



UFSM

Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE DA ENZIMA NTPDase1 EM LINFÓCITOS DE
PACIENTES EM TRATAMENTO PARA LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA): ALTERAÇÃO NA HIDRÓLISE
DO ATP E ADP EXTRACELULARES**

André Luis Bittencourt Morsch

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**ATIVIDADE DA ENZIMA NTPDase1 EM LINFÓCITOS DE
PACIENTES EM TRATAMENTO PARA LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA): ALTERAÇÃO NA HIDRÓLISE
DO ATP E ADP EXTRACELULARES**

por

André Luis Bittencourt Morsch

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

PPGBT

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2006

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

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE DA ENZIMA NTPDase1 EM LINFÓCITOS DE
PACIENTES EM TRATAMENTO PARA LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA): ALTERAÇÃO NA
HIDRÓLISE DO ATP E ADP EXTRACELULARES**

Elaborada por André Luis Bittencourt Morsch
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Dra. Carla Bonan

Dra. Dominguita Lühers Graça

Santa Maria, 25 de agosto de 2006

“Conhece-te a ti mesmo”...

“Encara teus demônios internos”...

Encerra todos teus males dentro da tua “Caixa de Pandora”...

...

Até lá, nossos males e demônios nos imporão obstáculos...

...

Somos nós que fazemos o mundo e a ciência...

Como compreendê-los enquanto não nos compreendermos?

(Autor desconhecido)

**Essa dissertação é dedicada aos meus maiores
mestres e incentivadores: Carlos e Angela Morsch**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse possível e se concretizasse. Agradeço também aqueles que porventura impuseram dificuldades, pois isso me tornou ainda mais perseverante na realização dessa conquista.

Aos meus pais, Carlos Eduardo e Angela Morsch pelo incessante apoio e esforço em todos os momentos da minha vida. Essa foi “*apenas*” uma das etapas que vocês foram fundamentais. Muitas ainda estão por vir e sei que sempre posso contar com vocês!!!

A minha orientadora, Maria Rosa, por todos esses anos de aprendizado e oportunidades. Agradeço também a minha tia, Vera Morsch, que participou dessa trajetória. Obrigado por terem aberto as portas da bioquímica e , conseqüentemente, da pesquisa para mim.

A todos os colegas, ou melhor, aos amigos do laboratório 2208, pelas horas de trabalho e também de muita descontração. Rafael, Gilberto, Drika, Vinícius, Paula, Maísa, Ahmed... Sem esquecer do *grande amigo* “Verde de Malaquita”!!!

Um agradecimento muito especial a duas grandes amigas e colegas que foram fundamentais para a realização desse trabalho: Maria do Carmo e Vanessa Battisti.

Sou também muito grato aos amigos dos laboratórios de hematologia-oncologia e HLA do HUSM (Rita, Liliane, Alice, Iria, Cláudia, Valúcia...).

Meus sinceros agradecimentos e homenagem às crianças com LLA que participaram desse estudo. O maior aprendizado que fica é a força e vontade de viver que emana dessas crianças. Sem dúvida, exemplos a serem seguidos.

Agradecimentos	vi
Índice	vii
Lista de abreviaturas.....	x
Lista de figuras e tabelas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
I. Introdução	1
II. Objetivos.....	6
III. Revisão bibliográfica.....	8
III.1. Linfócitos.....	9
III.1.A. Origem e diferenciação.....	9
III.1.B. Subpopulações de linfócitos e funções.....	10
III.2 Nucleotídeos.....	11
III.3 NTPDase1.....	12
III.4 Receptores purinérgicos.....	15
III.5. Leucemia linfoblástica aguda.....	16
III.5.A. Diagnóstico e estadiamento.....	18
III.5.B. Prognóstico e tratamento	18
III.5.C. Etiopatologia.....	19

IV. Artigo.....	21
IV. Abstract.....	23
IV.1 Introduction.....	24
IV.2 Materials and methods.....	26
IV.2.1 Materials.....	26
IV.2.2 Patients.....	27
IV.2.3 Isolation of the cells.....	28
IV.2.4 NTPDase1 determination.....	28
IV.2.5 Protein determination.....	29
IV.2.6 Immunophenotyping.....	29
IV.2.7 Statistical analysis.....	30
IV.3 Results.....	30
IV.3.1 Sample and viability.....	30
IV.3.2 Influence of the ALL treatment and out-of-treatment phases on lymphocyte ATP and ADP hydrolysis.....	30
IV.3.3 Influence of the recurrence risk classification to lymphocyte ATP and ADP hydrolysis in the groups studied.....	31
IV.3.4 Influence of the length of maintenance phase of treatment on lymphocyte ATP and ADP hydrolysis.....	31
IV.4 Discussion.....	32
IV.5 Acknowledgement.....	35
IV.6 References.....	35
V. Discussão.....	46
VI. Conclusão.....	51

VII. Referências bibliográficas.....	53
VIII. Anexos.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS:

ACR - Região conservada da apirase

ADP - Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

AR- Alto risco

ATP- Adenosina trifosfato

CD- Grupo de diferenciação

FT- Fora de tratamento

GBTLI- Grupo brasileiro de tratamento da leucemia infantil

HLA- Antígeno leucocitário humano

IL - 2 - Interleucina-2

IL - 4 - Interleucina-4

IL - 5 - Interleucina-5

INF - γ - Interferon - γ

IR- Indução da remissão

LLA - Leucemia linfocítica aguda

MR- Manutenção da remissão

NDP- Nucleotídeo difosfato

NMP- Nucleotídeo monofosfato

NTP- Nucleotídeo trifosfato

NTPDase1- Nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase 1

Pi - Fosfato inorgânico

RB- Risco baixo

SNC- Sistema nervoso central

SNK- Student-Newman-Keuls

Th1 – Linfócito CD4+ T helper 1

Th2 - Linfócito CD4+ T helper 2

UTP - Uridina trifosfato

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:

Tabela 1- III.5.C Esquema das fases de tratamento da LLA (GBTLI-99).....	20
Table 1- IV.3.1 Immunophenotyping profile of the ALL patients.....	41
Figura 1- III.3 Ecto-ATPases.....	14
Figure 1- IV.3.2 NTPDase1 activity on ATP and ADP hydrolysis in peripheral lymphocytes of ALL patients under treatment	42
Figure 2- IV.3.3 NTPDase1 activity on ATP and ADP hydrolysis in peripheral lymphocytes from HR and LR patients in the groups studied	43
Figure 3- IV.3.4 NTPDase1 activity on ATP and ADP hydrolysis in peripheral lymphocytes of patients under maintenance therapy	44
Legend of figures	45

Título: Atividade da enzima NTPDase1 em linfócitos de pacientes em tratamento para leucemia linfoblástica aguda (LLA): alteração na hidrólise do ATP e ADP extracelulares.

Aluno: André Luis Bittencourt Morsch

Orientador: Maria Rosa Chitolina Schetinger

RESUMO:

A atividade da enzima NTPDase1 (E.C. 3.6.1.5, CD39, apirase, ecto-ATP-difosfohidrolase), a qual hidrolisa os nucleotídeos ATP e ADP, foi verificada em linfócitos de 56 pacientes em tratamento para leucemia linfocítica aguda (LLA) e em 33 indivíduos controle. Os pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com a fase do tratamento: indução da remissão (IR), manutenção da remissão (MR) e fora-de-tratamento (FT), sendo que para cada grupo foi também verificada a influência do risco de recaída da doença (alto ou baixo) na atividade da enzima. O grupo MR foi ainda subdividido em três, de acordo com o período nesta fase: 0-30, 31-60 e 61-84 semanas em tratamento.

Os resultados demonstraram que a hidrólise do ATP pela NTPDase1 está alterada nos 3 grupos estudados ($F(3, 84)=100.34$; $p<0.01$) em relação ao grupo controle, sendo que houve uma redução nas fases IR e MR, enquanto houve um aumento da hidrólise na fase FT. Não houve influência do prognóstico (grau de risco) na alteração da atividade da enzima em nenhum dos grupos estudados. Encontrou-se ainda uma variação na hidrólise do ATP pela enzima NTPDase1 durante a fase MR ($F(2, 17)=11.22$; $p=0.01$), sendo maior durante o período de 0-30 semanas de tratamento, e reduzida após.

A atividade da NTPDase1 na hidrólise do ADP também se encontrou significativamente reduzida nas fases IR e MR, porém semelhante aos controles na fase FT ($F(3, 69)=59.05$; $p<0.01$). Também não foi verificada correlação entre a atividade da enzima, tendo ADP como substrato, e o prognóstico da LLA. Além disso, a atividade da NTPDase1 para o ADP se manteve constante durante a fase MR ($F(2, 13)=2.40$; $p=0.130$).

A alteração na hidrólise do ATP e ADP em linfócitos de pacientes com LLA, como nossos resultados indicam, está de acordo com algumas das características encontradas durante o tratamento dessa patologia. Dessa forma, nossos resultados corroboram o papel dos nucleotídeos da adenina, em especial o ATP, no sistema imune como moléculas sinalizadoras, bem como a importância da enzima NTPDase1 para a manutenção dos níveis extracelulares desses nucleotídeos. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreender o papel dos nucleotídeos da adenina e da NTPDase1 na imunodeficiência e citotoxicidade induzidos pelo tratamento da LLA.

Palavras chave: NTPDase1; Linfócitos; ATP; ADP; Leucemia Linfoblástica Aguda; Tratamento.

Title: NTPDase1 activity in lymphocytes from patients under treatment for acute lymphoblastic leukemia (ALL): an alteration in the extracellular ATP and ADP hydrolysis

Student: André Luis Bittencourt Morsch

Adviser: Maria Rosa Chitolina Schetinger

ABSTRACT:

The NTPDase1 (E.C. 3.6.1.5, apyrase, CD39, ecto-ATP-diphosphohydrolase) enzymatic activity, which is responsible for hydrolyzing ATP and ADP nucleotides, was verified in lymphocytes from 56 patients under treatment for acute lymphoblastic leukemia (ALL) and from 33 healthy subjects. Patients were divided into 3 groups: remission induction (RI), remission maintenance (RM) and out-of-treatment (OT). It had been verified, in each group, the influence of the recurrence risk (high or low) on the enzymatic activity. The RM group was then subdivided by the amount of time they had been in remission maintenance (0-30, 31-60 and 61-84 weeks). Results demonstrated that the ATP hydrolysis from lymphocyte NTPDase1 is altered in the groups studied ($F(3,84)=100.34$; $p<0.01$) in relation to the controls, and that it is reduced in both RI and RM groups, while enhanced in OT group. The recurrence risk did not influence ATP hydrolysis in none of the groups. Furthermore, it has been found a significant variation at the NTPDase1 activity to ATP hydrolysis during RM phase ($F(2,17)=11.22$; $p=0.01$), being higher in the first 30 weeks, and subsequently reduced.

ADP hydrolysis by NTPDase1 activity was also significantly reduced in both the RI and RM groups, but similar to the controls in OT ($F(3,69)=59.05$; $p<0.01$). It has not been verified any influence of the recurrence risk on ADP hydrolysis.

Furhermore, NTPDase1 using ADP as substrate has shown to be constant during RM phase ($F(2,13)=2.40$; $p=0.130$).

The alteration on ATP and ADP hydrolysis on lymphocytes of ALL patients is in agreement to the characteristics found in this pathology. Thus, our results corroborate the role of adenine nucleotides, ATP in special, in the immune system, as signaling molecules, and the importance of the NTPDase1 to maintain constant the extracellular levels of these nucleotides. However, more studies are necessary to better understand the role of adenine nucleotides and NTPDase1 in the immunodeficiency and citotoxicity observed in treated ALL patients.

Keywords: NTPDase1; Lymphocytes; ATP; ADP; Acute Lymphoblastic Leukemia; Treatment.

I. INTRODUÇÃO

O sistema imune é um conjunto de células e fatores humorais. Os linfócitos são umas das principais células deste sistema, sendo responsáveis pelo reconhecimento e destruição de antígenos não-próprios (Adam et al., 2003).

Os linfócitos são originários de células indiferenciadas da medula óssea, passando por poucas fases intermediárias até a célula madura. Estas são encontradas no sangue circulante em porcentagens que podem variar de acordo com a idade e o sexo. Em situações patológicas, esse número também pode sofrer alterações como em estímulos antigênicos, proliferações benignas e malignas (Lorenzi, 2003). Existem três subpopulações principais de linfócitos: os tipos T, B e NK. Os linfócitos do tipo T podem ser diferenciados em duas subclasses: linfócitos T citotóxicos (CD8), que atacam e eliminam células infectadas, e linfócitos T helper (CD4), que ativam outras células coordenando o sistema imune. Já os linfócitos B são células que podem ser ativadas em sua forma plasmocitóide quando em contato com antígenos específicos, secretando anticorpos contra estes (Janeway et al., 2002).

Dentre os mediadores capazes de modular as ações dos linfócitos destacam-se os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina. Em especial, o ATP extracelular é capaz de regular as interações célula-célula, sendo importante nos processos de ativação, diferenciação, desenvolvimento, proliferação, morte celular e respostas efetoras dos linfócitos (Redegeld et al., 1997; Burnstock, 2002; Di Virgilio, 2000).

O ATP extracelular é ainda citado como um dos responsáveis pelos efeitos citolíticos dos linfócitos T citotóxicos, uma vez que estes podem liberar grandes quantidades de ATP frente a um estímulo antigênico. Entretanto, essas células apresentam mecanismos que degradam o ATP extracelular, responsáveis pela proteção celular contra as ações citotóxicas do próprio ATP liberado (Filippini et al., 1990 a). Além disso, linfócitos dos tipos B e T possuem atividades ADPase e AMPase extracelulares (Barankiewicz et al., 1988) .

Os papéis do ADP e do AMP em linfócitos permanecem desconhecidos. Entretanto, estes nucleotídeos representam uma importante fonte extracelular de adenosina, que é um agente imunossupressor, pois exerce um efeito tóxico no desenvolvimento dos linfócitos e também inibe a ativação destes frente a um antígeno (Resta et al., 1997; Spsychala, 2000). A ação do ADP está bem caracterizada nas plaquetas, uma vez que esse é um importante mediador da agregação plaquetária e da tromboregulação (Zimmermann, 1999).

As ações promovidas por esses nucleotídeos são mediadas através de uma classe de receptores de membrana conhecidos como receptores purinérgicos (Di Virgilio et al., 2001). Eles se encontram amplamente distribuídos nas células sanguíneas, sendo que os receptores do tipo P2 (ATP) têm sido identificados como componentes chave na cadeia de eventos que leva à ativação do sistema imune (Di Virgilio et al., 2001).

Uma vez que os nucleotídeos extracelulares representam uma importante via de modulação da atividade dos linfócitos, é indispensável a

presença de um mecanismo enzimático capaz de manter constante a concentração desses no espaço extracelular. A enzima NTPDase1 (EC 3.6.1.5, nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, CD39) é uma proteína transmembrana que catalisa a hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP e ADP até adenosina monofosfato (AMP), sendo, portanto, uma enzima da família das ectonucleotidasas (E-NTPDases) (Zimmermann et al., 1998; 2001). Por estar amplamente distribuída nas células sanguíneas (como plaquetas, leucócitos e células endoteliais) essa ectonucleotidase participa de importantes interações celulares, agindo, por exemplo, na agregação plaquetária e em processos inflamatórios e imunes (Pilla et al., 1996; Koziak et al., 1999; Zimmermann, 2001). A atividade da NTPDase1 em linfócitos foi caracterizada em nosso laboratório por Leal et al. (2005 a). Esta enzima tem sido reportada como um marcador de ativação necessário para a função efetora dos linfócitos, participando também dos processos de reconhecimento do antígeno (Dombrowski et al., 1998).

Nos tumores malignos, incluindo as leucemias, o balanço entre os processos de proliferação e apoptose está desregulado (Schuler & Szende, 2004). Além disso, é bastante comum um quadro de infecções recorrentes em pacientes leucêmicos antes, durante e após o tratamento com quimioterápicos (Zhang et al., 1997; Mazur et al., 2006). Estes achados nos levaram a pensar na possibilidade de uma alteração no metabolismo extracelular dos nucleotídeos da adenina, em especial do ATP, nos linfócitos desses pacientes.

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é uma doença maligna de células linfóides, caracterizada por um acúmulo de linfoblastos (células indiferenciadas) em detrimento de linfócitos maduros no sangue periférico, medula óssea, timo e linfonodos. As LLA podem ser dos tipos B e T, sendo as primeiras mais comuns. Nota-se uma maior frequência na infância e na adolescência, principalmente entre 2-18 anos (70%) (Lorenzi, 2003). De acordo com o Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI LLA-99), os pacientes são classificados como sendo de alto ou baixo risco de recaída, a partir dos achados clínico-laboratoriais. O tratamento e acompanhamento desses pacientes se dão em três fases: indução, manutenção e acompanhamento pós-tratamento. Nas duas primeiras fases é instituída uma abordagem quimioterápica específica, de acordo com o protocolo do GBTLI LLA-99, e na terceira fase os pacientes são acompanhados por um período que muitas vezes chega até a vida adulta, a fim de excluir uma possível recidiva da doença.

Assim sendo, o estudo da enzima NTPDase1 em linfócitos de pacientes em tratamento para LLA pode vir a colaborar para um melhor entendimento dessa patologia, tendo em vista a importância do metabolismo do ATP para o sistema imune, bem como para a manutenção da integridade celular e homeostase do organismo.

II. OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivos:

1. Avaliar a atividade da enzima NTPDase1, que degrada os nucleotídeos ATP e ADP até AMP, em linfócitos de pacientes em tratamento para leucemia linfoblástica aguda (LLA);
2. Verificar uma possível correlação entre o prognóstico (grau de risco de recaída) e a fase do tratamento da LLA sobre a enzima NTPDase1 dos linfócitos desses pacientes;
3. Verificar a influência do tempo, em semanas, de tratamento para LLA na fase de manutenção da remissão sobre a atividade da enzima NTPDase1 de linfócitos.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. LINFÓCITOS

São leucócitos do tipo agranulócitos presentes no sangue em quantidades que variam em condições fisiológicas (como idade e sexo) e patológicas (como proliferações malignas e benignas). Correspondem à cerca de 30% das células circulantes do sangue e são as principais células envolvidas no reconhecimento e destruição de antígenos não-próprios ou prejudiciais ao organismo (Lorenzi, 2003).

III.1.A. Origem e diferenciação

Todas as células sangüíneas são originadas na medula óssea a partir de um único precursor hematopoético comum (*Stem cell*, ou célula indiferenciada pluripotente). Até chegar a linfócito adulto os precursores passam por estágios intermediários, como linfoblastos e pró-linfócitos, sendo essa diferenciação um processo regulado de maneira complexa e dependente de fatores de crescimento e diferenciação específicos para cada linhagem linfocitária (Zhu & Emerson, 2002; Blom & Spits, 2006). Muitos dos genes que codificam estes fatores estão desregulados nas leucemias (Lécuyer & Hoang, 2004).

Após a diferenciação, os linfócitos sofrem o processo de maturação final, que pode ocorrer na própria medula óssea ou em outro tecido. As células maduras, de acordo com seu papel fisiológico, podem ser classificadas como linfócitos T, que sofrem maturação no timo; linfócitos B e linfócitos *natural*

killers (NK) as quais, no homem, sofrem maturação na medula óssea (Blom & Spits, 2006; Lécuyer & Hoang, 2004).

III.1.B. Subpopulações de linfócitos e funções

Linfócitos T

Encarregados da imunidade mediada por células, atuam em sincronia com os linfócitos B, possuindo funções efetoras e reguladoras da resposta imune. São subdivididos em linfócitos T citotóxicos (CD8+) que, quando ativados, atuam eliminando células infectadas e em linfócitos T *helper* (CD4+), que atuam secretando citocinas reguladoras do sistema imune. As células CD4+ podem ainda ser dos tipos Th1 e Th2, tendo por base o tipo de citocinas que produzem: as células Th1 secretam IL-2, responsável pela ativação de células CD4+ e CD8+, e INF- γ , que ativa macrófagos; já as Th2 secretam IL-4 e IL-5 que induzem a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B (Adam et al., 2003).

Linfócitos B

Encarregados da imunidade humoral, são células que, quando ativadas pelos linfócitos CD4+ (Th2), produzem anticorpos (imunoglobulinas) contra antígenos específicos, ou transformam-se em células de memória, capazes de reconhecer especificamente o antígeno agressor, caso haja uma posterior exposição a esse (Adam et al., 2003).

Linfócitos NK

São células com grande poder citotóxico contra células tumorais ou outras células infectadas por vírus, atuando sobre elas de modo rápido e sem necessidade de imunização prévia (Vivier, 2006).

III.2. Nucleotídeos

Os nucleotídeos extracelulares possuem importantes papéis como moléculas sinalizadoras, tendo sido bem estabelecidos para diversos tecidos, incluindo o sistema cardiovascular, no qual medeiam efeitos inflamatórios, antiinflamatórios e na agregação plaquetária (Yegutkin et al., 2002).

O ATP, quando secretado para o meio extracelular por células como plaquetas e linfócitos, é capaz de mediar a resposta imune, uma vez que induz a secreção de importantes mediadores tais como interferon- γ e IL-2 por parte dos linfócitos T (Langston et al., 2003; Di Virgilio et al., 2001 a). Além de modular os processos de ativação, diferenciação, desenvolvimento e respostas efetoras dos linfócitos, o ATP, dependendo das concentrações extracelulares, ainda é capaz de induzir dois efeitos antagônicos: proliferação celular, quando em baixas concentrações, e morte celular, quando em altas concentrações (Di Virgilio, 2000).

O ADP não possui um papel definido em linfócitos (Luthje, 1989). Entretanto, esse nucleotídeo é um importante estimulante da agregação plaquetária, ativando e recrutando essas para o sítio da injúria tecidual (Marcus et al., 2003). Sabe-se que as plaquetas, quando ativadas, secretam o conteúdo de suas vesículas, sendo o ATP um desses componentes liberados para o

meio extracelular (Pilla et al., 1996; Di Virgilio et al., 2001 a). Este ATP secretado pelas plaquetas, por sua vez, seria capaz de influenciar o sistema imune. Dessa forma, o ADP, de maneira indireta, poderia também modular a ação dos linfócitos.

Em condições fisiológicas, os nucleotídeos estão presentes no meio extracelular em baixas concentrações, normalmente em quantidades nanomolares, podendo chegar até quantidades micromolares em determinadas situações (Di Virgilio, 2005). Estas quantidades são influenciadas por vários fatores, tais como: secreção e/ou lise celulares, efeito da diluição no espaço extracelular e ação catalítica de enzimas do tipo E-NTPDases (ectonucleotidases) (Malmsjo et al., 2000).

III.3. NTPDase1 (ATP difosfohidrolase, EC. 3.6.1.5, apirase, CD39)

E-NTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) é o termo genérico para designar uma família de enzimas presentes na membrana plasmática de diversos tecidos, que catalisam a hidrólise de nucleotídeos di (NDP) e trifosfatos (NTP), com diferentes graus de preferência por um tipo individual, até suas formas monofosfato (NMP) (Zimmermann, 2001). Essas reações podem ser representadas segundo o esquema abaixo:



Subseqüentemente, este NMP é convertido até adenosina pela ação da enzima ecto-5'-nucleotidase (EC. 3.1.3.3.5, CD73), representada na figura 1 (Sarkis et al., 1995; Pilla et al., 1996; Zimmermann, 2001).

Atualmente, a família das E-NTPDases é composta por 8 membros. Embora possam ser divididos em grupos, de acordo com suas características topográficas, todos os membros apresentam no mínimo cinco regiões conservadas de apirase (ACR), os quais estão envolvidos na atividade catalítica da enzima e/ou integridade estrutural das E-NTPDases (Zimmermann, 2001).

O primeiro grupo reúne as E-NTPDases que apresentam 2 domínios hidrofóbicos transmembrana e as porções amino e carbóxi-terminais voltadas para o meio intracelular, sendo composto pelas NTPDases 1 a 4, enquanto que o segundo grupo, composto pelas NTPDases 5 e 6, caracteriza-se por apresentar apenas um domínio hidrofóbico transmembrana e a porção carbóxi-terminal voltada para o meio extracelular (Figura 1).

Já as NTPDases 7 e 8, foram apenas recentemente clonadas e caracterizadas em mamíferos, sendo que a NTPDase 7 ainda não possui um estudo topográfico de membrana (Zimmermann, 2001). A NTPDase 8 apresenta uma grande homologia com o primeiro grupo, possuindo dois domínios transmembrana e as porções amino e carbóxi-terminais voltadas para o meio intracelular (Bigonnesse et al., 2004).

Além das diferenças topológicas, estas enzimas apresentam uma outra importante diferença: a afinidade por um ou outro nucleotídeo di ou trifosfatado (Zimmermann, 2001).

A NTPDase1, foco de estudo do presente trabalho, é uma enzima que degrada ADP e ATP em iguais proporções (1:1). Esta enzima, alvo de diversos estudos, tem sido descrita em vários tecidos como em vegetais (Valenzuela et al., 1989; Anich et al., 1990), invertebrados (Vasconcelos et al., 1993), protozoários (Matos et al., 2001), peixes (Rico et al., 2003), além de vários tecidos de mamíferos, como córtex cerebral (Battastini et al., 1991; Schetinger et al., 2001), útero e glândulas mamárias (Valenzuela et al., 1989), plaquetas de ratos e humanos (Frasseto et al., 1995; Pilla et al., 1996; Lunkes et al., 2003), células endoteliais (Koziak et al., 1999) e linfócitos humanos (Plesner, 1995; Leal et al., 2005 a).

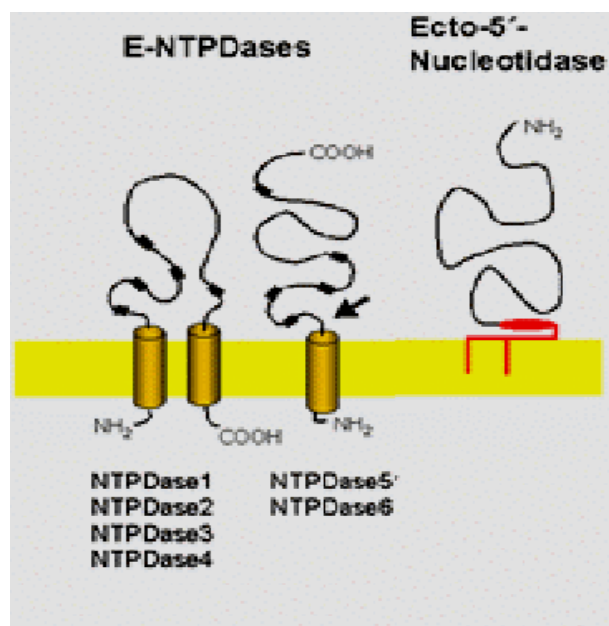


Figura 1. Ecto-ATPases. adaptado de Zimmermann, 2001.

Nas últimas décadas, tem-se destacado o papel desta enzima em vários eventos celulares, sendo importante em processos fisiológicos tais como a neurotransmissão (Edwards et al., 1992), a tromboregulação, a cárdio e cerebroproteção (Marcus et al., 2003). Ela desempenha ainda uma importante função na sinalização purinérgica, participando na transdução de sinais intercelulares (Sarkis et al., 1995; Yagi et al., 1992) e desempenhando funções imunes e inflamatórias (Dombrowski et al., 1995; Zimmermann 2001; Langston et al., 2003).

Nosso grupo tem encontrado uma alteração na atividade dessa enzima em diversas patologias, através da sua análise em plaquetas de ratos diabéticos (Lunkes et al., 2003), plaquetas de pacientes com câncer de mama (Araújo et al., 2004), câncer de próstata (Morsch et al., 2006) e insuficiência renal crônica (Da Silva et., 2005); e linfócitos de pacientes HIV+ (Leal et al., 2005 b).

III.4. Receptores purinérgicos

Após serem liberados do citoplasma de vários tipos celulares, os nucleotídeos podem interagir com receptores específicos da membrana plasmática, os receptores P2, antes de sofrerem a ação das ectonucleotidasas (Di Virgilio et al., 2001 b; Kunapuli et al., 2003). Estes receptores são divididos em duas subfamílias: aqueles acoplados à proteína G (P2Y) e aqueles ligados a canais iônicos (P2X). Em mamíferos, foram identificados oito P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄) e sete P2X (P2X₁ – P2X₇) (Burnstock, 2006).

Os receptores P2Y, quando da ligação do agonista, induzem a ativação da fosfolipase C e/ou estimulação/inibição da adenilato ciclase. O ATP é agonista de todos os receptores P2Y, entretanto o UTP é mais potente para os P2Y₄ e P2Y₆, enquanto que para o P2Y₂, tanto o ATP quanto o UTP são fortes agonistas (Di Virgilio et al., 2001).

Os receptores P2X, canais de íons ligados ao ATP, medeiam rápidas mudanças na permeabilidade a íons mono e divalentes (Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺). Dentre os P2X, um em especial vem chamando a atenção da comunidade científica, devido a sua peculiar habilidade de sofrer uma progressiva alteração no seu formato, induzida pelo ATP, o que pode levar à geração de um poro não seletivo na membrana: o P2X₇, também conhecido como P2Z (Di Virgilio et al., 2001 b). Este receptor já foi descrito em diversas células, tais como macrófagos, células dendríticas e microgliais, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos. Intrigante é o fato de que a ativação destes receptores pelo ATP pode levar a dois efeitos antagônicos: proliferação ou morte celular, dependendo das concentrações disponíveis de ATP no meio extracelular. Quando em grandes quantidades, predominam os efeitos de morte celular, podendo ser via necrose ou apoptose; já quando em pequenas quantidades, predominam os efeitos de proliferação celular (Adinolfi et al., 2005; Di Virgilio, 2000).

III.5. Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma doença maligna caracterizada por uma proliferação descontrolada de células linfóides imaturas

(linfoblastos) na medula óssea, as quais podem se disseminar no sangue, sistema nervoso central, timo, linfonodos e outros tecidos. As LLA podem ser dos tipos B e T, sendo as primeiras mais comuns (Viele, 2003; Lorenzi, 2003).

Embora possa ocorrer em crianças e adultos, existe uma maior prevalência na faixa etária de 2-18 anos (70%), sendo essa doença o tipo mais comum de câncer encontrado na população pediátrica, assumindo uma proporção de mais de 50% das malignidades hematopoéticas nessa faixa etária. Existe ainda uma pequena prevalência em pacientes do sexo masculino, sendo 1.4 vezes maior do que no sexo feminino (Lorenzi, 2003; Plasschaert et al., 2004).

Na LLA, assim como em outros tumores malignos, existe uma desregulação do balanço entre os processos de apoptose e proliferação celulares, havendo uma maior sobrevivência das células clonais malignas, além de um aumento na suas taxas de proliferação (Schuler & Szende, 2004; Lin et al., 2002). Além disso, é bastante freqüente um quadro de infecções recorrentes, uma vez que os linfócitos T e B destes pacientes apresentam diversas anormalidades funcionais (Zhang et al., 1997; Yotnda et al., 1999). Soma-se ainda a essas anormalidades funcionais intrínsecas da doença a imunossupressão induzida pelo tratamento quimioterápico a que esses pacientes são submetidos (Mazur et al., 2006).

III.5.A. Diagnóstico e estadiamento

O diagnóstico da LLA é realizado através dos achados clínico-laboratoriais, que incluem o exame físico, hemograma, mielograma, reações citoquímicas, imunofenotipagem e biologia molecular (Lorenzi, 2003).

A partir desses resultados, é estabelecido o prognóstico da doença, classificando o paciente como sendo dos grupos baixo risco de recaída (RB) ou alto risco de recaída (AR), o que definirá o esquema de tratamento a ser adotado. Pertencerão ao grupo RB os pacientes que apresentarem, no momento do diagnóstico, LLA da linhagem B-derivada, idade ≥ 1 ano ou abaixo de 9 anos e/ou com menos de 50.000 leucócitos/mm³ e que, adicionalmente, apresentarem rápida resposta ao esquema de indução da remissão, reduzindo a leucometria e o número de blastos leucêmicos no sangue periférico e medula óssea. Os pacientes serão classificados como sendo do grupo AR caso não apresentem uma ou mais das características acima citadas, ou ainda aqueles que, ao apresentarem envolvimento inicial no SNC, persistam com a presença de blastos no líquido após o início do tratamento (Protocolo GBTLI LLA-99). Este protocolo, que se baseia nos critérios de risco do *National Cancer Institute* (NCI), é o adotado para o estadiamento e tratamento da LLA pelo serviço de hematologia-oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria (UFSM), de onde provêm os pacientes deste estudo.

III.5.B. Prognóstico e tratamento

O prognóstico da LLA é diferente para crianças e adultos acometidos por esta doença. Para crianças, o prognóstico é bem melhor, sendo que mais

de 95% dos pacientes alcançam a remissão total e a taxa de sobrevida é de aproximadamente 80% com tratamento quimioterápico adequado. Já para adultos, 75-89% alcançam a remissão total, enquanto que a taxa de sobrevida é de 28-39% (Plasschaert et al., 2004; Bhatia, 2003).

O esquema de tratamento a ser adotado depende do grupo de risco de recaída a que o paciente foi classificado. Entretanto, ele consiste, basicamente, das fases de indução e manutenção da remissão (tabela 1). As principais drogas utilizadas no tratamento da LLA são: Metotrexato (antagonista do ácido fólico), Dexametasona (glicocorticóide), Vincristina (alcalóide de planta), Arabinol Citosina (análogo sintético da citidina) e 6-Mercaptopurina (antagonista da purina). Estas drogas são utilizadas de acordo com o esquema de tratamento da LLA, proposto pelo GBTLI LLA-99. Após, caso o tratamento tenha logrado sucesso, os pacientes são acompanhados por um período que muitas vezes excede a fase adulta, a fim de afastar uma possível recidiva da doença, quando são realizados exames clínico-laboratoriais regularmente (GBTLI LLA-99).

III.5.C. Etiopatologia

A etiologia da LLA é desconhecida, embora alguns fatores de risco tenham sido apontados para desencadear a transformação maligna das células precursoras linfóides, como mutações genéticas (translocações são bastante comuns), infecções virais, radiações ionizantes, agentes quimioterápicos, exposição ao benzeno, entre outros (Lorenzi, 2003; Viele, 2003).

Tabela 1. Esquema das fases de tratamento da LLA (GBTLI LLA-99)

Fase	Tempo (semanas)	
	RB	AR
Indução	0-21	0-33
Manutenção	22-106	34-111

AR: Alto risco de recaída ; RB: Baixo risco de recaída

IV. ARTIGO

NTPDase1 activity in lymphocytes from patients under treatment for acute lymphoblastic leukemia: an alteration in the extracellular ATP and ADP hydrolysis

André Luis Bittencourt Morsch¹, Vanessa Battisti¹, Maria do Carmo Araújo², Rafael Fernandes Zanin¹, Mushtaq Ahmed¹, Liliane Zimmermann de Oliveira², Rita Bauschspiess², Vera Maria Morsch¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{1*}

¹Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas and

²Hospital Universitário de Santa Maria - HUSM, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

*Corresponding author:

Dr. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Departamento de Química

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria RS Brasil - 97105-900

E-mail: mariarosa@smail.ufsm.br

Abstract

NTPDase activity (EC 3.6.1.5, apyrase, CD39) was analyzed in peripheral lymphocytes from 56 patients under treatment for acute lymphoblastic leukemia (ALL). The study consisted of 3 groups: remission induction (RI), remission maintenance (RM) and out-of-treatment (OT), and a control group of 33 healthy subjects. Results demonstrated that both ATP and ADP hydrolysis were significantly altered ($F(3,83)=100.34$, $p<0.001$; $F(3,69)=59.05$, $p<0.001$; respectively). Both were reduced in the RI and RM groups, but in the OT group ATP hydrolysis was enhanced and ADP remained normal. Next, patients were divided according to the prognosis into high or low recurrence risk (HR and LR, respectively). NTPDase1 activity was compared between HR/LR patients in each group studied, and no significant difference was observed. Furthermore, the RM group was subdivided by the amount of time they had been in remission maintenance (0-30, 31-60 and 61-84 weeks). ATP hydrolysis was higher in the first 30 weeks, being reduced subsequently ($F(2,17)=11.22$, $p=0.001$), but ADP hydrolysis was constant during this period of treatment. These results indicate a possible participation of NTPDase1 in the immunodeficiency and cytotoxicity observed in patients treated for ALL, because of the important role ATP plays in such processes.

Keywords: NTPDase1; Lymphocytes; ATP; ADP; Acute Lymphoblastic Leukemia; Treatment.

1- Introduction

Lymphocytes are one of the most important cells involved in immunity, being essential for the recognition and destruction of non-self antigens [1]. Several mediators present in the extracellular environment can modulate the effector functions of lymphocytes, including adenine nucleotides. Furthermore, extracellular adenine nucleotides are described as important signaling molecules in blood cells [2, 3].

The central role of adenosine diphosphate (ADP) in platelet aggregation and thromboregulation processes is well established [4, 5], but its role in lymphocytes has not been defined [6, 7]. Adenosine triphosphate (ATP) participates in cell-cell interactions, playing an important role in the activation, differentiation and development of lymphocytes [2, 8].

Curiously, ATP is also related to the induction of two opposite effects, depending on its concentration in the extracellular milieu: proliferation or cytotoxicity [9]. The P_2X_7 receptor, an ionotropic, ligand-gated cation channel, member of the P2X purinoreceptors is mostly responsible for these ATP mediated functions [10]. This receptor is widely distributed in blood cells, such as macrophages, dendritic cells and lymphocytes [11]. Low tonic stimulation by ATP is postulated to produce a low level of activation of P_2X_7 that supports cell proliferation. By contrast, high P_2X_7 stimulation would lead to cell death by either necrosis or apoptosis, depending on the ATP dose and cell type [12, 13].

One of the enzymes responsible to regulate the levels of extracellular nucleotides is NTPDase1 (E.C. 3.6.1.5, CD39, ecto-apyrase, ATP diphosphohydrolase), which belongs to the E-NTPDase family. NTPDase1 exerts this function by hydrolyzing extracellular ATP and ADP to adenosine monophosphate (AMP) [14].

Because this enzyme is highly distributed in blood cells, such as platelets [15], endothelial cells and leukocytes [16], including lymphocytes [17], NTPDase1 participates in several cell-cell interactions, playing an important role in platelet aggregation and inflammatory and immune responses [14]. Furthermore, NTPDase1 has been reported as an activation marker necessary for effector functions of lymphocytes, participating in antigen recognition [7].

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a disease characterized by an uncontrolled proliferation and maturation arrest of lymphoid progenitor cells in the bone marrow, resulting in an excess of malignant cells with possible infiltration in the blood, central nervous system (CNS) and other organs [18, 19]. ALL is more prevalent, and has a better prognosis, in children (5-9 years old) and accounts for more than 50% of the hematopoietic malignances in childhood [20]. In general, ALL standard treatment protocols consist of induction and maintenance remission with chemotherapeutic drugs. In this study, patients were diagnosed and treated according to the Brazilian Group of Childhood Leukemia Treatment (GBTLI LLA-99) protocol [21]. Children treated with a contemporary therapy have a 5-year survival rate of 80% [22], whereas adult long-term survival rates are 28 to 39% [18].

In ALL, as in other malignant diseases, the balance between cell proliferation and apoptosis is dysregulated [23, 24]. Furthermore, recurrent infections are frequent in these patients, due to abnormalities in lymphocyte function and as well as to the immunosuppression induced by the treatment [25-27].

Considering the important role of extracellular nucleotides in the immune system, as well as in cell integrity and homeostasis, the objective of this study was to verify NTPDase1 activity from lymphocytes of ALL patients under the different phases of the treatment.

2- Materials and Methods

2.1. Materials

Nucleotides, sodium azide, Trypan blue, HEPES, and Trizma base were purchased from Sigma (St, Louis, MO, USA). Ficoll Hypaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Monoclonal antibodies were purchased from Becton Dickinson (BD, San Jose, CA, USA), Dako (Glostrup, Denmark) and Immunotech (Marseille, France). All the other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Patients

The sample consisted of 56 acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients under treatment at the Oncology-Hematology Laboratory – Hospital of the Federal University of Santa Maria (Santa Maria, RS, Brasil) and of 33 healthy volunteers, of the same age range and social conditions. All subjects gave written informed consent to participate in this study. The Human Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 111/05. The ALL patients were diagnosed and then classified into high recurrence risk (HR) and low recurrence risk (LR) groups, according to the clinical and laboratorial findings at the diagnosis, as defined by the Brazilian Group of Childhood Leukemia Treatment in the GBTLI LLA-99. This protocol is based on the Cancer Therapy Evaluation Program, proposed by the National Cancer Institute. The diagnosis includes age, leukocyte count, immunophenotyping, involvement of tissues other than bone marrow and responsiveness to the treatment. The treatment, with chemotherapeutic agents, such as folic antagonists, plant alkaloid, glucocorticoids, purine and citidine analogs, consisted of two phases: remission induction and maintenance. After these phases, patients have follow-ups with periodic laboratorial exams to discard a possible recurrence. Taking this into account, we selected three patient groups: remission induction (RI), remission maintenance (RM) and out-of-treatment (OT) groups. According to the GBTLI LLA-99 protocol, patients undergo up to 84 weeks of treatment in the remission maintenance (RM) phase, therefore we divided this group into three lengths of treatment (0-30; 31-60 and 61-84 weeks). Patients from the OT group had been out-of-treatment from a few

weeks to 5 yers. The healthy volunteers were carefully selected and had not undergone any pharmacological treatment during the last 30 days; did not present any acute or chronic disease, such as diabetes, parasitosis or any immune dysfunction; and presented normal leukocytes and other blood cell counts.

2.3. Isolation of the cells

The peripheral lymphocytes were isolated using Ficoll Hypaque density gradient as described by Böyum [28]. After separation, only samples with at least 95% of lymphocytes, as verified in the coulter STKS (Miami-USA), were used. Lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of cells, excluding 0.1% trypan blue, and measuring the lactate dehydrogenase (LDH) activity [29].

2.4. NTPDase1 determination

After the isolation of lymphocytes, NTPDase1 activity was determined according to the method described by Leal et al. [17]. Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1 - 0.2 mg/mL. Twenty microliters of intact cells (2 - 4 µg protein) were added to a reaction medium containing 0.5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µL, and preincubated for 10 min at 37°C. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 2.0 mM and stopped with 5 % trichloroacetic acid (TCA). All the samples were run in triplicate, and enzymes (intact lymphocytes) were added to the control

after the addition of TCA in order to correct the non-enzymatic hydrolysis of the substrate. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the method of Chan et al. [30] and enzymatic activity was reported as nmol Pi released/min/ mg protein.

2.5. Protein determination

Protein was determined by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard as described by Bradford [31].

2.6. Immunophenotyping

Immunophenotypic studies at the diagnosis were performed on erythrocyte lysed whole bone marrow (BM) samples upon staining with directly conjugated monoclonal antibodies (MoAbs). The test was performed using at least 1×10^6 nucleated cells/tube of BM cell suspension. Amounts of double or triple combinations of the following antibodies were used: FITC-conjugated: CD4, CD10, CD14, CD15, CD19, CD20, HLA-DR, anti-TdT, anti-IgM, anti-MPO, PE-conjugated: CD7, CD8, CD13, CD22, CD33, CD34, CD79a, CD117, PerCP-conjugated: CD45, and RPE-Cy5-conjugated: CD3, CD19. Tests were performed according to the manufacturer descriptions. Data acquisition was performed using FACS Calibur[®] flow cytometer (BD, San Jose, CA, USA), and antigenic expression was analyzed by Cell Quest software program.

2.7 Statistical analysis

Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. All the data were expressed as mean \pm standard error.

3- RESULTS

3.1- Sample and viability

Immunophenotyping of 36 of the 56 patients selected in this study, indicated that the ALL was of the B-lineage (Table 1). From these, 1 presented the immunophenotyping profile of ALL-B, 6 presented the pre-B ALL profile and 29 presented the common ALL profile (CALLA). None of the selected patients presented T-lineage lymphoid markers (CD 2, 3, 4, 5, 7, 8) (data not shown).

The percentage of disrupted lymphocytes was less than 5% after separation (data not shown). These results indicate that the cells were predominantly intact.

3.2- Influence of the ALL treatment and out-of-treatment phases on lymphocyte ATP and ADP hydrolysis

ATP hydrolysis was altered in all groups studied ($F(3,83)=100.34$; $p<0.001$). Post-hoc comparisons by Student-Newman-Keuls (SNK) test revealed that ATP hydrolysis was reduced in both remission induction (RI) and maintenance (RM) groups, while it was enhanced in the out-of-treatment (OT) group in relation to the control subjects (Fig. 1a).

ADP hydrolysis was altered as a function of the treatment ($F(3,69)=59.05$; $p<0.001$). Post-hoc comparisons by SNK test revealed that ADP hydrolysis was reduced in both RI and RM groups, while it was not significantly different for the OT group in relation to the control subjects (Fig. 1b).

3.3- Influence of the recurrence risk classification to lymphocyte ATP and ADP hydrolysis in groups studied

ATP hydrolysis was not significantly different in relation to the high recurrence (HR) and low recurrence (LR) risk classification (prognosis) in each group studied: RI, RM and OT ($F(1,8)=2.9$, $p=0.126$; $F(1,20)=0.22$, $p=0.646$; $F(1,16)=1.66$, $p=0.216$; respectively) (Fig. 2a).

The same pattern was obtained for ADP hydrolysis in relation to the groups studied ($F(1,4)=1.91$, $p=0.240$; $F(1,14)=0.01$, $p=0.941$; $F(1,14)=0.940$, $p=0.348$; respectively) (Fig 2b).

3.4- Influence of the length of the maintenance phase of treatment on lymphocyte ATP and ADP hydrolysis

ATP hydrolysis was modified during the maintenance phase of treatment ($F(2,17)=11.22$; $p=0.001$) as can be observed in figure 3.a. Post-hoc comparisons by SNK test revealed that it was higher in the first 30 weeks of treatment and subsequently was reduced.

The same pattern was not observed for ADP hydrolysis, as it seemed to remain constant during this phase ($F(2,13)=2.40$; $p=0.130$) (Fig 3.b).

4- DISCUSSION

The present study demonstrated that ATP and ADP hydrolysis by NTPDase1 is altered in the lymphocytes of patients under ALL treatment. ATP and ADP hydrolysis were found to be reduced in both the remission induction (RI) and remission maintenance (RM) phases of the treatment (Fig. 1), and the degree of this alteration seems not to be related to the prognosis of the disease, since we found no significant difference in NTPDase1 activity between high and low recurrence risk in each group studied (Fig. 2). Because RM is a long phase, in which patients undergo up to 84 weeks of chemotherapeutic agents, we subdivided it into three lengths, and the results indicated that ATP hydrolysis was not constant during this phase, in that it was higher in the first 30 weeks of treatment and subsequently was reduced. Using ADP as substrate, no alteration in NTPDase1 activity was observed during maintenance therapy (Fig. 3). We also evaluated NTPDase1 activity in lymphocytes of patients who had completed the treatment, denominated the out-of-treatment (OT group). ATP hydrolysis was enhanced in this group, while no significant alteration was observed when ADP was used as substrate.

It is well established that extracellular nucleotides play an important role as signaling molecules in several tissues, including the immune system [32, 11]. Extracellular ATP, in particular, is capable to modulate important processes, such as activation, cell proliferation/citotoxicity, development and effector functions in lymphocytes [9]. On the other hand, the role of the extracellular ADP in these cells has not been identified [6,7]. ATP hydrolysis is controlled, in part, by NTPDase1, and this enzyme has been known to execute

an important role on lymphocyte function, including antigen recognition and/or activation of effector activities of cytotoxic T cells [33].

Langston et al. [34] reported that extracellular ATP mediated lymphocyte secretion of some important cytokines (IL-2, IFN- γ) is dependent on its hydrolysis, rather than the ability to activate P2 receptors. Thus, an ATP hydrolysis inhibition, as our results for the RI and RM groups demonstrate, may cause impairment to lymphocyte functions. In fact, ALL patients under treatment with chemotherapy present immune defects and the development of acute bacterial and virus infections [26, 35].

Mazur et al. [27], pointed to the fact that immunological impairment persists in ALL patients during the whole treatment period, but also after its completion. Most often, a period of one year is necessary for full reconstitution of the immune system, but some authors suggest longer periods for these reconstitution processes [36, 37]. Our results demonstrated an enhanced lymphocyte ATP hydrolysis for the out-of-treatment (OT) patients (Fig 1). This alteration of NTPDase1 activity could also influence the immune system and contribute to immunodeficiency in these patients. Furthermore, we found no significant correlation between NTPDase1 activity and the length of time after completion of the treatment (data not shown), being that it was analyzed in patients that had been out-of-treatment from a few weeks to 5 years.

Besides the impaired function of lymphocytes, the immunodeficiency observed in ALL patients under treatment is also related to the cytotoxic effects induced by drugs used to achieve blast (immature lymphoid cells) remission [35]. However, these drugs destroy not only blasts: purine analogs can induce a

marked CD4+ T cell depletion [38, 27] and glucocorticoids can cause a profound lympholysis [39].

ATP plays an important role in cytotoxicity, acting mainly via binding to P_2X_7 receptors. These receptors, widely distributed in hematopoietic cells, induce the formation of pores in the plasma membrane, leading to the entrance of bivalent cations and large molecules, which generally cause cell death [11, 12]. Furthermore, it was observed that ATP hydrolysis suppresses the proliferation of peripheral lymphocytes due to adenosine production [40] and evokes DNA synthesis in lymphoid cells of the thymus, spleen, lymph nodes and peripheral blood [41]. In this context, an NTPDase1 inhibition in the hydrolysis of ATP may collaborate to accumulate this nucleotide in the extracellular environment, which, in turn, can interact with P_2X_7 receptors and promote cell death via apoptosis. Zhang et al. [42] reported that the P_2X_7 expression level is significantly higher in ALL lymphocytes. Thus, ATP accumulation, associated with a high P_2X_7 expression, becomes cells more susceptible to the cytotoxic effects of this nucleotide.

In conclusion, our study demonstrated, for the first time, that ATP and ADP hydrolysis is modified in the lymphocytes of ALL patients under treatment. More studies are necessary to better understand the mechanisms involved in this possible contribution of NTPDase1 to immunodeficiency and cytotoxicity mediated by standard chemotherapeutic drugs used to treat ALL. Nevertheless, we hope that our results represent an important contribution in the establishment of this association.

5-ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank all the ALL patients and the professionals at the Hematology-Oncology Laboratory (HUSM) for their support.

This study was supported by CNPq, FAPERGS, CAPES and the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

6- REFERENCES

1. Adam JK, Odhav B, Bhoola KD. Immune responses in cancer. *Pharmacol Therapeut* 2003; 99:113-132.
2. Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 364-373.
3. Heptinstall S, Johnson A, Glenn JR, White E. Adenine nucleotide metabolism in human blood - Important roles for leukocytes and erythrocytes. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2331-2339.
4. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase1). *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2497-2509.
5. Zimmermann H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in haemostasis and thrombosis. *Nat Med* 1999; 5: 987-988.
6. Luthje J. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. *Klin Wochenschr* 1989; 67: 317-327.

7. Dombrowski KE, Ke Y, Brewer K, Kapp JA. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev* 1998; 161: 111-118.
8. Redegeld FA, Smith P, Apasov S, Sitkovsky MV. Phosphorylation of T-lymphocyte plasma membrane-associated proteins by ectoprotein kinases: implications for a possible role for ectophosphorylation in T-cell effector functions. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1328: 151-165.
9. Di Virgilio F. Dr. Jekyll/ Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *J Autonom Nerv Syst* 2000; 81: 59-63.
10. North RA. The molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82: 1013-1067.
11. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97: 587-600.
12. Adinolfi E, Pizzirani C, Idzko M, Panther E, Norgauer J, Di Virgilio F, Ferrari D. P₂X₇ receptor: death or life? *Purinergic Signal* 2005; 1: 219-227.
13. Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S. Cytolytic P2X purinoreceptors. *Cell Death Differ* 1998; 5: 191-199.
14. Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001; 52: 44-56.
15. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJF. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996; 7: 225-230.

16. Koziak K, Sévigny J, Robson SC, Siegel JB, Kacsmarek E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (NTPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1538-1544.
17. Leal DBR, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CAM, Silva JEP, Morsch VM, Schetinger MRC. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1721: 9-11.
18. Plasschaert SLA, Kamps WA, Vellenga A, Vries EGE, De Bont ESJM. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia: a question of maturation? *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 37-51.
19. Viele CS. Diagnosis, treatment, and nursing care of acute leukemia. *Semin Oncol Nurs* 2003; 19: 98-108.
20. Downing JR, Shannon KM. Acute leukemia: a pediatric perspective. *Cancer Cell* 2002; 2: 437-446.
21. Protocolo GBTLI LLA-99, Grupo brasileiro de tratamento da leucemia da infância, Instituto Boldrini, Campinas-SP.
22. Bhatia S. Late effects among survivors of leukemia during childhood and adolescence. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 31: 84-92.
23. Schuler D, Szende B. Apoptosis in acute leukemia. *Leuk Res* 2004; 28: 661-666.
24. Lin CW, Taghi M, Jilani I, Neuberg D, Patel K, Kantarjian H, Andreeff M, Estrov Z, Beran M, Keating M, Estey E, Albitar M. Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2002; 26: 551-559.

25. Zhang XL, Komada Y, Zhou YW, Chen TX, Sakai H, Azuma E, Ido M, Sakurai M. Inhibition of interleukin-2 receptor (CD25) expression induced on T cells from children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 44: 41.
26. Yotnda P, Mintz P, Grigoriadou K, Lemmonier F, Vilmer E, Langlade-Demoyen P. Analysis of T cell defects in the specific immune response against acute lymphoblastic leukemia cells. *Exp Hematol* 1999; 27: 1375-1383.
27. Mazur B, Szcsepanski T, Karpe J, Sonta-Jakimczyk D, Bubala H, Torbus M. Decreased number of CD4+ T lymphocytes in peripheral blood after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2006; 30: 33-36.
28. Böyum A. 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 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97: 77–89.
29. Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Deerfield Beach, 1983.
30. Chan K, Delfert K, Junguer KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157: 375-380.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 218-254.

32. Yegutkin GG, Henttinen T, Samburski SS, Spsychala J, Jalkanen S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J* 2002; 367: 121-128.
33. Filippini A, Taffs RE, Sitvosky MV. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 8267-8271.
34. Langston HP, Ke Y, Dombrowski KE, Gewirtz AT, Kaap J. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 2003; 170: 2962-2970.
35. Brotdman DH, Rosenthal DW, Redner A, Lanzkowski P, Bonagura V. Immunodeficiency in children with acute lymphoblastic leukemia after completion of modern aggressive chemotherapeutic regimens. *J Pediatr* 2005; 146: 654-661.
36. Caver TE, Slobod KS, Flynn PN, Behn FG, Hudson MM, Turner EV. Profound abnormality of the B/T lymphocyte ratio during chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 619-622.
37. Poulsen A, Schmiegelow K, Yssing M. *Varicella Zoster* infection in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1996; 13: 231-139.
38. Cheson BD. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2434-2448.

39. Fauci AS, Dale DC, Balow JE. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Ann Intern Med* 1976; 84: 304-315.
40. Fishman RF, Rubin AL, Novogrodski A, Stenzel KH. Selective suppression of blastogenesis induced by different mitogens: effect of noncyclic adenosine-containing compounds. *Cell Immunol* 1980; 54: 129-139.
41. Ikehara S, Pahwa RN, Lunzer DG, Good RA, Modak RJ. Adenosine 5'-triphosphate (ATP)-mediated stimulation and suppression of DNA synthesis in lymphoid cells: characterization of ATP responsive cells in mouse lymphoid organs. *J Immunol* 1981; 127: 1834-1838.
42. Zhang XJ, Zheng GG, Ma XT, Yang YH, Li G, Rao Q, Nie K, Wu KF. Expression of P₂X₇ in hematopoietic cell lines and leukemia patients. *Leuk Res* 2004; 28: 1313-1322.

Table 1- Immunophenotyping profile of the ALL patients

Subtype	Profile	Patients (n)
Early pre-B ALL	DR, CD 19, CD 79a, TdT, CD 34	0
Common ALL	DR, CD 19, CD 20 ^{+/-} , CD 79a, TdT, CD 34, CD 10	29
pre-B ALL	DR, CD 19, CD 20 ^{+/-} , CD 22, CD 10 ^{+/-} , CD 79a, TdT ^{+/-} , cIgM	6
B-ALL	DR, CD 19, CD 20, CD 22, CD10 ^{+/-} , sIg	1

+/-: variable, more often +; -/+ : variable, more often -; DR: HLA-DR; CD: cluster of differentiation; tdt: terminal deoxynucleotidyl transferase; sIg: surface Ig; cIg: cytoplasmatic Ig.

FIGURES

Figure 1

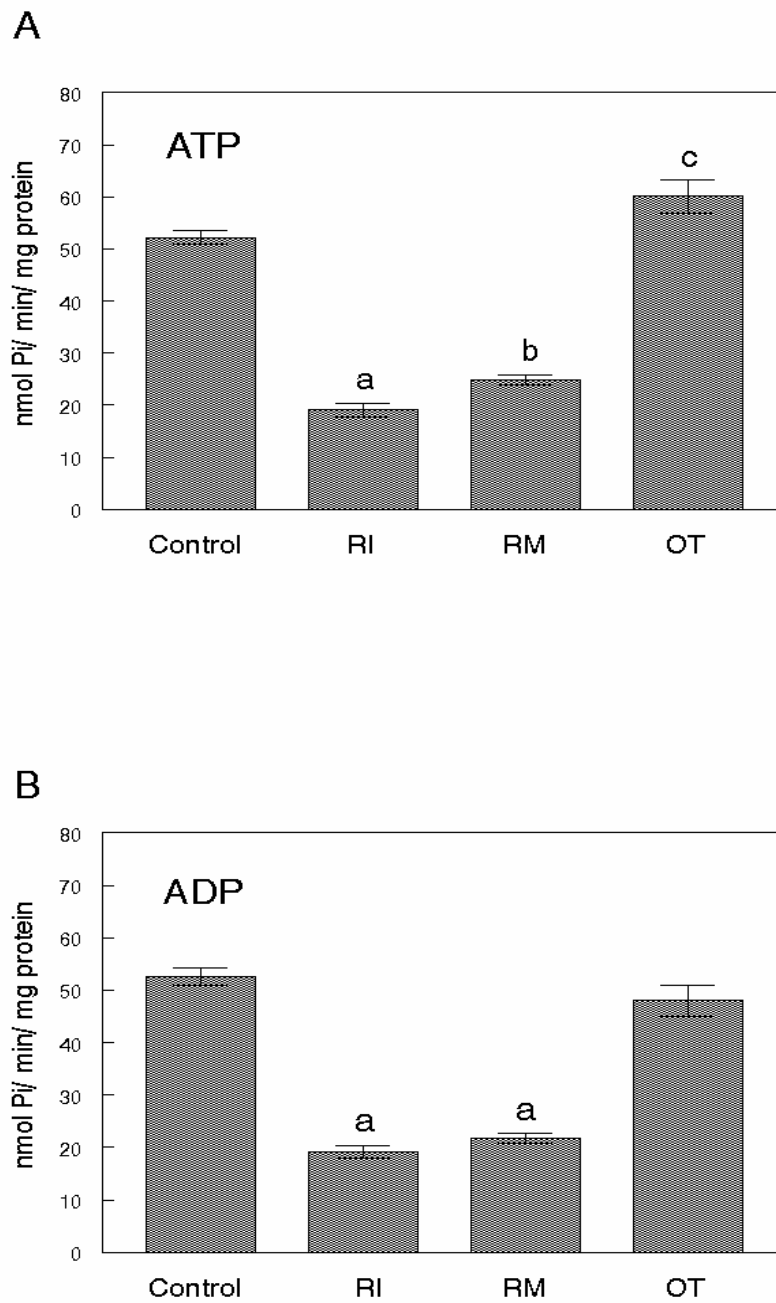


Figure 2

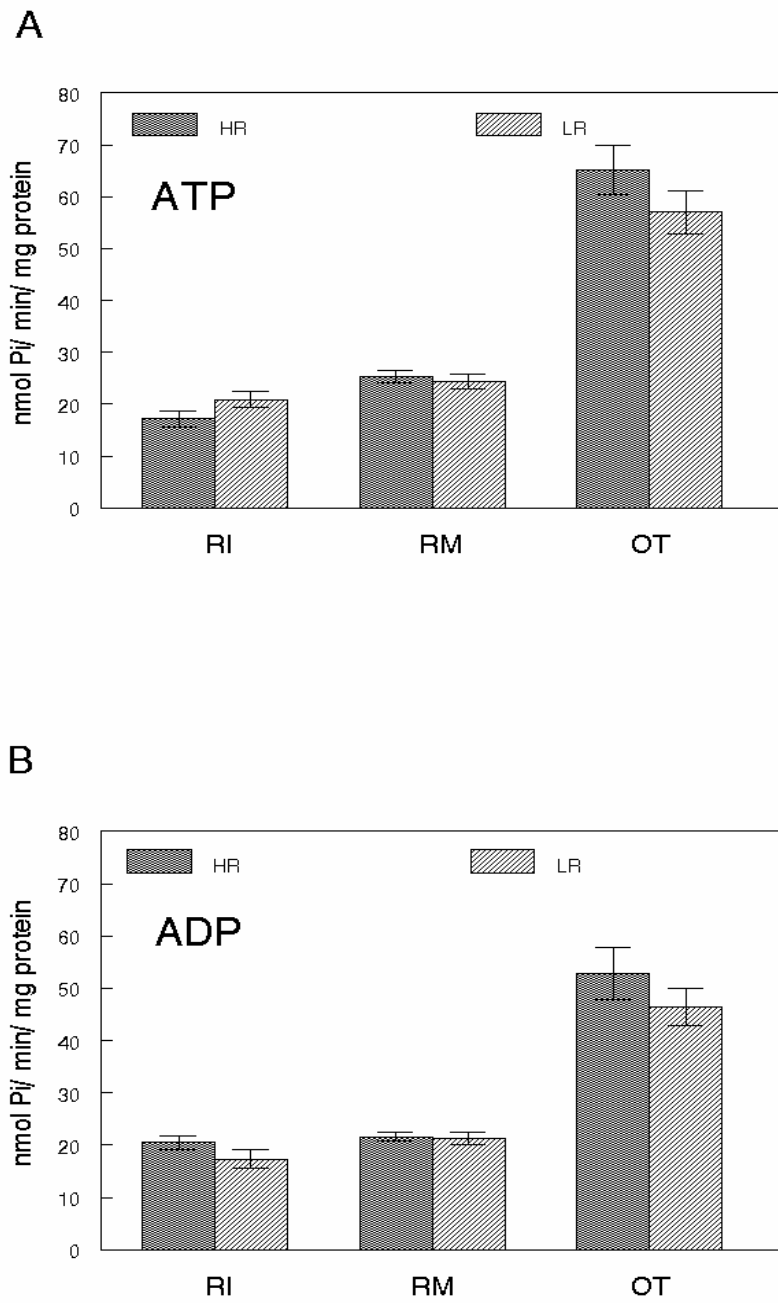
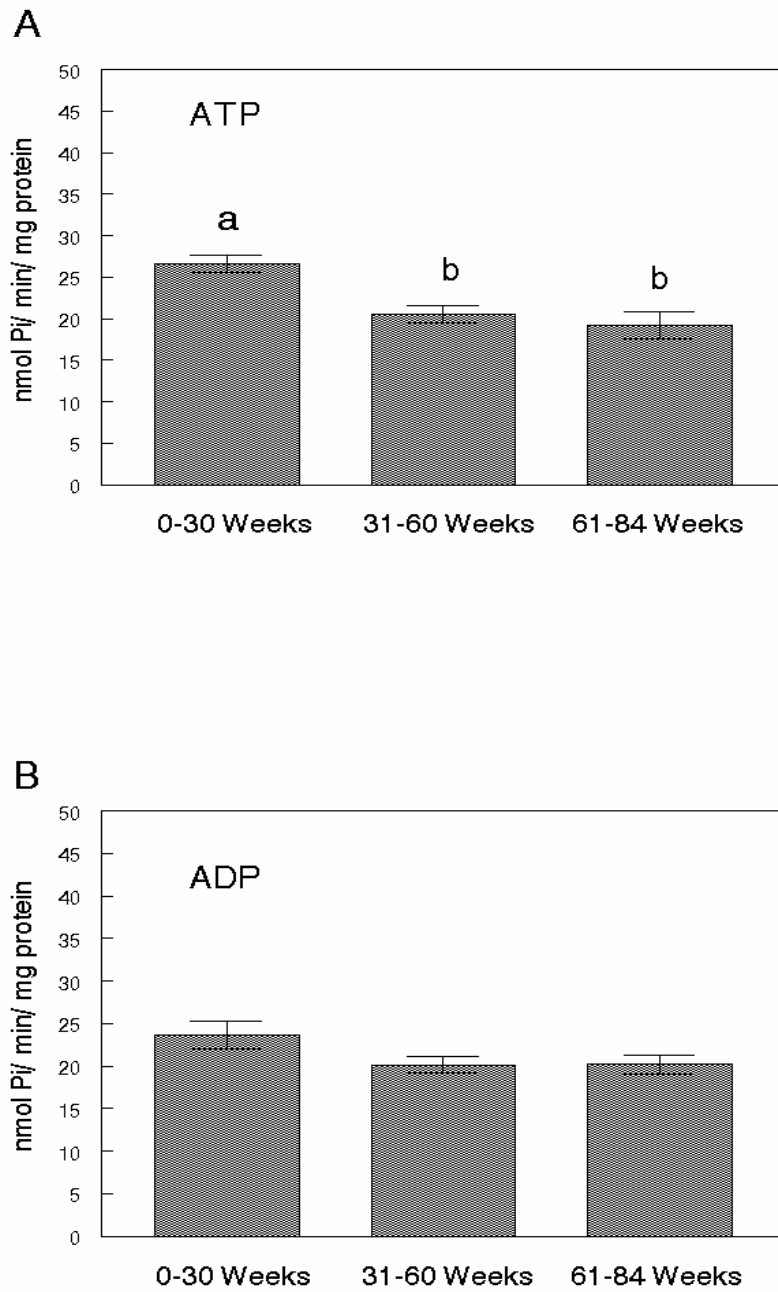


Figure 3



LEGEND OF FIGURES

Fig. 1. NTPDase1 activity on ATP and ADP hydrolysis (A and B, respectively) in peripheral lymphocytes of ALL patients under treatment. Patients were divided according to the phase of treatment into: remission induction (RI, n=10), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=21) groups. Controls consisted of 33 healthy subjects. (^{a,b,c}) Indicates a significant difference at $p < 0.05$ from columns not labeled with these letters (SNK test).

Fig. 2. NTPDase1 activity on ATP and ADP hydrolysis (A and B, respectively) in peripheral lymphocytes from HR and LR patients in the groups studied. Patients were divided according to the prognosis into high and low recurrence risk (HR and LR, respectively), in each phase of the treatment (remission induction (RI, n=10), remission maintenance (RM, n=25) and in out-of-treatment (OT, n=21) groups).

Fig. 3. NTPDase1 activity on ATP and ADP hydrolysis (A and B, respectively) in peripheral lymphocytes of patients under maintenance therapy. Patients in the remission maintenance (RM) phase were divided according to the length of treatment, 0-30 weeks (ATP, n=11; ADP, n=6), 31-60 weeks (ATP, n=5; ADP, n=5) and 61-84 weeks (ATP, n= 4; ADP, n=5). (^{a,b}) Indicates a significant difference at $p < 0.05$ from columns not labeled with these letters (SNK test).

V. DISCUSSÃO

Está bem estabelecido na literatura o papel dos nucleotídeos extracelulares como moléculas sinalizadoras em diversos tecidos, incluindo o sistema imune (Yegutkin et al., 2002; Di Virgilio et al., 2001 a). Em especial, o ATP é capaz de modular importantes processos tais como ativação, proliferação/citotoxicidade celular, desenvolvimento e funções efetoras dos linfócitos (Di Virgilio, 2000). Já o ADP não apresenta um papel definido nessas células (Luthje, 1989; Dombrowski et al., 1998).

A hidrólise do ATP é controlada, em parte, pela enzima NTPDase1, a qual executa um importante papel em algumas funções dos linfócitos, como reconhecimento e/ou ativação das células T citotóxicas frente a um estímulo antigênico (Fillipini et al., 1990 b). Esta enzima foi identificada ainda como um marcador de ativação linfóide expresso em linfócitos B, células NK e células endoteliais (Kansas et al., 1991; Koziak et al., 1999; Coppola et al., 2005).

Langston et al. (2003) reportou que a secreção de importantes citocinas linfocitárias, mediadas pelo ATP extracelular é dependente da hidrólise desse nucleotídeo, e não da sua capacidade de ativar os receptores P2.

Nossos resultados demonstraram que tanto a hidrólise do ATP quanto a do ADP está diminuída em linfócitos de pacientes em tratamento para LLA, nas fases de indução e manutenção da remissão. Além disso, esta redução parece não estar relacionada com o prognóstico da doença, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas para os pacientes classificados como sendo de alto ou baixo risco de recaída, em nenhum dos grupos estudados.

Dessa forma, a redução da hidrólise do ATP observada pode representar um possível defeito funcional nos linfócitos. De fato, pacientes em tratamento quimioterápico para LLA apresentam defeitos no sistema imune e freqüentemente desenvolvem infecções bacterianas e virais (Yotnda et al., 1999; Brodtman et al., 2005). Como a fase de manutenção da remissão é bastante longa (até 84 semanas), nós a subdividimos em três períodos (0-30, 31-60 e 61-84 semanas) e os resultados indicaram que a hidrólise do ATP não se manteve constante durante essa fase do tratamento, sendo maior nas primeiras 30 semanas e menor nas seguintes. Já para a atividade da NTPDase1 na hidrólise do ADP não foram encontradas diferenças significativas.

Mazur et al. (2006), apontam para o fato de que os defeitos no sistema imune em pacientes com LLA persistem durante todo o período do tratamento, mas também após o final deste. Freqüentemente, é necessário um ano para a reconstituição do sistema imune, embora alguns autores sugiram períodos maiores para esse processo (Caver et al., 1998; Poulsen et al., 1996). Nossos resultados demonstraram um aumento na hidrólise do ATP em linfócitos de pacientes fora de tratamento, porém resultados normais para a hidrólise do ADP. Essa alteração na atividade da NTPDase1 para o ATP pode influenciar o sistema imune, contribuindo para a imunodeficiência relatada nesses pacientes durante esse período. Além disso, não encontramos uma correlação significativa entre o tempo pós-tratamento com a atividade da NTPDase1, uma vez que os pacientes selecionados para o grupo FT estavam fora de tratamento desde poucas semanas até 5 anos (resultados não apresentados).

Além da alteração funcional dos linfócitos, a imunodeficiência observada em pacientes sob tratamento para LLA é também relacionada aos efeitos citotóxicos induzidos pelas drogas utilizadas para alcançar a remissão dos blastos (células linfóides imaturas) (Brotzman et al., 2005). Entretanto, essas drogas destroem não apenas blastos: análogos das purinas podem induzir uma acentuada depleção de células T CD4+ (Cheson et al., 1995; Mazur et al., 2006) e glicocorticóides podem causar uma intensa lise de linfócitos (Fauci et al., 1976).

O ATP desempenha um importante papel na citotoxicidade, agindo principalmente via ligação aos receptores P_2X_7 . Esses receptores, amplamente distribuídos nas células hematopoéticas (Zhang et al., 2004), induzem a formação de poros na membrana plasmática, conduzindo à entrada de cátions bivalentes e de grandes moléculas, as quais geralmente levam à morte celular (Di Virgilio et al., 2001 b; Adinolfi et al., 2005). Além disso, foi observado que a hidrólise do ATP inibe a proliferação de linfócitos periféricos, devido à produção de adenosina (Fishman et al., 1980) e promove a síntese de DNA em células linfóides do timo, baço, linfonodos e sangue periférico (Ikehara et al., 1981).

Assim, uma inibição da NTPDase1 na hidrólise do ATP poderia colaborar para uma acumulação deste nucleotídeo no meio extracelular, o qual, por sua vez, poderia interagir com os receptores P_2X_7 , promovendo morte celular via apoptose. Zhang et al. (2004), reportaram que o nível de expressão de P_2X_7 em linfócitos está significativamente aumentado na LLA. Dessa forma, um acúmulo de ATP, associado à alta expressão de P_2X_7 , torna as células mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos deste nucleotídeo.

DISCUSSÃO

Em conclusão, nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, que a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP está modificada em linfócitos de pacientes em tratamento para LLA. Mais estudos são necessários para melhor entender os mecanismos envolvidos nessa possível contribuição da NTPDase1 para a imunodeficiência e citotoxicidade induzida pelas drogas utilizadas no tratamento padrão da LLA. Entretanto, esperamos que nossos resultados representem uma importante contribuição para estabelecer esta associação.

VI. CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente estudo nos permitem as seguintes conclusões:

1. A hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP pela enzima NTPDase1 está diminuída em linfócitos de pacientes durante o tratamento para LLA, estando a hidrólise do ATP aumentada após o final desse;
2. Essa alteração não está relacionada ao prognóstico da doença, não sendo significativamente diferente em pacientes de alto e baixo risco de recaída;
3. A atividade da enzima NTPDase1 para a hidrólise do ATP não se manteve constante durante a fase de manutenção da remissão. Já para a hidrólise do ADP, não houve diferença significativa durante o período.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, J.K.; ODHAV, B., BHOOLA, K.D. Immune responses in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**. 99: 113-132, 2003.

ADINOLFI, E.; PIZZIRANI, C.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; NORGAUER, J.; DI VIRGÍLIO, F.; FERRARI, D. P₂X₇ receptor: Death or life? **Purinergic Signalling**. 1: 219-227, 2005.

ANICH, M.; FANTA, N.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A.M.; VALENZUELA, M.A. A transverso-cori apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**. 29: 1411-1415, 1990.

ARAÚJO, M.C.; ROCHA, J.B.T.; MORSCH, A.; ZANIN, R., BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1740: 421-426, 2004.

BARANKIEWICZ, J.; DOSCH, H.M.; COHEN, A. Extracellular nucleotide catabolism in human B and T lymphocytes. The source of adenosine production. **The Journal of biological chemistry**. 263: 7094–7098, 1988.

BHATIA, S. Late effects among survivors of leukemia during childhood and adolescence. **Blood cells, molecules & disease**. 31: 84-92, 2003.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T.; BARCELOS, C.K.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rat. **Neurochemical Research**. 16: 1303-1310, 1991.

BIGONNESSE, F.; LÉVESQUE, S.A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S.C.; FERNANDES, M.J.G.; SÉVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**. 43: 5511-5519.

BROTDMAN, D.H.; ROSENTHAL, D.W.; REDNER, A.; LANZKOWSKI, P.; BONAGURA, V. Immunodeficiency in children with acute lymphoblastic leukemia after completion of modern aggressive chemotherapeutic regimens. **The Journal of Pediatrics**. 146: 654-661, 2005.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. 22: 364-373, 2002.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling. **British Journal of Pharmacology**. 147: 172-181, 2006.

CAVER, T.E.; SLOBOD, K.S.; FLYN, P.N.; BEHN, F.G.; HUDSON, M.M.; TURNER, E.V. Profound abnormality of the B/T lymphocyte ratio during

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**. 12: 619-622, 1998.

CHESON, B.D. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. **Journal of Clinical Oncology**. 13: 2434-2448, 1995.

COPPOLA, A.; COPPOLA, L.; DALLA MORA, L.; LIMONGELLI, F.M.; GRASSIA, A.; MASTROLORENZO, L.; GOMBOS, G.; LUCIVERO, G. Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. **Journal of Applied Physiology**. 98: 1414-1419, 2005.

DA SILVA, A.C.; MORSCH, A.L.B.; ZANIN, R.F.; CORREA, M.C.; ARANTES, L.C.; ARAUJO, M.C.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze nucleotides in chronic renal failure: relationship between hemostatic defects and renal failure severity. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1741: 282-288, 2005.

DI VIRGILIO, F. Dr. Jekyll / Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. **Journal of the Autonomic Nervous System**. 81: 59-63, 2000.

DI VIRGILIO, F.; BOREA, P.A.; ILLES, P. P2 meet the immune system. **Trends in Pharmacological Science**. 22, 2001 a.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, M.J.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLIGNESI, G.; BARICORDI, R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**. 97: 587-600, 2001 b.

DOMBROWSKI, K. E.; KE, Y.; THOMPSON, L.F.; KAPP, J.A. Antigen recognition by CTL is dependent upon ecto-ATPase activity. **Journal of Immunology**. 154: 6227-6237, 1995.

DOMBROWSKI, K.E.; KE, Y.; BREWER, K.; KAPP, J.A. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. **Immunological Reviews**. 161: 111-118, 1998.

EDWARDS, F.A.; GIBB, A.J.; COLQUHON, D. ATP receptors-mediated synaptic currents in the central nervous system. **Nature Medicine**. 359: 144-147, 1992.

FAUCI, A.S.; DALE, D.C.; BALOW, J.E. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. **Annals of Internal Medicine**. 84: 304-315, 1976.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R.E.; AGUI, T.; SITVOSKY, M.V. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes, protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **Journal of Biological Chemistry**. 265: 334-340, 1990 a.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FILIPPINI, A.; TAFFS, R.E.; SITVOSKY, M.V. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 87: 8267-8271, 1990 b.

FISHMAN, R.F.; RUBIN, A.L.; NOVOGRODSKY, A.; STENZEL, K.H. Selective suppression of blastogenesis induced by different mitogens: effect of noncyclic adenosine-containing compounds. **Cellular Immunology**. 54: 129-139, 1980.

FRASSETO, S.; DIAS, R.D.D.; SARKIS, J.F.F. Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP, ADP, of the ATP diphosphohydrolase activity (E.C. 3.6.1.5) from rat blood platelets. **Biochemistry and Molecular Biology Internacional**. 35: 499-506, 1995.

IKEHARA, S.; PAHWA, R.N.; LUNZER, D.G.; GOOD, R.A.; MODAK, R.J. Adenosine 5'-triphosphate (ATP)-mediated stimulation and suppression of DNA synthesis in lymphoid cells: characterization of ATP responsive cells in mouse lymphoid organs. **Journal of Immunology**. 127: 1834-1838, 1981.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHOMCHIK, M. **Imunobiologia, o sistema imune na saúde e na doença**. 5° ed. ARTMED, Porto Alegre, 2002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KANSAS, G.S.; WOOD, G.S.; TEDDER, T.F. Expression, distribution and biochemistry of human CD39: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **Journal of Immunology**. 146: 2235-2244, 1991.

KANSAS, G.S.; WOOD, G.S.; TEDDER, T.F. Expression, distribution and biochemistry of human CD39: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **Journal of Immunology**. 146: 2235-2244, 1991.

KOZIAK, K.; SÉVGNY, J.; ROBSON, S.C.; SIEGEL, J.B.; KACZMAREK, E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. **Thrombosis and Haemostasis**. 82: 1538-1544, 1999.

KUNAPULI, S.P.; DORSAM, R.T.; SOOHONG, K.; QUINTON, T.M. Platelet purinergic receptors. **Current Opinion in Pharmacology**. 3: 175-180, 2003.

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

LEAL, D.B.R.; STREHER, C.A.; NEU, T.N.; BITTENCOURT, F.P.; LEAL, C.A.M.; SILVA, J.E.P.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Characterization of NTPDase (NTPDase1 ; ecto-apyrase ; ecto-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes.

Biochimica et Biophysica Acta. 1721: 9-11, 2005 a.

LEAL, D.B.R.; STREHER, C.A.; BERTONCHELI, C.M.; CARLI, L.F.D.; LEAL, C.A.M.; DA SILVA, J.E.P.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1746: 129-134, 2005 b.

LÉCUYER, E.; HOANG, T. SCL: From the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. **Experimental Hematology.** 32: 11-24, 2004

LIN, C.W.; TAGHI, M.; JILANI, I.; NEUBERG, D.; PATEL, K.; KANTARJIAN, H.; ANDREEFF, M.; ESTROV, Z.; BERAN, M.; KEATING, M.; ESTEY, E.; ALBITAR, M. Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research.** 26: 551-559, 2002.

LORENZI, T. **Manual de Hematologia, Propedêutica e Clínica.** 3° ed. Rio de Janeiro, MEDSI, 2003.

LUNKES, I.G.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, M.V.; MAZZANTTI, M.C.; SCHETINGER, M.C.R. Enzymes that hydrolyze adenine

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**. 109: 189-194, 2003.

LUTHJE, J. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. **Klinische Wochenschrift** 67:317-327, 1989.

MALMSJO, M.; EDVINSSON, L.; ERLINGUE, D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. **European Journal of Pharmacology**. 390: 173-180, 2000.

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.F., ISLAM, N.; PINSKY, D.J.; SESTI, C.; LEVI, R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 1: 2497-2509, 2003.

MATOS, J.A.A.; BORGES, F.P.; TASCA, T.; BOGO, M.R.; DE CARLI, G.A.; FAUTH, M.G.; DIAS, R.D.; BONAN, C.D. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (apyrase, E.C. 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology**. 31: 770-775, 2001.

MAZUR, B.; SZCSEPANSKI, T.; KARPE, J.; SONTA-JAKIMCZYK, D.; BUBALA, H.; TORBUS, M. Decreased number of CD4+ T lymphocytes in peripheral blood after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**. 30: 33-36, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MORSCH, A.L.B.; ZANIN, R.F.; ARAUJO, M.C.; DA SILVA, A.C.; BAUCHSPIESS, R.; AHMED, M.; CHIESA, J.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Altered hydrolysis of adenine nucleotides by platelet NTPDase and 5'Nucleotidase enzymes from metastatic prostatic cancer patients. **Artigo em fase de revisão.**

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E.C. 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**. 7: 225-230,1996.

PLASSCHAERT, S.L.A.; KAMPS, W.A.; VELLENGA, A.; VRIES, E.G.E.; DE BONT, E.S.J.M. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia: a question of maturation? **Cancer Treatment Reviews**. 30: 37-51, 2004.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: indentities and fuctions. **International Reviews of Cytology**. 158: 141-214, 1995.

POULSEN, A.; SCHMIEGELOW, K.; YSSING, M. *Varicella zoster* infection in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Hematology and Oncology**. 13: 231-139, 1996.

PROTOCOLO GBTLI LLA-99. **Grupo brasileiro de tratamento da Leucemia da infância**, Instituto Boldrini, Campinas-SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REDEGELD, F.A.; SMITH, P.; APASOV, S.; SITKOVSKY, M.V. Phosphorylation of T-lymphocyte plasma membrane-associated proteins by ectoprotein kinases: implications for a possible role for ectophosphorylation in T-cell effector functions. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1328: 151-165, 1997.

RESTA, R.; THOMPSON, L.F. SCID: the role of adenosine deaminase deficiency. **Immunology Today**. 18: 371-374, 1997.

RICO, E.P.; SENGER, M.R.; FAUTH, M.G.; DIAS, R.D.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). **Life Sciences**. 73: 2071-2082, 2003.

SARKIS, J.J.F.; BATTASTINI, A.M.O; OLIVEIRA, E.; FRASSETTO, S.S.; DIAS, R.D. ATP diphosphohydrolase: an review. **Ciência e Cultura**. 47: 131-136, 1995.

SCHETINGER, M.R.; VIEIRA, V.L.P.; MORSCH, V.M.; BALZ, D. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 128: 731-741, 2001.

SCHULER, D.; SZENDE, B. Apoptosis in acute leukemia. **Leukemia Research**. 28: 661-666, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology & Therapeutics**. 87: 161-173, 2000.

VALENZUELA, M.A.; LÓPEZ, J.; DEPIX, M.; MANCILHA, M.; KETTLUN, M.; CATALÁN, L.; CHIONG, M.; GARRIDO, J. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant source. Characterization of microsomal apyrase. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 93B: 911-919, 1989.

VASCONCELOS, E.G.; NASCIMENTO, P.S.; MEIRELLES, M.N.L.; VERJOVSKI, S.; FERREIRA, S.T. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Shistosoma mansoni*. **Molecular Biochemistry Parasitology**. 58: 205-214, 1993.

VIELE, C.S. Diagnosis, treatment, and nursing care of acute leukemia. **Seminars in Oncology Nursing**. 19: 98-108, 2003.

VIVIER, E. What is natural in natural killer cells? **Immunology Letters**. Article in press, 2006.

YAGI, K.; SHIMBO, M.; SHIMBA, S.; MIURA, Y. Purification and characterization of adenosine diphosphatase from human umbilical vessel. **Chemical Pharmacology Bulletin**. 40: 2143-2146, 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

YEGUTKIN, G.G.; HENTTINEN, T.; SAMBURSKI, S.S.; SPYCHALA, J.; JALKANEN, S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. **Biochemical Journal**. 367: 121-128, 2002.

YOTNDA, P.; MINTZ, P.; GRIGORIADOU, K.; LEMMONIER, F.; VILMER, E.; LANGLADE-DEMOYEN, P. Analysis of T cell defects in the specific immune response against acute lymphoblastic leukemia cells. **Experimental Hematology**. 27: 1375-1383, 1999.

ZHANG, X.L.; KOMADA, Y.; ZHOU, Y.W.; CHEN, T.X.; SAKAI, H.; AZUMA, E.; IDO, M.; SAKURAI, M. Inhibition of interleukin-2 receptor (CD25) expression induced on T cells from children with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Immunology Immunotherapy**. 44: 41, 1997.

ZHANG, X.J.; ZHENG, G.G.; MA, X.T.; YANG, Y.H.; LI, G.; RAO, Q.; NIE, K.; WU, K.F. Expression of P₂X₇ in hematopoietic cell lines and leukemia patients. **Leukemia Research**. 28: 1313-1322, 2004.

ZHUNG, J; EMERSON S.G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. **Oncogene**. 21: 3292-3313, 2002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B.; HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**. 32: 421-425, 1998.

ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in haemostasis and thrombosis. **Nature Medicine**. 5: 987-988, 1999.

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

VIII. ANEXOS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. TÍTULO

“Estudo da atividade e expressão da enzima NTPDase em linfócitos e estresse oxidativo em pacientes com Leucemia Linfocítica Aguda”

2. OBJETIVOS

- 1 Avaliar a atividade e expressão de constituintes do sangue que atuam em linfócitos de pacientes com Leucemia Linfocítica Aguda;
- 2 Investigar indicadores de aumento de radicais livres, bem como atividade antioxidante na população estudada;
- 3 Relacionar os resultados da atividade e expressão dos constituintes do sangue; e perfil de estresse oxidativo nos diferentes estágios do tratamento, bem como em pacientes controle, a fim de avaliar uma possível interação destes.

3. REGISTRO

Estudo será desenvolvido no Laboratório de Pesquisa de Enzimologia Toxicológica da UFSM e no Laboratório de Hematologia-Oncologia do HUSM-UFSM, com adesão voluntária de pacientes do HUSM. Esse estudo, foi encaminhado para aprovação junto à Comissão de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFSM.

4. PROCEDIMENTOS E RISCO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A coleta será realizada por punção venosa, com agulha, para retirada de cerca de 5mL. O desconforto se resume à picada da agulha, sendo que após a coleta o local poderá ficar dolorido ou arroxeadado, mas não requer nenhum cuidado especial voltando ao normal em poucos dias. O material biológico, sangue, será destinado para análise de linfócitos e soro para determinação de

constituintes sangüíneos, determinações hematológicas e dosagens bioquímicas. Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação aos pacientes.

5. ESTOCAGEM DE AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue serão estocadas no Laboratório de Hematologia-Oncologia do HUSM-UFSM para futuros testes por um período de até dois anos, após serão descartados conforme medidas de biossegurança.

6. PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A participação neste estudo é livre e voluntária, não haverá nenhuma forma de compensação financeira e também não haverá custos para o participante. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo ou comprometimento dos cuidados médicos aos pacientes.

7. CONFIDENCIALIDADE

A identidade do voluntário participante permanecerá em sigilo. Os registros dos pacientes também são confidenciais e sob responsabilidade do pesquisador.

8. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE E RESPONSÁVEL PELO MESMO

Nome Paciente

Identidade

**Assinatura-Responsável
pelo paciente**

Identidade

Assinatura do pesquisador

Em caso de dúvidas, entrar em contato com Profa Dra Maria Rosa Chitolina Schetinger, 3220 8665, ou André Luis Bittencourt Morsch, 055 99063589.