústia em momentos mais alegres e descontraídos.

A Prof^a Carmen Eismann da Universidade de Cruz Alta, serei eternamente grata pela amizade, confiança e por todas as vezes que se disponibilizou em me auxiliar nas minhas mais variadas dúvidas.

A todos os meus colegas dos laboratórios de Análises Clínicas, Histologia, Microbiologia, Bioquímica e Citopatologia da UNICRUZ, agradeço por me assistiram durante toda esta jornada.

A Dra. Roselene Bastolla do Laboratório São Vicente – Cruz Alta, pela amizade e prestimoso apoio técnico.

A colega e amiga Marta Duarte, por ter me proporcionado o ingresso neste incrível mundo da pesquisa. Apesar da distância, tua amizade será sempre conservada. Mais uma vez, obrigada por tudo!

A meu dindo Raul e minha prima Adelina, pela eterna preocupação e pelo carinho, e a minha dinda Teresa, pelo modelo de profissional que eu sempre tentarei seguir.

Ao meu pai, pelo apoio, pelo constante interesse e incentivo.

A minha mãe, uma pessoa imprescindível nos momentos de maior angústia, obrigada pelo carinho, pela força, encorajamento e apoio espiritual.

Ao Vitor, meu esposo, obrigada por estares ao meu lado em todas as ocasiões importantes. Agradeço-te também pela paciência, respeito e amor que sempre estás demonstrando por mim.

Ao meu filho Pedro, por tornar mais alegres todos os momentos da minha vida.

E, acima de tudo, agradeço a Deus por ter me presenteado com a vida.

RESUMO

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

HIDRÓLISE DE ATP E ADP EM LÍQUOR HUMANO

AUTORA: RITA LEAL SPEROTTO
ORIENTADOR: PROF^a DR^a. VÂNIA LÚCIA LORO
Data e Local da defesa: Santa Maria, 27 de março de 2008.

A análise do líquido é de grande importância para a detecção de distúrbios neurológicos de diversas etiologias. O ATP junto a seus produtos de hidrólise (ADP, AMP e adenosina) desempenha importantes funções junto ao SNC, as quais envolvem ações neuroprotetoras em doenças de etiologias variadas. O presente estudo tem como objetivos verificar a ocorrência de hidrólise de nucleotídeos da adenina em líquido de pacientes sem doença inflamatória do sistema nervoso. A determinação da atividade enzimática da NTPDase foi feita em líquido humano em diferentes condições experimentais e na presença de inibidores. As amostras foram escolhidas de acordo com os baixos níveis protéicos, valores normais de glicose e contagem celular diminuída. Foi escolhido o sobrenadante 1 (S1) por apresentar melhores atividades enzimáticas. A melhor temperatura de hidrólise do ATP e ADP foi 37°C. Esta enzima é cátion dependente, sendo a atividade de hidrólise ótima do ATP em presença de 5 mM Ca^{+2} e o ADP 5-7 mM de Ca^{+2} , ambos em pH 8.0. A azida sódica alterou a atividade enzimática do ATP e do ADP somente nas concentrações mais altas deste inibidor da ATPase mitocondrial. A ouabaína, um inibidor da Na^{+}/K^{+} ATPase não afetou a hidrólise do ATP/ADP. O inibidor de ATPase tipo-P lantânio (5 mM) foi ineficaz na hidrólise dos nucleotídeos. O suramin (30-300 μ M), inibidor específico de NTPDase, inibiu a hidrólise do ATP/ADP e apresentou máximo efeito inibitório na concentração de 300 μ M. Os resultados deste estudo mostraram que a hidrólise de ATP/ADP em líquido humano apresentou uma resposta semelhante àquelas obtidas em sinaptossomas de ratos.

Palavras-chave: NTPDase; caracterização; líquido cefalorraquidiano; neuroproteção.

ABSTRACT

Master Dissertation
Toxicological Biochemistry Post-Graduation
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ATP AND ADP HYDROLYSIS IN HUMAN CEREBROSPINAL FLUID

AUTHOR: RITA LEAL SPEROTTO
ADVISOR: PROF. DRA. VÂNIA LÚCIA LORO
Date and Place of the defense: March 27th, 2008, Santa Maria

Adenine nucleotides hydrolysis is an important step of the neuromodulation of CNS and some of its breakdown products are able to protect the nervous tissue against brain injuries. The activity of NTPDase (EC 3.6.1.5, apyrase, CD39) was verified in cerebrospinal fluid (CSF) from patients without neural inflammatory process under different conditions and in the presence of several inhibitors. The samples were chosen considering the low protein levels, normal glucose levels, low leukocyte count and CSF differential count. We chose to use the supernatant 1 (S1) for enzyme assay due to the best enzymatic activities in this fraction. The best hydrolyze temperature was 37°C for ATP and ADP. This enzyme was cation-dependent, with a maximal rate for ATP and ADP hydrolysis in pH 8.0 in the presence of 5mM Ca⁺². Sodium azide inhibited both nucleotide hydrolysis at concentrations higher than 10 mM. Sodium fluoride inhibited the ATP and ADP hydrolysis at concentrations of 15 mM and 20 mM. The Na⁺ K⁺ ATPase inhibitor ouabain, did not affect ATP or ADP hydrolysis. The inhibitor P-type ATPase lanthanum 5mM was ineffective on NTPDase hydrolysis. Suramin (30-300 µM) inhibited ATP and ADP hydrolysis and presented a maximal inhibitory effect of 50% at 300 µM. The results of the present study demonstrated that ATP and ADP hydrolysis from human CSF presented a similar response to those obtained from rat synaptosomes.

Keywords: CSF; nucleotides; NTPDase; neuroprotection.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

TABELA 1.	Comparação entre LCR normal e LCR de meningite bacteriana e meningite viral.....	20
-----------	--	----

MANUSCRITO:

TABLE 1.	Calcium dependence of NTPDase (nmol Pi/ min per mg protein) from human CSF.....	44
TABLE 2.	Distribution of ATP, ADP and AMP hydrolysis after human CSF centrifugation (n=10).....	45
TABLE 3.	Effects of ouabain (mM), lanthanum (mM) or suramin (μ M) on ATP or ADP hydrolysis from human CSF (n=10). Nucleotide hydrolysis was expressed as nmol Pi/min per mg protein.....	46

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1. Fluxo do Líquor no SNC	19
FIGURA 2. Diferentes aspectos e colorações do Líquor.....	21
FIGURA 3. Monócitos e linfócitos no LCR.....	22
FIGURA 4. Estrutura de uma base púrica e de um nucleotídeo.....	24
FIGURA 5. Árvore filogenética dos oito membros da família NTPDase.....	26
FIGURA 6. Localização da NTPDase1 na membrana plasmática das células.	27

MANUSCRITO

FIGURE 1. pH dependence on ATP and ADP hydrolysis from CSF of patients (n=10). The activity was expressed as nmol Pi/min per mg of protein	48
FIGURA 2. Effect of temperature on ATP and ADP hydrolysis from CSF of patients (n=10). The activity was expressed as nmol Pi/min per mg of protein	49
FIGURA 3A. Sodium azide effect on ATP and ADP hydrolysis from CSF of patients (n=10). The activity was expressed as nmol Pi/min per mg of protein	50
FIGURA 3B. Sodium fluoride effect on ATP and ADP hydrolysis from CSF of patients (n=10). The activity was expressed as nmol Pi/min per mg of protein	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR – Regiões conservadas de apirase
ADP – Adenosina 5'- difosfato
AMP – Adenosina 5'-monofosfato
AST – Aspartato amino transferase
ATP – Adenosina 5'- trifosfato
CaCl₂ – Ccloreto de cálcio
CK-BB – Creatinoquinase brain
CNS – Central nervous system
CO₂ – dióxido de carbono
CSF – Cerebrospinal fluid
dl - decilitros
EDTA – Etileno diamino tetracético
E-NPP – Ecto-nucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDase – Ecto-nucleosídeo trifosfatodifosfoidrolase
HCl – Ácido clorídrico
K⁺ - Potássio
KCl – Cloreto de potássio
KH₂PO₄ – Diidrogenofosfato potássico
LCR – Líquido cefalorraquidiano
LDH – Lactato desidrogenase
mg – miligramas
Mg⁺² - Magnésio
mM - milimolar
mm³ – milímetros cúbicos
Na⁺ - Sódio
NTPDase – Nucleosídeo trifosfatodifosfoidrolase
Pi – Fosfato inorgânico
SNC – Sistema Nervoso Central

TCA – Ácido Tricloroacético
μl - microlitros

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	60
ANEXO B. Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	61

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE ANEXOS.....	13
APRESENTAÇÃO.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Objetivos.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Líquido cefalorraquidiano.....	18
2.1.1. Formação e fluxo do líquido cefalorraquidiano.....	18
2.1.2. Composição do líquido.....	20
2.2. Nucleotídeos da adenina.....	23
2.2.1. ATP.....	24
2.2.2. ADP.....	25
2.2.3. AMP e Adenosina.....	25
2.3. Enzimas que degradam os nucleotídeos da adenina.....	26
2.3.1. Ecto-NTPDases.....	27
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Manuscrito: Adenine nucleotides hydrolysis in human cerebrospinal fluid.....	29
References.....	40
4. DISCUSSÃO.....	52
5. CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	60

APRESENTAÇÃO

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

1. INTRODUÇÃO

A análise laboratorial do líquido cefalorraquidiano (LCR), ou líquor, é de ampla utilidade para verificar a saúde neurológica dos pacientes. Tais análises têm sido de grande importância para o diagnóstico de várias patologias no Sistema Nervoso Central (SNC) de origem infecciosa, como as meningites, assim como também a sua análise poderá fazer a diferenciação entre processos infecciosos, inflamatórios ou neoplásicos. O líquor é constituído por células e metabólitos, os quais, em condições normais, apresentam-se dentro de determinadas faixas de referência (STRASINGER, 1997). Em situações de dano ao tecido nervoso, independente da etiologia, esses constituintes poderão sofrer alterações, como por exemplo: o aumento do conteúdo proteico ou redução da glicose (KLEINE, 2003). Os nucleotídeos da adenina, em situação fisiológica ou patológica, são relevantes no restabelecimento das funções do SNC. Após agir como neurotransmissor, o ATP é degradado até adenosina através de ecto-nucleotidases, e a adenosina será efetiva na neuroproteção. As enzimas que degradam os nucleotídeos da adenina são da família NTPDase (E.C.3.6.1.5, ecto-CD39, ecto-apirase, ATP difosfohidrolase). Elas hidrolisam tanto o ATP como o ADP, liberando AMP, que por sua vez sofre a hidrólise por ação da 5'-nucleotidase (E.C.3.1.3.5, CD73), tendo como produto final a adenosina.

A caracterização de enzimas que degradam nucleotídeos em líquor através da determinação enzimática em diferentes temperaturas e pH do meio de incubação, variadas concentrações de Ca^{+2} , em diferentes frações do sobrenadante e do pellet, assim como também a incorporação de inibidores como azida sódica, fluoreto de sódio, lantânio, ouabaína e suramin ao sistema, associada aos outros parâmetros de diagnóstico, poderá colaborar na identificação de fatores causadores de lesão em indivíduos acometidos por patologias diversas. Considerando a importância da hidrólise dos nucleotídeos e da atividade da enzima CD39 em patologias neurais, são apresentados os objetivos do presente estudo.

1.1 Objetivos:

- Verificar se ocorre hidrólise de ATP e ADP em líquido de pacientes sem patologias inflamatórias detectadas;
- Caracterizar parcialmente a atividade da enzima NTPDase em líquido de pacientes sem patologias inflamatórias detectadas ou quaisquer processos infecciosos;
- Comparar os resultados obtidos utilizando-se líquido humano com os resultados obtidos em estudo anterior que utilizou sinaptossomas de ratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Líquido cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano (LCR), ou líquor, foi descoberto em 1764 por Cotugno, vindo a ser considerado o terceiro líquido biológico mais importante depois do sangue e da linfa (STRASINGER, 1997), pelo papel que desempenha na nutrição e circulação do cérebro e medula espinhal (JOHNSTON & PAPAICONOMOU, 2002).

2.1.1 Formação e fluxo do líquido cefalorraquidiano

Diariamente, o LCR é formado na intensidade de 500 mililitros (500 ml) em um tecido considerado como a fonte primária de sua produção, denominado plexo coróide (FISONE *et al.*, 1995). Aproximadamente 20 ml do LCR produzido, são reabsorvidos pelas vilosidades aracnóideas. A esse volume produzido, são acrescentadas pequenas quantidades de líquor originadas nas superfícies endimárias dos ventrículos e das membranas aracnóideas, além de uma pequena quantidade que vem do próprio cérebro através de espaços que rodeiam os vasos sanguíneos e penetram no tecido cerebral, mantendo assim um volume médio de 120 - 150 ml em adultos (POPLE, 2002). O fluxo do líquor, após sua síntese, ocorre a partir dos ventrículos, passando para o interior do espaço subaracnóideo e circulando pela medula espinhal e superfície do cérebro (Fig. 1) (JOHNSTON & PAPAICONOMOU, 2002).

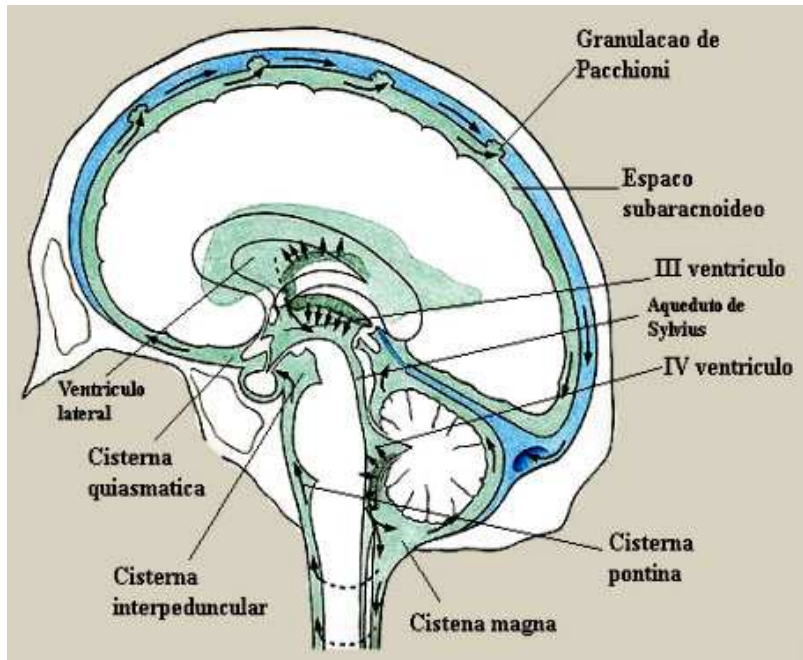


Figura1- Fluxo do líquido no SNC. Disponível em http://esclerosemultipla.files.wordpress.com/2006/08/men_03.jpg. Acesso em 1 novembro de 2007

A produção de LCR nos plexos coróides, ocorre por filtração sob pressão hidrostática através do endotélio capilar coróide, e depende do transporte ativo de íons sódio gerado pela bomba de Na^+/K^+ ATPase presente na membrana das células epiteliais que revestem o lado externo de tais plexos (FISONE *et al.*, 1995). Os íons sódio são ativamente transportados do interior das células epiteliais coróides para dentro dos ventrículos e esses íons, por apresentarem cargas positivas, atraem as cargas opostas dos íons cloreto (DI TERLIZZI & PLATT, 2005). Desta forma, há a formação de cloreto de sódio, o que provoca a osmose da água através da membrana (WATSON & SCOTT, 1995). Além desse movimento iônico, há o transporte de glicose para o interior do líquido cefalorraquidiano, como o de potássio e bicarbonato para fora desse líquido (GUYTON & HALL, 2002).

2.1.2 Composição do Líquor

O líquido, embora seja considerado um ultrafiltrado plasmático, apresenta uma composição diferente dos outros líquidos extracelulares de outras partes do corpo. Comparando o líquido ao plasma, ambos têm composições semelhantes, mas há uma grande disparidade na concentração dos seus constituintes (WALKER, 1933).

	LCR normal	LCR em meningite bacteriana	LCR em meningite viral
Contagem celular	Até 5 células/mm ³	↑ 100 células/mm ³	↑ 10 células/mm ³
Proteínas	15-45 mg/dl	↑ 45 mg/dl	Normal ou ↑
Glicose	60-80 % da glicemia	↓	normal
Cor	Incolor	Alterada	Incolor
Aspecto	Límpido	Turvo/opaco	Incolor

Tabela 1. Comparação da composição do LCR normal e em meningites – ROMERO *et al.*, 2003; WEISFELT *et al.*, 2006.

Moléculas de grande peso molecular têm dificuldade de passar do sangue para o LCR ou para os líquidos intersticiais do cérebro, apesar de passarem para os líquidos biológicos usuais do corpo. Isto se deve a existência de barreiras semi-permeáveis constituídas por células justapostas que se localizam em quase todo o parênquima cerebral. Tais barreiras são usualmente chamadas de barreira hematoquímica e barreira hematoencefálica, situadas entre o sangue e o líquido cefalorraquidiano, sangue e o líquido cerebral,

respectivamente (GUYTON & HALL, 2002; DI TERLIZZI & PLATT, 2005). A função desse conjunto celular é garantir o controle da homeostase no parênquima cerebral, evitando flutuações na concentração extracelular de íons, hormônios e aminoácidos, os quais em desequilíbrio, poderão gerar uma atividade de neurotransmissão descontrolada e também a injúria de células nervosas (MOODY, 2006).

A aparência do LCR em pessoas saudáveis é límpida, cristalina e incolor, sendo usualmente comparado a "água de rocha". Essa aparência poderá ser opaca ou turva, xantocrômica ou sanguinolenta na presença de proteínas, lipídeos, microrganismos ou sangue. Tais inclusões causarão a variação da cor, sendo chamado de líquor rosado, avermelhado ou amarelo (Fig. 2) (STRASINGER, 1997).



Figura 2 - Diferentes aspectos e colorações do LCR – STRASINGER, 1997.

Em condições normais, o líquor em adultos apresenta até cinco leucócitos/mm³, sendo praticamente todas essas células representadas por linfócitos e monócitos (Fig. 3). Em crianças e em recém-nascidos, o valor de referência considerado é de até trinta células/mm³ (RAVEL, 1997).

O líquor normalmente não apresenta hemáceas. Estas células podem estar presentes em situações variadas, como punção traumática ou hemorragia intracraniana. Outras formas celulares diferentes que eventualmente poderão

ser encontradas no LCR são: macrófagos, células do plexo coróide e células neoplásicas (STRASINGER, 1997).

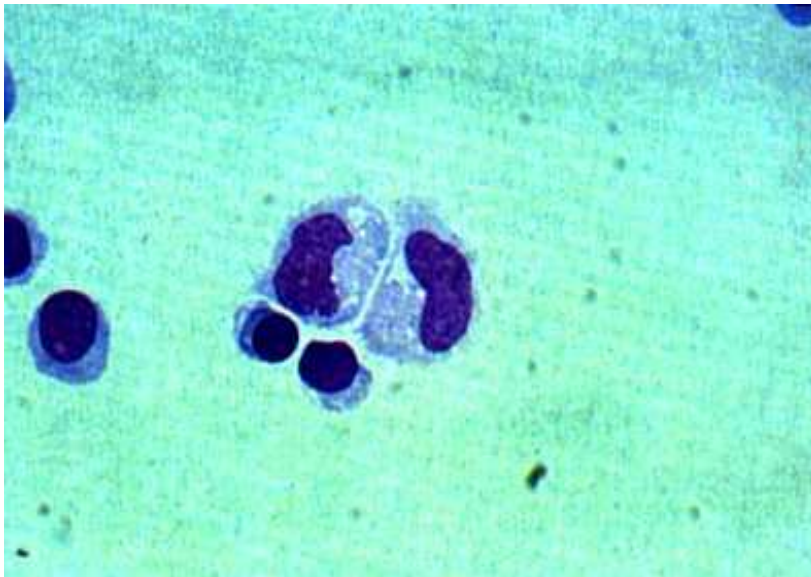


Figura 3 - Monócitos e linfócitos no LCR – STRASINGER, 1997.

Normalmente, a concentração protéica do líquido é baixa, geralmente considerada na faixa de 15 – 45 mg/dl. Entretanto, em condições de dano a barreira hematoencefálica, ocorre a passagem, para o líquido, de grande quantidade de proteínas oriundas do plasma, sendo a albumina a principal fração protéica a invadir o LCR, devido a sua alta concentração plasmática (DI TERLIZZI & PLATT, 2005). Outros exemplos em que há o aumento da proteinorraquia seriam: processos infecciosos, traumatismo cerebral, acidente vascular cerebral e tumores no SNC (RAVEL, 1997). É sabido que certas substâncias são mais permeáveis ao SNC do que outras, e esta permeabilidade é afetada por processos patológicos ou por mudanças na concentração de alguns metabólitos plasmáticos (LYTTLE & HEARN, 1926). A glicose no LCR é derivada do plasma, sendo carregada para o SNC por transporte facilitado, podendo-se considerar que a glicorraquia é dependente dos níveis da glicemia, sendo que os níveis normais de glicose no líquido equivalem a dois terços da glicose no plasma, ou seja, 60 – 80% da glicose plasmática (KLEINE *et al.*, 2003).

O aumento nos níveis da glicorraquia é observado quando há elevação da glicemia, situação esta que pode ser fisiológica. Já a diminuição da glicose no líquido, associada com outros achados clínicos, serviria como parâmetro de diagnóstico em processos patológicos, como nas meningites bacteriana, tuberculosa ou fúngica (RAVEL, 1997; SÁEZ-LLORENS & MCCRACKEN, 2003).

A bomba de Na^+/K^+ presente na membrana dos plexos coróides é a responsável pela determinação das concentrações de sódio e potássio no LCR. Ainda estão presentes neste líquido cálcio, magnésio, cloretos, fósforo e bicarbonato, os quais apresentam distribuição independente entre o LCR e o plasma devido a outros mecanismos de transporte (PINCUS & KRAEMER, 1923).

Várias enzimas presentes no líquido têm sido estudadas ao longo dos anos. Elas podem ter origens diferentes, ou seja, essas enzimas podem proceder do sangue ou do próprio tecido neural. Creatinoquinase isoenzima (CK-BB) e Lactato Desidrogenase (LDH) são enzimas utilizadas no diagnóstico de danos ao SNC, estando alteradas, geralmente, em patologias com mau prognóstico (DI TERLIZZI and PLATT, 2005).

As funções do líquido incluem: servir de barreira mecânica contra traumatismos, fazer o transporte intracerebral de biomoléculas, promover a remoção de metabólitos cerebrais tais como lactato e CO_2 , fazer a manutenção da pressão intracraniana e a defesa contra a invasão de patógenos (WATSON & SCOTT, 1995). **Em diversas patologias como doenças infecciosas, processos neoplásicos, traumas, doenças neurodegenerativas entre outras, as análises laboratoriais do líquido, tais como o cultivo microbiológico, a citologia e as análises bioquímicas, associados aos dados clínicos, servirão de auxílio no diagnóstico (WATSON & SCOTT, 1995; KLEINE *et al.*, 2003).**

2.2 Nucleotídeos da adenina

Nucleotídeos são compostos formados a partir da união de uma base nitrogenada, derivada de compostos como as purinas ou pirimidinas (Fig. 4a), um monossacarídeo pentose e um, dois ou três grupos fosfato (Fig. 4b). A perda dos

grupos fosfato, faz com que o nucleotídeo passe a ser chamado de nucleosídeo (Fig. 4b).

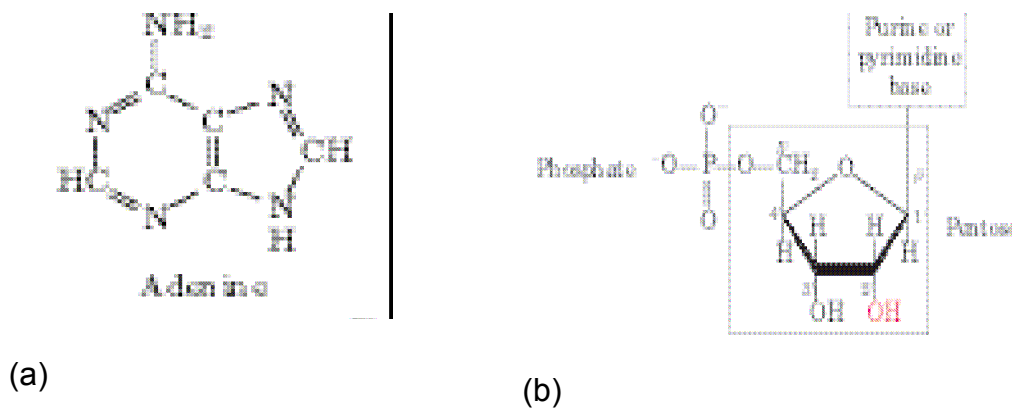


Figura.4 - (a) Estrutura de uma base púrica; (b) estrutura de um nucleotídeo. Lehninger – Principles of Biochemistry, 4th ed.

Nucleotídeos extracelulares modulam múltiplas funções teciduais. Dependendo do subtipo de receptores ativados, eles poderão disparar e mediar processos que afetam o metabolismo celular, mecanismos de ativação, migração e adesão celular, além de estarem envolvidos em mecanismos de proteção, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose, que ocorrem na aterosclerose, doenças neurodegenerativas e em várias doenças inflamatórias (ROBSON *et al.*, 2006).

2.2.1 ATP

A adenosina 5'-trifosfato, ou ATP, é um nucleotídeo trifosfatado existente em todas as células e está envolvido na regulação de vários processos fisiológicos e patológicos no meio extracelular (BOURS *et al.*, 2006). Assim como os neurotransmissores, no SNC o ATP é estocado em vesículas intracelulares e, após um estímulo neuronal, ele é liberado pelas terminações nervosas na fenda sináptica aonde irá se ligar a receptores específicos do tipo P₂ (KUKULSKY *et al.*, 2004; NEDELJKOVIC *et al.*, 2005). Esse nucleotídeo, além de ser considerado uma fonte clássica de energia no metabolismo intracelular, no meio extracelular ele age como

neurotransmissor, agindo também como neuromodulador no sistema nervoso central e periférico, além de regular outros processos biológicos como função cardíaca e contração muscular (JAMES & BUTT, 1999; ZIMMERMANN, 1999; TORRES *et al.*, 2002).

2.2.2 ADP

A adenosina 5'-difosfato é o primeiro produto gerado na hidrólise do ATP, sendo conhecido por induzir mudanças no formato das plaquetas, o que acelera o processo de agregação destas células. Em situações de injúria vascular, o ADP é liberado do interior de grânulos existentes nas plaquetas, sendo então considerado o agonista mais importante do recrutamento plaquetário e indutor da formação de trombos no interior de vasos (MARCUS *et al.*, 2003; LUNKES *et al.*, 2003).

2.2.3 AMP e Adenosina

A adenosina 5'-monofosfato é um intermediário obrigatório da hidrólise do ATP (BARSOTTI & IPATA, 2004) que exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio no metabolismo e é também através da hidrólise desse nucleotídeo que ocorre a formação da adenosina (CUNHA, 2001; LATINI & PEDATA, 2001). A adenosina é um nucleosídeo purínico endógeno, produzido principalmente pela hidrólise do ATP (BARSOTTI and IPATA, 2004) e liberado por vários tecidos e órgãos. Além de ser considerado um poderoso agente anticonvulsivante (WANG & GUIDOTTI, 1998), no SNC a adenosina inibe o metabolismo celular em condições adversas como hipóxia, hipoglicemia ou danos isquêmicos. Nestas situações, onde ocorre injúria neuronal, a produção de adenosina é aumentada devido a maior demanda de energia suprida pelo ATP, o qual é totalmente metabolizado (LATINI & PEDATA, 2001; NOJI *et al.*, 2004), assim como também a sua presença é imprescindível para atuar na inibição da agregação plaquetária disparada pelo ADP (LUNKES *et al.*, 2003).

2.3. Enzimas que degradam os nucleotídeos da adenina

As ectonucleotidases são enzimas que degradam os nucleotídeos extracelulares a seus respectivos nucleosídeos (ROBSON *et al.*, 2006). Estas enzimas foram previamente identificadas e são reconhecidas por serem capazes de hidrolisar nucleosídeos purínicos mono, di- e trifosfatados (ZIMMERMANN *et al.*, 1998).

A família das E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) é atualmente composta por 8 membros (Fig. 5), em que quatro destas enzimas são tipicamente encontradas na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular (NTPDase1, 2, 3 e 8). As NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular e as NTPDases 4 e 7 estão totalmente localizadas na região intracelular e seu centros ativos estão direcionados para o lúmen das organelas citoplasmáticas. Todos os membros desta família apresentam em sua estrutura, no mínimo, cinco domínios chamados regiões conservadas de apirase (ACR), locais estes que apresentam grande similaridade na seqüência de aminoácidos. Tais domínios estão diretamente envolvidos na atividade catalítica da enzima e/ou na integridade estrutural das E-NTPDases (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON *et al.*, 2006).

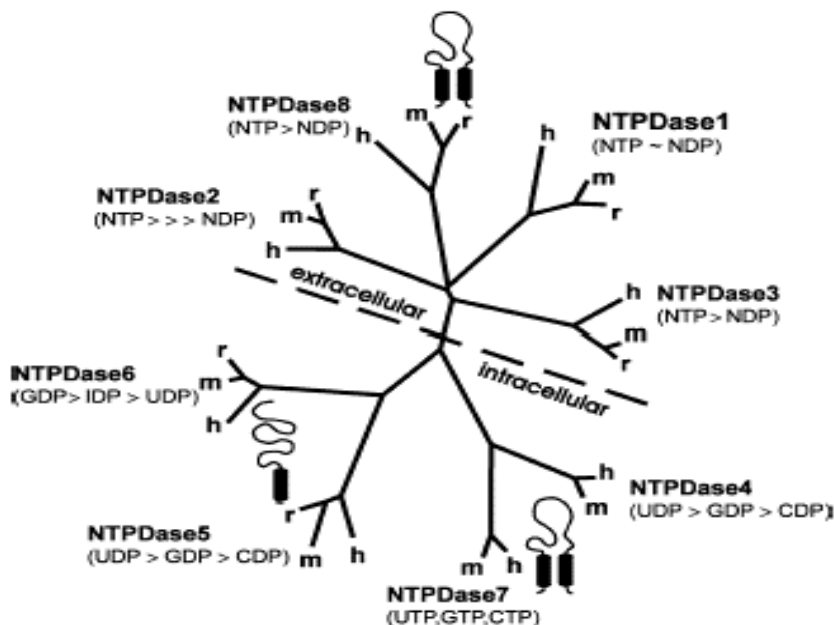


Figura 5 – Árvore filogenética dos oito membros da família NTPDase – Robson *et al.*, 2006)

2.3.1. Ecto-NTPDases

Nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (NTPDase-1, E.C. 3.1.3.5, ecto-apirase, CD39) é a designação genérica de enzimas que hidrolisam nucleosídeos tri- e difosfatados a seus respectivos monofosfonucleosídeos e fosfato inorgânico (OSES *et al.*, 2004 b). A CD39 é uma glicoproteína localizada na membrana plasmática celular, com seis locais de glicosilação e com dois domínios transmembrana, um N-terminal e um C-terminal, sendo que seus sítios catalíticos localizam-se do lado de fora da membrana (Fig. 6) (CHEN & GUIDOTTI, 2001). Na presença obrigatória de cátions divalentes como o $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, a CD39 hidrolisa tanto o ATP a ADP, como o ADP até o AMP (PLESNER, 1995; WANG & GUIDOTTI, 1996). As NTPDase-1 são características por sua insensibilidade a inibidores específicos do tipo P, tipo V e tipo F, caracterizando-se também por apresentarem maior atividade enzimática em pH alcalino (KEGEL *et al.*, 1997; SCHETINGER *et al.*, 2001).

Estudos baseados em imunocitoquímica e western blotting mostraram que as ecto-nucleotidases estão presentes em vários tecidos humanos incluindo placenta, coração, pulmão, fígado, pâncreas, ovários, próstata, cólons e cérebro. Além disso, algumas formas solúveis já foram encontradas também em invertebrados, plantas, fungos e protozoários (KACZMAREK *et al.*, 1996; ZIMMERMANN, 1999; MATOS *et al.*, 2001; SATUÉ-MARTIN *et al.*, 2007).

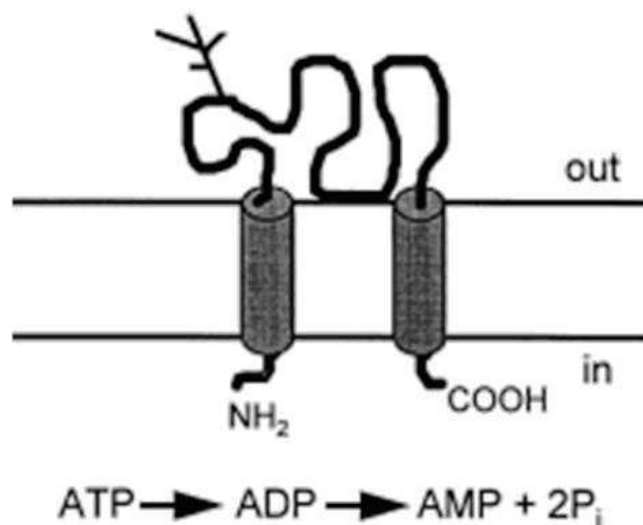


Figura 6 – Localização da NTPDase-1 na membrana plasmática de células – Zimmermann *et al.*, 1998.

3. RESULTADOS

Manuscrito

ATP and ADP hydrolysis in human cerebrospinal fluid

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

(Em preparação para a Revista Brain Research Bulletin)

ATP and ADP hydrolysis in human cerebrospinal fluid (CSF)

Rita Leal Sperotto^{ab}, Charlene Cavalheiro de Menezes^a, Marta Medeiros Frescura Duarte^a, Aracélli Gnatta Dorneles^a, Daiane dos Santos Soares, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a, Vânia Lúcia Loro^{a, c}

^aDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

^bLaboratório de Análises Clínicas, Curso de Farmácia, Universidade de Cruz Alta

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

^cCorresponding author:

Vânia Lucia Loro

Fax: + 55-5532-209456

Departamento de Química

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900

Santa Maria, RS, Brazil

E-mail: vaniluc@yahoo.com.br, vanial@smail.ufsm.br

Abstract

Adenine nucleotides hydrolysis is an important step of the neuromodulation of CNS and some of its breakdown products are able to protect the nervous tissue against brain injuries. The activity of NTPDase (Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase) was verified in cerebrospinal fluid (CSF) from patients without neural inflammatory process under different conditions and in the presence of several inhibitors. The samples were chosen considering the low protein levels, normal glucose levels, low leukocyte count and CSF differential count. We chose use the supernatant 1 (S1) for enzyme assay due to the best enzymatic activities in this fraction. The best hydrolyze temperature was 37°C to ATP and ADP. This enzyme was cation-dependent, with a maximal rate for ATP and ADP hydrolysis in pH 8.0 in the presence of 5 mM Ca^{+2} . Sodium azide inhibited both nucleotide hydrolysis at concentrations higher than 10 mM. Sodium fluoride inhibited the ATP and ADP hydrolysis at concentrations of 15 mM and 20 mM. The $\text{Na}^{+} \text{K}^{+}$ ATPase inhibitor ouabain, did not affect ATP or ADP hydrolysis. The inhibitor P-type ATPase lanthanum 5 mM was ineffective on ATPDase hydrolysis. Suramin (30-300 μM) inhibited ATP and ADP hydrolysis and presented a maximal inhibitory effect of 50% at 300 μM . The results of the present study demonstrate that ATP and ADP hydrolysis from human CSF presented a similar response to pH, azide, fluoride, lanthanum, suramin and ouabain those obtained from rat synaptosomes. A distinct response was showed in terms of calcium concentration required from brain synaptosomes. The presence of a NTPDase in human CSF without any inflammatory or infectious disorders can be important to modulate functions like thrombus formation, release of excitatory nucleotides and others what could bring injuries to the brain tissue.

Keywords: neuromodulation; brain injuries; human CSF; NTPDase; CD39; classical inhibitors

1. Introduction

Nucleotides (triphosphated and diphosphated) such ATP, ADP, UTP and UDP act as extracellular signalling substances in various tissues and organisms. Extracellular ATP is involved in a large variety of physiological functions [1] and it acts as purinergic neurotransmitter that often is co-released into the synaptic cleft together with others neurotransmitters as acetylcholine and norepinephrine [2]. This nucleotide also plays the important role in cellular energy transport and transformation, as well as it is typically associated in enzyme regulation [3]. ADP in human is released from activated platelets and it is the final common agonist for platelet activation and recruitment [4]. Besides its function on platelet aggregation, ADP acts, at low concentrations, strong influence in vascular tone and cardiac function [5].

External concentrations of adenine nucleotides in the extracellular compartment are controlled by ecto-nucleotidases [17]. These enzymes includes the E-NTPDase family (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family), the E-NPP family (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family), ecto-5'-nucleotidase and alkaline phosphatases [21]. These so-called ecto-enzymes are located on cell surface as well as may be found in soluble form in the interstitial medium or in body fluids [10].

Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDases) is the general designation for enzymes that hydrolyses ATP and ADP in their equivalent monophosphonucleosides and inorganic phosphate [11]. The dephosphorylation of these nucleotides results in some important physiological responses by regulating P₂ receptor activation [12]. NTPDases are located in various tissues like brain, kidney,

liver, heart, spleen, thymus, lung, skeletal muscle, as well as the platelet membrane [3, 5, 16]. NTPDase-1 (CD39, ecto-apyrase, ATP diphosphohydrolase) is a glycosylated membrane bound enzyme that hydrolyses ATP and ADP to adenosine monophosphate (AMP), which is subsequently converted to adenosine by 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73). The nucleotide hydrolysis was showed in various pathologies like in the patient with hypercholesterolemia that present an increased hydrolyze in their platelets [13]. In the nervous system, NTPDase acts in an indirect role of modulation of nucleotide and nucleoside processes in response of purine neuromodulatory actions [14]. Increased NTPDase activities have been detected in brain synaptosomes of rats on seizures possibly comprising a neuroprotective response against brain injury [15]. In addition, the presence of soluble NTPDase activities also was suggested for its role of possible marker of brain injury [11].

NTPDase (CD39) and 5'-nucleotidase (CD73) play an important role together in the control the release of ligands (ATP, ADP, AMP and adenosine) for both nucleotide and nucleoside receptors. These enzymes may also have a protective function by keeping extracellular ATP/ADP and adenosine concentrations within physiological levels [19, 20]. In this way these enzymes are very important for physiological modulation of CNS, as well as the neuroprotective activities against brain insults [22]. Changes in neural plasticity can be paralleled by changes in ecto-ATPase activity. This suggests that expression of ectonucleotidases can be altered following a variety of physiological or pathological situations [23]. Considering the importance of reported functions of ATP and the neuroprotective effects of adenosine the adenine nucleotides hydrolyses ectonucleotidases is an important step in the modulation of several functions in central nervous system (CNS). Recent work pointed out the possible role of NTPDase and 5'-nucleotidase in CSF. ADP and AMP

hydrolysis increase in liquor of patients with aseptic and bacterial meningitis [38]. Thus, the objective of this study was verify if occur adenine nucleotide hydrolysis in CSF of NTPDase in this biological fluid through the parameters as pH dependence, different Ca^{+2} concentrations, different temperatures of the medium, different times of the reaction and inclusion of classical inhibitors like sodium azide, fluoride, ouabain, lanthanum and suramin.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Nucleotides, sodium azide, HEPES and Trizma base were purchased from Sigma (St. Louis, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Patients

The sample consisted of 6 male patients and 4 female patients without any inflammatory process in CNS and ages ranging from 20 to 60 years, from LABIMED Santa Maria - RS. The control samples presented medium values for each parameter in the group of participants (n=10) as follow: patients with cellular counting of 2,94 ($\pm 1,89$) cells/mm³ (0-5 cells/mm³ in adults), values of glucose of 87 ($\pm 22,77$) mg/dl (2/3 of glucose of serum) and proteins 32 ($\pm 9,92$) mg/dl (15-40 mg/dl). The references value was obtained of [24]. The samples that had cloudy aspect with an increased white blood cell count and a predominance of polymorphonuclear leucocytes and also a low glucose concentration were rejected. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by

the Human Ethics Committee of the Health Science Center, Federal University of Santa Maria (Protocol number: 0149.0.243.000-06).

2.3. CSF sampling

After the puncture, the CSF samples were pooled in single tubes and stored on ice. Before performing the assays, the samples were centrifuged at 4500×g at 5°C for 5 min, to obtain cell-free supernatants (S1). The supernatants were added to the reaction and used for enzymatic assay.

2.4. ATP and ADP hydrolysis - NTPDase activity

NTPDase activity was determined by the method of Schetinger *et al.* [14] with some modifications in a reaction medium contained 0.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 450 mM Tris-HCl buffer, pH 7,5 in a final volume of 200 µl. Twenty µl of aliquot of CSF (10-30 µg protein) was added to the reaction medium. The reaction mixture containing CSF was pre-incubated for 10 min at 37°C before addition of the substrates. The reaction was started by adding the substrate (ATP and ADP each time) and stopped with 200 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Inorganic phosphate was measured by the method of Chan *et al.* [25], using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are expressed as nmol Pi released/min per mg protein.

2.5. Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method, according to Bradford [26] using bovine serum albumin as standard.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey test when *F* test was significant. Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$ ($n=10$).

3. Results

The pH optimum for ATP and ADP hydrolysis was 8.0 in human CSF. The nucleotide hydrolysis activity had a linear curve at pH 6.0, 7.0, 9.0 and 10.0 using both ATP and ADP as substrate. The highest enzymatic activity was at pH 8.0, showing a decrease in the hydrolysis at pH 9.0 and 10.0 (Figure 1).

NTPDase is activated by Ca^{2+} or Mg^{2+} , and ion function is to form metal ion-nucleotide complex. Therefore the Ca^{2+} requirement for maximal activity for ATP and ADP didn't differed. ATP and ADP hydrolysis was assayed ranging from 0.5 until 2.0 mM for both nucleotides. The calcium concentration (0.5 mM) used in the subsequent assays were in accordance with these results (Table 1).

The adenine nucleotide hydrolysis was assayed at temperature ranging from 15 until 60°C. Figure 2 shows the temperature effects on the ATP and ADP hydrolysis from liquor. The both nucleotide displayed a maximal activity at 37°C. When the temperature was raised from 37°C, the activity decreased 30%.

In order to determine whether the nucleotidase activities in CSF were soluble or membrane bound, we measured ATP and ADP hydrolysis both in the supernatants and pellets of a centrifugation at 4000 x *g* for 5 min and of an ultracentrifugation at 43 000 x *g* for 1 h. Enzymatic activities in the pellets were less than in the supernatants what its was observed in study using CSF with aseptic and bacterial meningitis. Thus, we chose use the supernatant 1 (S1) due to the best enzymatic activities in this fraction. The maximum ATP and ADP hydrolysis suggest that there is enzymatic activitie in the supernatants (Table 2).

The sodium azide classical mitochondrial ATPase inhibitor was tested for ATP and ADP hydrolysis. Azide inhibited nucleotide hydrolysis at concentrations higher than 10 mM ($p < 0,05$) (Figure 3A). Sodium fluoride inhibited the ATP and ADP hydrolysis at concentrations of 15 mM and 20 mM ($p < 0,05$) (Figure 3B). The $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase inhibitor ouabain, tested at 0.5-3.0 mM, did not affect ATP or ADP hydrolysis. The classical P-type ATPase lanthanum, tested in the concentrations ranging from 0.1 until 0.5 mM was ineffective as an ATPDase hydrolysis. Suramin (30-300 μM) inhibited ATP and ADP hydrolysis and presented a maximal inhibitory effect of 40% at 300 μM (Table 3).

4. Discussion

In our study we observed clearly that there is adenine nucleotides hydrolysis in human CSF like in others tissues. The results of the present study demonstrate that ATP and ADP hydrolysis from human CSF presented a similar response to pH, azide, fluoride, lanthanum, suramin and ouabain those obtained from rat synaptosomes [14]. A distinct response was showed in terms of calcium

concentration required from brain synaptosomes. In general, similar response were observed from ATP and ADP hydrolysis in CSF preparation. This parallelism, in addition to other data, suggest that the same enzyme could participate in the hydrolysis of both ATP and ADP [5, 14].

The ectonucleotidases activity show single kinetic properties on their enzyme activity. They are activated by divalent cations, they show insensibility to P-type, V-type and F-type ATP-ases and they have an alkaline pH [31, 32]. ATP and ADP hydrolysis in CSF was highly active at pH 8.0, showed a linearity of the pH curve in CSF similar to others studies in animals like chicken and rats [14]. In our samples the maximal activity was at pH 8.0, the same pH medium of maximal activity occurred in lymphocytes [30] and zebrafish [33] but a different result obtained in kidney and liver of adult rats which obtained similar curves at pH 6.0, 8.0 and 10.0 [29]. This suggests that in human CSF does exist an NTPDase, what it even had mentioned previously [22].

Through the propose to eliminate associations with another enzymes we used some classical inhibitors of the E-NTPDases. The inhibition of mitochondrial ATPase by sodium azide depends on the μM range of concentrations of this substance. High concentrations of this inhibitor may block the NTPDase1 activity and it also distinguish NTPDase1 from NTPDase2, because the later does not is inhibited by this substance [17]. In this work this inhibitor of mitochondrial ATPase show us that we were working with a NTPDase because the sensibility to it has been generally considered as a criterion in distinguishing the ecto-ATPDases from ecto-ATPases, which have different roles in the physiological responses of different tissues [34]. [35] found enzymatic activity in low concentrations of the sodium azide although had been demonstrated that this inhibitor need high concentrations ($>100 \mu\text{M}$) to work. It is well

known that divalent cations such as Mg^{+2} and Ca^{+2} are essential for nucleotide hydrolysis by all NTPDases surface-located and they are inactive in their absence [23]. In our samples the ATP hydrolysis was linear at 3 mM, 4 mM and 5 mM Ca^{+2} been this the highest activity. Whereas in rat cardiac synaptosomes 2 mM Ca^{+2} was established as optimal condition for measuring the ectonucleotidase activity [36]. [19] affirmed that the presence of Ca^{+2} facilitates nucleotide binding to the catalytic site.

The K_m value was verified varying ATP (100-2000 μM) and ADP (100-2000 μM) concentrations, the enzymatic activity increased up to saturation to obtain V_{max} . The apparent K_m and $V_{m\acute{a}x}$ for ATP ($n=5$, mean \pm S.D.) were 45.8 μM and 6.8 nmol P /min per mg protein, for ADP ($n=5$, mean \pm S.D.) were 28.6 μM and 12.2 nmol P /min per mg protein (Lineweaver–Burk plot).

Ectoenzymes are membrane proteins that have their enzymatically active site outside the plasma membrane, in the extracellular environment, but are also found as soluble forms in biological fluids [37]. Our group working with different fractions of the supernatant and the pellet obtained maximal activity of the enzyme in the supernatants what we can suggest that we were working with soluble ectonucleotidases. This findings already done by [22] in previous studies with rat cerebrospinal fluid.

The results of the present study demonstrate that ATP and ADP hydrolysis from human CSF presented a similar response to pH, azide, fluoride, lanthanum, suramin and ouabain those obtained from rat synaptosomes. A distinct response was showed in terms of calcium concentration required from brain synaptosomes. The presence of enzymatic activity in CSF of healthy patients can represent a protect mechanism in neural environment through the modulation the extracellular nucleotides concentration avoiding the brain tissue against injuries. In this way, this study could

serve to future studies about the role of ectonucleotidase in CSF. More parameters are needed to identify which member of ecto-enzymes family exists in the CSF.

REFERENCES

- [1] H. Zimmermann, Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function *TIPS* 20 (1999) 231-236.
- [2] T.F. Wang, G. Guidotti, Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 790 (1998) 318-322.
- [3] B. Atkinson, K. Dwyer, K. Enjyoji, S.C. Robson, Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol. and Dis.* 26 (2006) 217-222.
- [4] A.J. Marcus, M.J. Broekman; J.H.F. Drosopoulos, N. Islam, D.J. Pinsky, Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1) *J. Thromb. Haemost.* 1 (2003) 2497-2509.
- [5] L. Plesner, Ecto-ATPases: Identities and Functions. *Int. Rev. Citol.* 158 (1995) 141-214.
- [6] R.A. Cunha, Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38 (2001) 107-125.
- [7] M.C. Araujo, J.B.T. Rocha, A. Morsch, R. Zanin, R. Bauchspiess, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients *Bio. Biophys. Acta* 1740 (2005) 421-426.
- [8] T. Noji, A. Karasawa, H. Kusaka, Adenosine uptake inhibitors *European J. Pharmacol.* 495 (2004) 1-16.
- [9] C. Barsotti, P.L. Ipata, Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts *The International J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 2214 – 2225.
- [10] M.J.L. Bours, E.L.R. Swennen, F. Di Virgilio, B.N. Cronstein, P.C. Dagnelie, Adenine 5`-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation *Pharmacol Ther.* 112 (2006) 358-404.
- [11] J.P. Oses, C.M. Cardoso, R.A. Germano, I.B. Kirst, C.R. Furstenau, M.R. Wink, C.D. Bonan, A.M.O. Battastini, J.F. Sarkis, Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum *Life Sci.* 74 (2004) 3275-3284a.

- [12] F. Kukulski, S.A. Lévesque, É.G. Lavoie, J. Lecka, F. Bigonnesse, A.F. Knowles, S.C. Robson, T.L. Kirley, J. Sévigny, Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8 Purin. Sign. 1 (2005) 193-204.
- [13] M.M.F. Duarte, V.L. Loro, J.B.T. Rocha, D.B.R. Leal, A.F. Bem, A. Dorneles, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes FEBS J. 274 (2007) 2707-2714.
- [14] M.R.C. Schetinger, V.L.P. Vieira, V.M. Morsch, D. Balz, ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes Comp. Biochem. Physiol. 128 (2001) 731-741.
- [15] J.P. Oses, R. Leke, L.V. Portela, D.R. Lara, A.P. Schmidt, E.A. Casali, S. Wofchuk, D.O. Souza, J.J.F. Sarkis, Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylentetrazol Brain Res. Bull. 64 (2004) 237-242.
- [16] H. Zimmermann, N. Braun, B. Kegel, P. Heine, New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system Neurochem. Int. 32 (1998) 421-425.
- [17] M.R. Wink, E. Braganhol, A.S.K. Tamajusuku, G. Lenz, L.F. Zerbini, T.A. Libermann, J. Sevigny, A.M.O. Battastini, S.C. Robson, Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant Ectonucleotidase expressed in rat astrocytes Neurosci. 138 (2006) 421-432.
- [18] M.R. Senger, E.P. Rico, R.D. Dias, M.R. Bogo, C.D. Bonan, Ecto-5'- nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*) Comp. Biochem. Physiol. 139 (2004) 203-207.
- [19] W. Chen, G. Guidotti, Soluble Apyrases Release ADP during ATP Hydrolysis Biochem. Biophys. Res. Com. 282 (2001) 90-95.
- [20] A.C. Silva, A.L.B. Morsch, R.F. Zanin, M.C. Correa, L.C. Arantes, M.C. Araújo, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in chronic renal failure: Relationship between hemostatic defects and renal failure severity Biochim. et Biophys. Acta 1741 (2005) 282-288.
- [21] H. Zimmermann, Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature, Drug Dev. Res. 52 (2001) 44-56.
- [22] L.V.C. Portela, J.P. Oses, A.L. Silveira, A.P. Schmidt, D.R. Lara, A.M.O. Battastini, G. Ramirez, L. Vinadé, J.J.F. Sarkis, D.O. Souza, Guanine and adenine nucleotidase activities in rat cerebrospinal fluid Brain Res. 950 (2002) 74-78.

- [23] S.C. Robson, J. Sévigny, H. Zimmermann, The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance *Pur. Sign.* 2 (2006) 409-430.
- [24] X. Sáez-Llorens, G. McCracken Jr, Bacterial meningitis in children *Semin* 361 (2003) 2139-2148.
- [25] K. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for the Ca^{+2} -ATPase activity *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375-380.
- [26] M.M.A. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [27] M.R. Wink, A.S.K. Tamajusuku, E. Braganhol, E.A. Casali, M.L.M. Barreto-Chaves, J.J.F. Sarkis, A.M.O. Battastini, Thyroid hormone upregulates ecto-5'-nucleotidase/CD39 in C6 rat glioma cells *Mol. Cell. End.* 205 (2003) 107-114.
- [28] N. Braun, S. Fengler, C. Ebeling, J. Servos, H. Zimmermann, Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family *Biochem. J.* 351 (2000) 639-647.
- [29] V.P. Vieira, J.B.T. Rocha, F.M. Stefanello, D. Balz, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Heparin and chondroitin sulfate inhibit adenine nucleotide hydrolysis in liver and kidney membrane enriched fractions *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (2001) 1193-1201.
- [30] D.B.R. Leal, C.A. Strher, T.N. Neu, F.P. Bittencourt, C.A.M. Leal, J.E.P. Silva, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1721 (2005) 9-15.
- [31] B. Kegel, N. Braun, P. Heine, C.R. Maliszewski, H. Zimmermann, An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36 (1997) 1189-1200.
- [32] H. Zimmermann, Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49 (1996) 589-618.
- [33] E.P. Rico, M.R. Senger, M.G. Fauth, R.D. Dias, M.R. Bogo, C.D. Bonan, ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 73 (2003) 2071-2082.
- [34] A.F. Knowles, A.K. Nagy, Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur. J. Biochem.* 262 (1999) 349-357.

- [35] L. Savegnago, C.V. Nogueira, R. Fachinetto, J.B.T. Rocha, Characterization of ATP and ADP hydrolysis activity in rat gastric mucosa. *Cell Biol. Int.* 29 (2005) 559-566.
- [36] B. Rucker, M.E. Almeida, T.A. Liebermann, L.F. Zerbini, M.R. Wink, J.J.F. Sarkis, E-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings. *Life Sci.* 82 (2008) 477 – 486.
- [37] J.W. Goding, Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *J. Leukoc. Biol.* 67 (2000) 285-311.
- [38] A.G. Dorneles, C. Menezes, M.M.F. Duarte, R.L. Sperotto, V.L. Loro, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger. Adenine nucleotides hydrolyse of patients with aseptic and bacterial meningitis. *Neurochem. Res.* *In press*, 2007.

Table 1. Calcium dependence of NTPDase (nmol P_i /min per mg protein) from human CSF (n=10).

Ca^{2+} (mM)	ATP	ADP
0.5	17.79 \pm 0.39	13.29 \pm 2.46
1.0	11.46 \pm 1.05	10.59 \pm 1.64
1.5	12.15 \pm 1.7	8.35 \pm 0.3
2.0	6.23 \pm 2.94	7.5 \pm 0.57

Table 2. Distribution of ATP, ADP hydrolysis after human CSF centrifugation (n=10).

Fraction	ATP (nmol P _i / min per mg protein)	ADP (nmol P _i / min per mg protein)
S1	16.5 ± 0.39	10.3 ± 0.46
P1	7.46 ± 1.05	2.59 ± 0.64
S2	10.15 ± 0.72	2.37 ± 0.4
P2	4.23 ± 2.94	1.03 ± 0.47

Table 3. Effects of ouabain (mM), lanthanum (mM) or suramin (μ M) on ATP or ADP hydrolysis from human CSF (n=10). Nucleotide hydrolysis was expressed as nmol P_i / min per mg of protein. ($p < 0,05$)

Ouabain	ATP	ADP
0.0	13.5 \pm 1.2	8.6 \pm 0.6
0.5	12.8 \pm 1.1	8.4 \pm 0.6
1.5	12.7 \pm 0.9	7.7 \pm 1.3
3.0	11.5 \pm 0.75	8.9 \pm 0.6
Lanthanum	ATP	ADP
0.0	12.5 \pm 1.1	7.5 \pm 0.7
0.1	12.8 \pm 0.9	6.8 \pm 0.9
0.2	11.8 \pm 1.1	7.4 \pm 0.6
0.4	11.2 \pm 1.6	8.0 \pm 1.1
Suramin (μ M)	ATP	ADP
30	13.5 \pm 0.8	8.9 \pm 1.3
100	11 \pm 0.4	8.2 \pm 0.6
150	9.2 \pm 0.7	7.4 \pm 1.1
300	8.3 \pm 0.5	4.5 \pm 0.3

FIGURES CAPTIONS

Figure 1. pH dependence on (□) ATP and (Δ) ADP hydrolysis from CSF of 10 patients (n=10). The activity was expressed as nmol Pi/min per mg of protein.

Figure 2. Effect of temperature on □ ATP and Δ ADP hydrolysis from CSF of 10 patients (n=10). The activity was expressed as nmol Pi/min per mg of protein.

Figure 3A. Sodium azide effect on □ ATP and Δ ADP hydrolysis from CSF of 10 patients (n=10). The activity was expressed as nmol Pi/min per mg of protein.

Figure 3B. Sodium fluoride effect on □ ATP and Δ ADP hydrolysis from CSF of 10 patients (n=10). The activity was expressed as nmol Pi/min per mg of protein.

Figure 1.

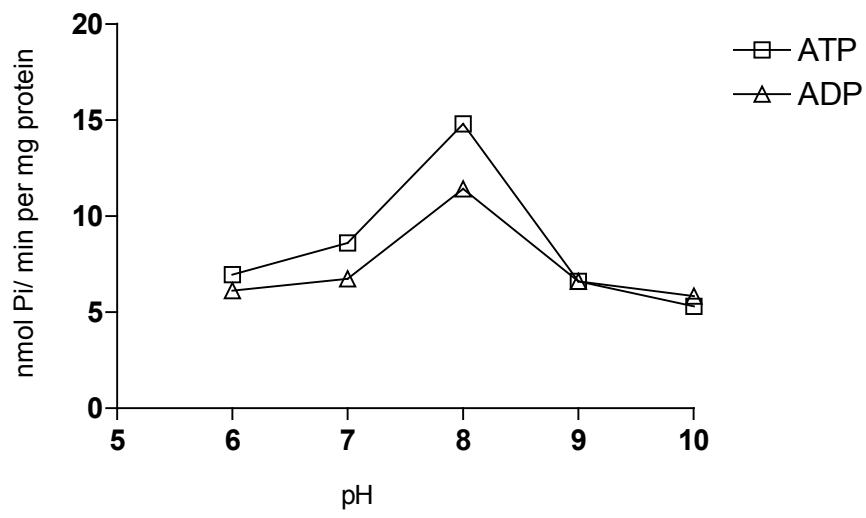


Figure2.

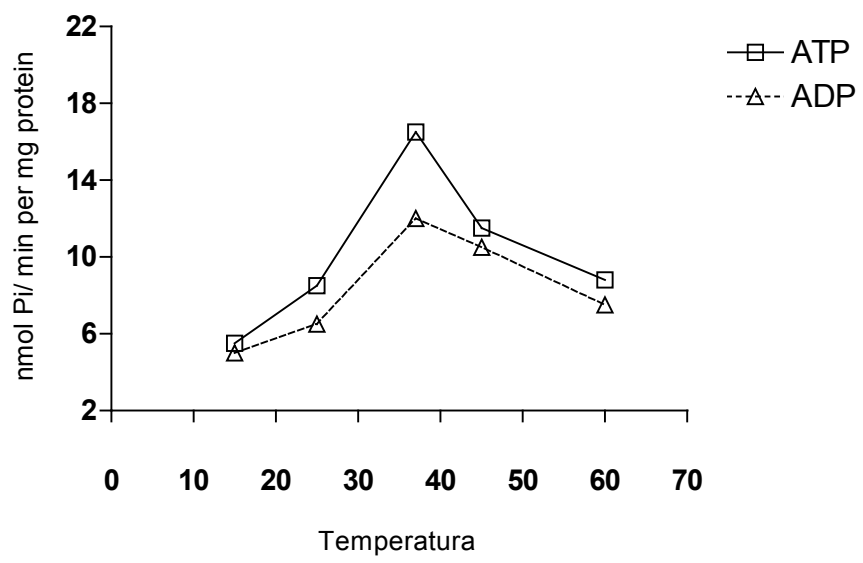


Figure 3A.

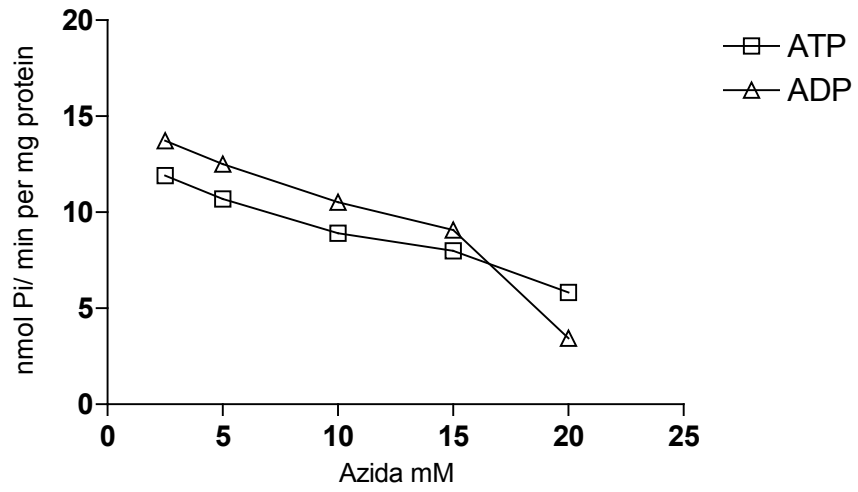
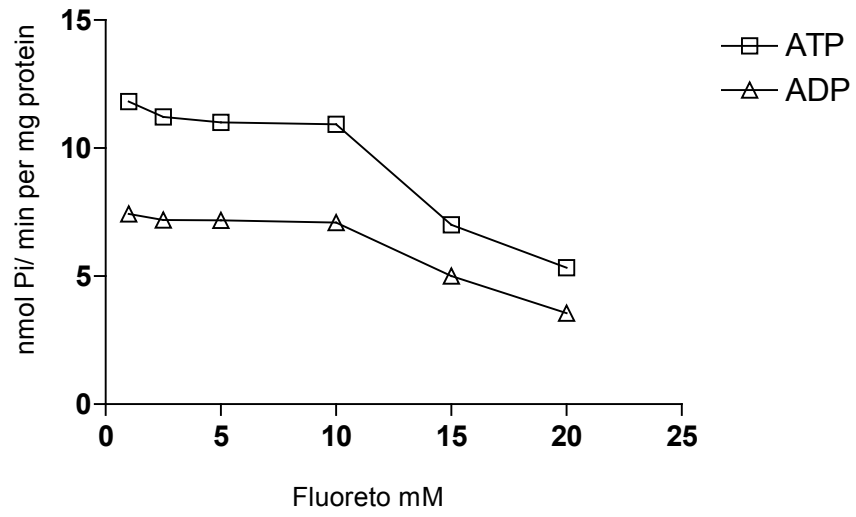


Figure3B



4. DISCUSSÃO

A hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP exercida pelas NTPDases ocorre em variados locais do organismo e em diversas situações fisiológicas ou patológicas (ROBSON *et al.*, 2006). Como exemplo, pode-se citar os pacientes hipercolesterolêmicos onde a hidrólise desses nucleotídeos é aumentada em plaquetas (DUARTE *et al.*, 2007). Já no sistema nervoso, as NTPDases desempenham uma função indireta de neuromodulação (SCHETINGER *et al.*, 2001).

A atividade enzimática aumentada na hidrólise de ATP e ADP já foi detectada em sinaptossomos de ratos em convulsão. Este mecanismo seria explicado sabendo-se que, após a hidrólise total do ATP, há a produção de adenosina, a qual age na neuroproteção contra injúrias ao tecido cerebral (OSES *et al.*, 2004b). Por esse motivo, já foi sugerido que, pela ação exercida pela NTPDase, esta enzima seja utilizada como marcador de lesão cerebral (OSES *et al.*, 2004a).

Em nosso estudo, verificou-se que no líquido humano ocorre hidrólise de ATP e ADP, e esta atividade enzimática pode estar ocorrendo através da mesma enzima. As NTPDases para apresentarem atividade, necessitam de cofatores como a presença de cátions divalentes (Ca^{+2} e Mg^{+2}) (WANG & GUIDOTTI, 1996), os quais facilitam a ligação dos substratos aos seus sítios catalíticos e, na ausência de tais cofatores, a enzima torna-se inativa. Neste estudo com líquido humano, a atividade enzimática mostrou-se linear em concentrações seriadas de Ca^{+2} . Isto aliado ao fato da enzima ter obtido atividade máxima em pH 8,0 e em temperatura de 37°C, características estas que já haviam sido demonstradas em linfócitos humanos (LEAL *et al.*, 2005), nos faz supor que, no líquido cefalorraquidiano de humanos sem processo inflamatório/infeccioso, a NTPDase-1 está presente.

Uma outra propriedade que deve ser citada é a capacidade das NTPDases se manterem ativas mesmo em presença de inibidores como azida sódica e fluoreto de sódio. No líquido, em presença de azida sódica, a hidrólise do ATP e do ADP ocorreu de forma linear, havendo uma diminuição na hidrólise de ambos os nucleotídeos em concentrações altas. Este evento também se repetiu quando foi introduzido no meio de reação o inibidor clássico fluoreto, que pode ser explicado através do fato que o meio de reação continha Ca^{+2} . Durante a reação, a hidrólise dos nucleotídeos ocorreu de forma linear, mas com o aumento das concentrações do inibidor, houve

um decréscimo na atividade de ambos. O inibidor não específico de receptores purinérgicos, o suramin, foi testado e observou-se que a atividade enzimática na hidrólise do ATP e ADP diminuiu, conforme já havia sido citado em outro trabalho utilizando sinaptossomas de hipocampo de ratos (BONAN *et al.*, 1998). Já o inibidor da Na⁺/K⁺ ATPase ouabaína não inibiu a atividade de hidrólise em ambos nucleotídeos, assim como já ocorreu em estudos utilizando mucosa gástrica de ratos (SAVEGNAGO *et al.*, 2005), sinaptossomas (SCHETINGER *et al.*, 2001) e linfócitos (LEAL *et al.*, 2005).

As ectonucleotidases são encontradas na superfície de células, como também na sua forma solúvel presente nos fluídos biológicos. No presente estudo, as melhores atividades foram obtidas no sobrenadante 1 (S1). A dosagem de atividade enzimática nas diferentes frações do sobrenadante e do pellet de líquido sem processo inflamatório/infeccioso também foi maior, assim como ocorreu em estudo que utilizou líquido de pacientes com meningite (DORNELES *et al.*, 2007).

De acordo com a existência de parâmetros como insensibilidade a inibidores clássicos, hidrólise de ATP e ADP em pH 8,0 a 37°C e a especificidade pelo substrato, como foi demonstrado, nos permite sugerir que no líquido cefalorraquidiano de pessoas saudáveis exista NTPDases que se comportam como a NTPDase1. Uma resposta distinta foi obtida em termos da concentração de cálcio requerida para a máxima atividade, a qual foi menor que a obtida em sinaptossomas de ratos (SCHETINGER *et al.*, 2001). A atividade enzimática presente no líquido de pacientes sem processos inflamatórios/infecciosos mostra a necessidade do tecido neural em manter concentrações constantes de nucleotídeos como ATP e ADP, evitando assim que ocorra a hiperexcitação do SNC pela liberação exacerbada de ATP, assim como também a hidrólise do ADP impede a formação de trombos na microcirculação cerebral e, por fim, a formação do nucleosídeo adenosina promove a neuroproteção contra possíveis injúrias ao SNC. Isso faz com que mais estudos sejam feitos a fim de realmente especificar a classe das ecto-NTPDases que estão presentes no líquido.

5. CONCLUSÕES

- No líquido cefalorraquidiano de pacientes sem patologias inflamatórias ocorreu a hidrólise de ATP e ADP.
- A enzima presente no líquido de pacientes sem processos infecciosos/inflamatórios foi pré-caracterizada através de variados parâmetros e parece tratar-se de uma ecto NTPDase.
- Os parâmetros obtidos como melhor temperatura, pH e sensibilidade a inibidores são semelhantes aqueles obtidos em sinaptossomas de cérebro de ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARSOTTI, C.; PIERO, I. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, p. 2214-2225, 2004.
- BONAN, C. et al. Effects of suramin on hippocampal apyrase activity and inhibitory avoidance learning of rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.63, p.153-158, 1998.
- BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 358-404, 2006.
- CHEN, W.; GUIDOTTI, G. Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 90-95, 2001.
- CUNHA, R. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in nervous system: different routes, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v.38, p. 107-125, 2001.
- DI TERLIZZI, R.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part I – functions and composition. **The Veterinary Journal**, v. 172 p. 422-431, 2005.
- DORNELES, A. G. et al. Adenine nucleotide hydrolysis in patients with aseptic and bacterial meningitis. **Neurochemical Research**, *in press*, 2008.
- DUARTE, M. M. F. et al. Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS Journal**, v. 274, p. 2707-2714, 2007.
- FISONE, G. et al. Na⁺ K⁺ ATPase in choroid plexus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 6, 1995.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 660 p.

JAMES, G.; BUTT, A. M. Adenosine 5' triphosphate evoked mobilization of intracellular calcium in central nervous system white matter of adult mouse optic nerve. **Neuroscience**, v. 268, p. 53-56, 1999.

JOHNSTON, M.; PAPAICONOMOU, C. Cerebrospinal fluid transport: a lymphatic perspective. **News Physiology Science**, v. 17, p. 227-230, 2002.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD39/ vascular ATP diphosphohydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33116-33122, 1996.

KEGEL, B. et al. An ecto-ATPase and an ecto ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 1189-1200, 1997.

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

KUKULSKY, F.; SÉVIGNY, J.; KOMOSZINKY, M. Comparative hydrolysis of extracellular nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, cerebellum, hippocampus and medulla oblongata. **Brain Research**. v.1030, p. 49-56, 2004.

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

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C.3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9-15, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839 p.

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

LYTTLE, J. D.; HEARN, J. E. A comparison of the Folin-Wu and the new Benedict method for sugar in blood and cerebrospinal fluid. **The Journal of Biological Chemistry**, 1926.

MATOS, J. A. A. et al. Characterization of Na⁺ ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 770-775, 2001.

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

MARTIN-SATUÉ, M. et al. Cloning molecular characterization and expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 from *Torpedo* electric organ. **Neurochemistry International**, v. 50, p. 256-263, 2007.

MOODY, D. M. The blood brain barrier and blood cerebrospinal fluid barrier. **Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia**, v. 10, p. 128, 2006.

NEDELJKOVIC, N. et al. Developmental profile of NTPDase activity in synaptic plasma membranes isolated from rat cerebral cortex. **International Journal of Development in Neuroscience**, v. 23, p. 45-51, 2005.

NOJI, T.; KARASAWA, A.; KUSAKA, H. Adenosine uptake inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, v. 495, p. 1-16, 2004.

OSES, J. P. et al. Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylenetetrazol. **Brain Research Bulletin**, v. 64, p. 237-242, 2004 a.

OSES, J. P. et al. Soluble NTPDases: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Life Sciences**, v. 74, p. 3275- 3284, 2004 b.

PINCUS J. B.; KRAMER, B. Comparative study of the concentration of various anions and cations in cerebrospinal fluid and serum. **The Journal of Biological Chemistry**, 1923.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **International Review of Cytology**, v. 158, p. 141-214, 1995.

POPLE, I. K. Hydrocephalus and shunts: what the neurologist should know. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 73, p. 17-22, 2002.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico – aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997

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

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

SAVEGNAGO, L. et al. Characterization of ATP and ADP hydrolysis activity in rat gastric mucosa. **Cell Biology International**, v. 29, p. 559-566, 2005.

SCHETINGER, M. R. C. et al. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology part B**, v. 128, p. 731-741, 2001.

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

TORRES, I. L. S. et al. Chronic stress effects adenina nucleotide hydrolysis in the blood, serum and brain structures of rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 74, p. 181-186, 2002.

WALKER, A. M. Comparison of the chemical composition of aqueous humor, cerebrospinal fluid, lymph and blood from frogs, higher animals and man. **The Journal of Biological Chemistry**, 1933.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an Ecto-(Ca⁺², Mg⁺²)- apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 9898- 9901, 1996.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. **Brain Research**, v. 790, p. 318-322, 1998.

WATSON, M. A.; SCOTT, M. G. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. **Clinical Chemistry**, v. 41/3, p. 343-360, 1995.

ZIMMERMANN, H. et al. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**, v. 32, p. 421-425, 1998.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for functions. **TIPS Journal**, v. 20, p. 231-236, 1999.

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

ANEXOS

Anexo A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo um projeto de pesquisa intitulado: **CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA NTPDase (CD39) E 5'-NUCLEOTIDASE EM LÍQUOR HUMANO**, através da mestrandia Rita Leal Sperotto, orientada pela Prof^a Dr^a Vânia Lucia Loro, que tem como objetivo verificar a ocorrência de hidrólise de nucleotídeos da adenina no líquido de pacientes sem doença inflamatória do SNC detectada. Levando-se em conta que é de grande importância a caracterização da NTPDase e da 5'-nucleotidase no líquido oriundo de processos patológicos no SNC, para que, futuramente, essa seja um incremento no diagnóstico de patologias.

Os voluntários participantes da pesquisa permitiram a utilização do líquido que sobraram de exames solicitados por seus médicos. Todo o material utilizado para a coleta será descartável e/ou desinfetado. Este estudo não envolve risco adicional de vida aos pacientes. As amostras serão tratadas de acordo com os protocolos experimentais estabelecidos. Fica garantido que os dados coletados ficarão sob responsabilidade de pesquisador e que os mesmos serão utilizados apenas para fins científicos, sem que o paciente seja identificado, garantindo assim o anonimato.

A participação neste estudo é livre e voluntária, sendo que não haverá nenhuma forma de compensação financeira ou custos para o participante. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo ou comprometimento dos cuidados de saúde dos pacientes. Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que estou de acordo em participar deste projeto de pesquisa, livre de qualquer constrangimento, pois fui informado de forma clara e detalhada dos objetivos e dos procedimentos que serão realizados. Fui igualmente informado da garantia de receber respostas a qualquer dúvida que ainda puder ter sobre assuntos relacionados com a pesquisa, e da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízo de qualquer ordem.

