

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

**EFEITO DA CURCUMINA SOB A ATIVIDADE DAS
ENZIMAS NTPDase E ACETILCOLINESTERASE EM
LINFÓCITOS DE RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA DO
CIGARRO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jeandre Augusto dos Santos Jaques

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

EFEITO DA CURCUMINA SOB A ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDase E ACETILCOLINESTERASE EM LINFÓCITOS DE RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA DO CIGARRO

por

Jeandre Augusto dos Santos Jaques

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

Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Co-orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, RS, Brasil
2010

**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

**EFEITO DA CURCUMINA SOB A ATIVIDADE DAS
ENZIMAS NTPDase E ACETILCOLINESTERASE EM
LINFÓCITOS DE RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA DO
CIGARRO**

elaborada por
Jeandre Augusto dos Santos Jaques

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dr^a (Orientadora)

Solange Cristina Garcia, Dr^a (UFRGS)

Sônia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 19 de agosto de 2010

Dedico este trabalho a todos os meus amigos, colegas e familiares que apostaram e incentivaram o meu desenvolvimento intelectual. Em especial meu avô Guilherme (em memória), minha avó Eni e minha mãe Tânia.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado me guiando nas decisões tomadas e nos melhores caminhos a escolher seguir.

À minha família, que sempre me incentivou para o aperfeiçoamento do meu conhecimento e acreditou em meu trabalho.

Às minhas orientadoras Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal e Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina Schetinger, pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos ao longo de minha formação acadêmica, e principalmente pela amizade e confiança na execução deste trabalho. Além de minha gratidão, admiro-as por seu caráter e sua sabedoria.

À professora Maribel Antonello Rubin pelo apoio, carinho e sugestões que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às professoras Vera Maria Morsch e Margareth Linde Athayde pelo incentivo e pelas considerações que contribuíram grandemente para o delineamento desta pesquisa.

Aos professores componentes da banca, Solange Cristina Garcia, Sônia Terezinha dos Anjos Lopes e Cinthia Melazzo Mazzanti, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Aos meus professores e colegas por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas de pós-graduação Fabiano Barbosa Carvalho, Jessié Martins Gutierrez e Victor Câmera Pimentel pela amizade e companheirismo no decorrer do curso, pelas festas e momentos inesquecíveis.

Aos meus queridos colaboradores João Rezer, Jader Ruchel, Fabiano Carvalho, Michelle da Rosa, Jessié Gutierrez, Iria Farias, Sônia da Luz, André Bairros, Jamile Gonçalves, Roberta Schmatz, Rosélia Spanevello, Viviane Souza, Margarete Bagatini, Caroline Curry, Naiara Stefanello, Jucimara Baldissarelli, Jonas Serres, Pauline Costa, Karine Bizzi, Cláudia Bertonchelli pelo apoio e dedicação.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

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

EFEITO DA CURCUMINA SOB A ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDase E ACETILCOLINESTERASE EM LINFÓCITOS DE RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA DO CIGARRO

Autor: Jeandre Augusto dos Santos Jaques
Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Co-orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de agosto de 2010.

A exposição aos xenobióticos da fumaça do cigarro está relacionada com o comprometimento do sistema imune e o desenvolvimento de diversas doenças como a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e câncer de pulmão. A NTPDase e a acetilcolinesterase (AChE) são importantes enzimas envolvidas na regulação do sistema imune e alterações nas suas atividades tem sido descritas em várias doenças incluindo as relacionadas à exposição à fumaça do cigarro. A curcumina (Cur), polifenol obtido a partir de rizomas de *Curcuma longa* e amplamente utilizado na culinária e na medicina tradicional oriental, possui muitas atividades biológicas como antioxidante, anticarcinogênica e antiinflamatória. Tendo em vista a relevância dos linfócitos no estabelecimento e progressão de respostas imunes, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da curcumina na atividade das enzimas NTPDase e AChE em linfócitos periféricos (PL) e linfócitos pulmonares (LL) de ratos expostos à fumaça do cigarro. A padronização da separação dos linfócitos a partir de tecido pulmonar foi realizada com o objetivo de otimizar a viabilidade celular e a pureza da separação, utilizando-se como base os protocolos de separação de linfócitos periféricos e pulmonares de seres humanos. Os procedimentos experimentais para a avaliação do efeito da curcumina sob a atividade das enzimas NTPDase e AChE em linfócitos de ratos expostos à fumaça do cigarro foram divididos em duas etapas. Primeiramente, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: veículo; Cur 12.5 mg/kg, Cur 25 mg/kg; Cur 50 mg/kg. Na segunda etapa experimental os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: veículo; cigarro; cigarro e Cur 12.5 mg/kg; cigarro e Cur 25 mg/kg; cigarro e Cur 50 mg/kg. A curcumina foi diluída em óleo de milho, administrada por gavagem oral, não excedendo 1 ml/kg de massa corpórea. O tratamento com a curcumina e com a fumaça do cigarro foi realizada uma vez por dia, cinco dias por semana, durante trinta dias. A curcumina foi administrada e, após aproximadamente dez minutos, os grupos fumantes eram expostos à fumaça de quatro cigarros comerciais (0,9 mg nicotina, 10 mg alcatrão cada) dentro de uma câmara de exposição. Os animais não expostos à fumaça do cigarro foram colocados em uma câmara equivalente, pelo mesmo período. Após trinta dias, os animais foram eutanasiados, os pulmões removidos e o sangue periférico coletado para a separação dos linfócitos. Com a padronização da técnica para a separação de linfócitos pulmonares foi obtido um percentual de linfócitos superior a 82% e ainda observou-se uma forte correlação entre a atividade da enzima usando ATP e ADP como substrato o que indica que os

resultados podem ser expressos tanto em miligramas de proteína, quanto em milhões de células quanto em milhões de células viáveis. Os resultados dos experimentos com a fumaça do cigarro demonstraram que o tratamento com a curcumina preveniu as alterações observadas nos animais expostos à fumaça do cigarro como a diminuição na hidrólise de ATP e ADP em PL e LL, e o aumento da atividade da AChE em PL. Analisando os resultados obtidos, sugere-se que o tratamento com a curcumina foi protetor, uma vez que as altas concentrações de ATP estão positivamente relacionadas com inflamação e dano tecidual, e as lesões enfisematosas observadas no grupo exposto à fumaça do cigarro não foram observadas com os tratamentos com a curcumina.

Palavras-chave: linfócitos; curcumina; NTPDase; acetilcolinesterase; fumaça do cigarro.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF CURCUMIN IN THE NTPDase AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN CIGARETTE SMOKE EXPOSED RATS

Author: Jeandre Augusto dos Santos Jaques
Advisor: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Co-advisor: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Place and Date: Santa Maria, august 19th, 2010.

The exposure to the cigarette smoke xenobiotics is related with a compromised immune system and the development of many diseases such as Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and lung cancer. The NTPDase and acetylcholinesterase (AChE) are important enzymes involved in the regulation of immune system and alterations in their activities have been showed in many diseases including the related with cigarette smoke-exposure. The curcumin (Cur), polyphenol isolated from the rhizomes of *Curcuma longa* and widely employed in the culinary and oriental traditional medicine, has many biological activities such as antioxidant, anticarcinogenic and antiinflammatory. Considering the relevance of lymphocytes in the establishment and progression of immune responses, the purpose of this study was to evaluate the effect of curcumin in the NTPDase and AChE activities in peripheral lymphocytes (PL) and lung lymphocytes (LL) from rats exposed to cigarette smoke. The establishment of a protocol to lung lymphocytes separation using the lung tissue was performed with the objective of optimize the cellular viability and the purity of separation, using as references the protocols for separation of human peripheral and lung lymphocytes. The experimental procedure to evaluate the effect of curcumin on the NTPDase and AChE in lymphocytes from rats exposed to the cigarette smoke was divided in two sets of experiments. In the first set, the animals were randomly divided into four groups: Vehicle; Cur 12.5 mg/kg; Cur 25 mg/kg; Cur 50 mg/kg. In the second experimental set, the animals were divided into 5 groups: Vehicle; smoke exposed; smoke and Cur 12.5 mg/kg; smoke and Cur 25 mg/kg; smoke and Cur 50 mg/kg. Curcumin was diluted with corn oil, administered by oral gavage, not exceeding 1 ml/kg body weight. The treatment with curcumin and cigarette smoke was carried out once a day, 5 days each week, during 30 days. It was administered the curcumin or corn oil, and approximately 10 minutes later, the smoking groups were exposed to the sidestream smoke of four commercial cigarettes (nicotine 0.9 mg, tar 10 mg each) inside a whole-body smoke exposure chamber. Control animals were placed in an equal chamber for the same amount of time. After thirty days, the animals were euthanized, the lung was removed and the peripheral blood collected for separation of lymphocytes. With the standardization of the protocol to the separation of lung lymphocytes it was achieved a percentage of lymphocytes higher than 82% and it was observed a strong correlation between the enzyme activity using ATP and ADP as substrates, which indicates that the results can be expressed in milligram of protein, millions of cells and millions of viable cells. The results from the experiments with the cigarette smoke exposure demonstrated that the treatment with curcumin prevented the alterations

observed in the cigarette smoke-exposed animals such as the decrease of ATP and ADP hydrolysis in PL and LL, and the increase of AChE activity in PL. We suggest that the treatment with curcumin was protective, since the high concentrations of ATP are positively related with inflammation and tissue damage, and the emphysematous damages observed in cigarette smoke-exposed was not observed in the groups treated with curcumin.

Keywords: lymphocytes; curcumin; NTPDase; acetylcholinesterase; cigarette smoke.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
AChRs	receptores de ACh
ACRs	regiões conservadas da apirase
ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
AMPC	AMP cíclico
ATP	adenosina trifosfato
BuChE	butirilcolinesterase
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CO	monóxido de carbono
DCs	células dendríticas
ChAT	colina aciltransferase
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
E-NTPDases	ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
EROs	espécies reativas de oxigênio
GMPc	GMP cíclico
Hb	Hemoglobina
I κ B α	inibidor do NF- κ B
IL- β	interleucina β
IL-1	interleucina 1
IL-1R1	interleucina 1R1
IL-8	interleucina 8
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfato
LL	linfócitos isolados de tecido pulmonar
LMCs	células mononucleares de pulmão
mAChRs	receptores muscarínicos de acetilcolina
MMPs	metaloproteinases elastolíticas
nAChRs	receptores nicotínicos de acetilcolina
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NTPDase	nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

NK	<i>natural killer</i>
PAS	sítio aniônico periférico
PBMCs	células mononucleares de sangue periférico
PL	linfócitos periféricos
PLC	fosfolipase C
PMNs	células polimorfonucleares
PPE	elastase pancreática
SFB	soro fetal bovino
SMCs	células musculares lisas
SNC	sistema nervoso central
T _H 1	<i>T helper 1</i>
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
UTP	uridina trifosfato

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1. Constituintes mais importantes da fumaça do tabaco	22
Figura 1. Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina	24
Figura 2. Estrutura molecular e assimétrica da AChE	27
Figura 3. Ilustração do sítio esterásico da AChE contendo a tríade catalítica e interação com o substrato	28
Figura 4. Estrutura dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina	30
Figura 5. Estrutura das enzimas da família NTPDase (1 – 8)	32
Figura 6. Estrutura das enzimas da família NTPDase (1-6) e ACRs	34
Figura 7. Papel fisiológico da NTPDase no endotélio vascular	35
Figura 8. Isolamento, extração e estrutura da curcumina	38
Figura 9. Estrutura química da curcumina	39

MANUSCRITO 1

Figure 1. Histology of mononuclear cells isolated from whole blood and from lung tissue	63
Figure 2. Pearson's correlation coefficients (r) between NTPDase activity in blood from mononuclear cells using ATP as substrate expressed by mg of protein (a) and million of cells, (b) million of viable cells, and (c) between million and million of viable cells	64

Figure 3. Pearson's correlation coefficients (r) between NTPDase activity in blood from mononuclear cells using ADP as substrate expressed by mg of protein (a) and million of cells, (b) million of viable cells, and (c) between million and million of viable cells	65
---	----

Figure 4. Pearson's correlation coefficients (r) between NTPDase activity in lung mononuclear cells using ATP as substrate expressed by mg of protein (a) and million of cells, (b) million of viable cells, and (c) between million and million of viable cells	66
---	----

Figure 5. Pearson's correlation coefficients (r) between NTPDase activity in lung mononuclear cells using ADP as substrate expressed by mg of protein (a) and million of cells, (b) million of viable cells, and (c) between million and million of viable cells	67
---	----

Table 1. Comparison of blood and lung separated mononuclear cells viability, WBC count, differential and NTPDase activity using ATP or ADP as substrate and expressed by mg of protein, million and million of viable cells...	68
---	----

MANUSCRITO 2

Figure 1. Histological aspects of rat lung tissue from control, cigarette smoke-exposed and treated with curcumin	95
--	----

Figure 2. NTPDase activity in peripheral blood lymphocytes from cigarette smoke exposed rats treated with curcumin using ATP (A, B) and ADP (C, D) as substrate	96
--	----

Figure 3. NTPDase activity in lung lymphocytes from cigarette smoke exposed rats treated with curcumin using ATP (A, B) and ADP (C, D) as substrate	97
--	----

Figure 4. AChE activity in peripheral blood (A, B) and lung (C, D) lymphocytes from cigarette smoke exposed rats treated with curcumin	98
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	12
APRESENTAÇÃO	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Fumo	20
3.1.1 Tabaco	20
3.1.2 Fumaça do cigarro	20
3.1.3 Complicações pulmonares	23
3.2 Sistema colinérgico	24
3.2.1 Colinesterases	25
3.2.2 Acetilcolinesterase	26
3.2.2.1 Estrutura da acetilcolinesterase	26
3.2.2.2 Mecanismo de ação	28
3.2.3 Sistema colinérgico <i>versus</i> sistema imune	29
3.3 Sistema purinérgico	30
3.3.1 Nucleotídeos de adenina	30
3.3.2 Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina	31
3.3.2.1 Família NTPDase	31
3.3.2.2 NTPDase1	33
3.3.2.3 Papel fisiológico da NTPDase1	34
3.3.3. Receptores purinérgicos	35
3.3.4 Sistema purinérgico <i>versus</i> sistema imune	36
3.4 Co-existência e co-liberação de ACh e ATP	37
3.5 Curcumina	38
3.5.1 Propriedades biológicas da curcumina	38

3.5.2 Curcumina e doenças pulmonares	39
4 MANUSCRITOS	41
4.1 Manuscrito 1: A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of NTPDase activity	42
4.2 Manuscrito 2: Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin	69
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	99
6 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	106

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos, os quais se encontram no item Manuscritos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se nos próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos contidos neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão de Literatura e Discussão desta dissertação.

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Manuscrito 1: Analytical Biochemistry

Manuscrito 2: Biochemistry and Cell Biology

1 INTRODUÇÃO

A exposição à fumaça do cigarro, tanto ativa quanto passiva, é conhecida por ser o principal fator causal provado epidemiologicamente de diversas doenças pulmonares como o enfisema, a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e o câncer de pulmão (KUPER et al., 2002; STÄMPFLI & ANDERSON, 2009). Relevantes para o surgimento destas doenças são os efeitos da fumaça do cigarro sob o sistema imune, os quais causam tanto danos e efeitos pró-inflamatórios quanto efeitos imunossupressores (SOPORI, 2002; BARNES, 2004).

Sabe-se que a fumaça do cigarro afeta diversos mecanismos de defesa como o epitélio respiratório, macrófagos alveolares, células *natural killer* (NK), células dendríticas (DCs), células B e T (STÄMPFLI & ANDERSON, 2009). Particularmente de interesse para este estudo são os efeitos da exposição à fumaça do cigarro sob os linfócitos. Os linfócitos B são abundantemente presentes nos pulmões de pessoas expostas ao cigarro, mas seu papel na progressão de doenças pulmonares ainda é obscuro. Similarmente, células TCD8⁺, as quais codificam proteínas citolíticas e podem ativar macrófagos alveolares a produzir metaloproteinases (MMPs), estão amplamente presentes nos pulmões de fumantes crônicos (GRUMELLI et al., 2004).

O marcador de superfície CD39 é um membro da família das ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) reconhecido como um marcador de ativação de linfócitos B (MALISZEWSKI et al., 1994). Esta ectoenzima catalisa a desfosforilação seqüencial de nucleosídeos trifosfatos a nucleosídeos monofosfatos (ATP → ADP → AMP) (BURCH & PITCHER, 2006), regulando os níveis pericelulares destes nucleotídeos e conseqüentemente conduzindo, em parte, o curso da resposta imune (DWYER et al. 2007).

A síntese de citocinas, moléculas sinalizadoras envolvidas no desencadeamento da resposta imune, é regulada pelo efeito agonista da acetilcolina (ACh) com os receptores do tipo $\alpha 7nAChR$. Ainda, a acetilcolinesterase (AChE) é a enzima envolvida na hidrólise da acetilcolina em colina e acetato, assim, regulando a sinalização realizada pela ACh. Este sistema responsável pela regulação da resposta imune é denominado de “via colinérgica antiinflamatória” (PAVLOV & TRACEY, 2005).

A curcumina (diferuloilmetano) é um polifenol e principal pigmento da planta conhecida como turmeric (*Curcuma longa* Linn). Ela possui diversas propriedades biológicas como antioxidante (KAMAT et al., 2008; ILBEY et al., 2009), antiinflamatória (KOWLURU & KANWAR, 2007), neuroprotetora (REETA et al., 2009; TANG et al., 2009), anticarcinogênica e antimicrobiana (RAO et al., 2005; DE et al., 2009), trombossupressora (PAN et al., 2007), protetora cardiovascular (AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009), hipoglicêmica (ARUN & NALINI, 2002), e protetora contra artrite (DEODHAR et al., 1980). A sua propriedade antiinflamatória é uma das características mais bem estudadas da curcumina, sendo investigada em uma ampla variedade de doenças e manifestações clínicas como a retinopatia diabética (KOWLURU & KANWAR, 2007), obesidade induzida pela inflamação (AGGARWAL, 2010), infecção por *Helicobacter pylori* (KOOSIRIRAT et al., 2010) e inflamação hepática induzida por químicos (WU et al., 2010).

Neste contexto, baseando-se nos achados que demonstram que a curcumina é um potente agente antiinflamatório, o propósito deste estudo foi avaliar o efeito da curcumina na atividade das enzimas NTPDase e AChE em linfócitos de sangue periférico e de pulmão de ratos expostos à fumaça do cigarro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da curcumina na atividade das enzimas NTPDase e acetilcolinesterase em linfócitos periféricos e pulmonares de ratos expostos à fumaça do cigarro.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar uma técnica para a separação de linfócitos de pulmão de ratos Wistar.
- Avaliar os efeitos da curcumina administrada oralmente nas doses de 12, 25 e 50 mg/kg na atividade das enzimas NTPDase e acetilcolinesterase em linfócitos de pulmão e de sangue periférico de ratos expostos à fumaça de quatro cigarros ao dia.
- Verificar os efeitos da curcumina nas lesões teciduais causadas pela exposição à fumaça do cigarro pela análise histopatológica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fumo

3.1.1 Tabaco

O tabaco é uma planta da família das solanáceas e a *Nicotina tabacum* é a espécie mais utilizada para a produção do cigarro. O cultivo desta planta é trabalhoso e delicado, pois se trata de uma cultura onde existe o emprego abundante de agrotóxicos como inseticidas organofosforados e organoclorados. Quimicamente, após a confecção, o cigarro é constituído por várias substâncias tóxicas que variam de acordo com o tipo de tabaco, tipo do solo, clima, doses e composição dos agrotóxicos, tipo de colheita, grau de amadurecimento e com o tratamento dado a planta depois da colheita (DELLA ROSA, 1981).

3.1.2 Fumaça do cigarro

A fumaça do cigarro resulta da combustão incompleta do cigarro, já que a combustão completa somente se realiza na brasa, onde a temperatura atinge 850°C. Durante a combustão, ocorrem três tipos principais de reação: pirólise, pirossíntese e destilação (DELLA ROSA, 1981). Na pirólise, também chamada decomposição térmica, as substâncias orgânicas do tabaco são fracionadas em pequenas moléculas devido à alta temperatura, oxigenação do fogo e atmosfera rica em hidrogênio. Na pirossíntese, síntese pelo calor, os elementos oriundos da pirólise recombina-se em novos componentes que originalmente não existiam no tabaco. A destilação é o processo através do qual se evapora ou se condensa um líquido, com o fim de obtê-lo puro ou separado de outro, por exemplo, a nicotina (SALGADO, 1997).

A fumaça que sai do cigarro pela boca do fumante durante a tragada é chamada de fumaça principal ou *mainstream smoke*. Nesta via, a fumaça sai diretamente do cigarro e é inalada para o sistema respiratório do usuário. A fumaça lateral que emerge da queima espontânea do cigarro é chamada de *sidestream smoke* (BAKER & ROBINSON, 1990).

Os gases e vapores dispersos na fase gasosa são formados na pirólise e pirossíntese. Os constituintes mais importantes desta fase, sob o ponto de vista toxicológico são: monóxido de carbono (CO), óxido de nitrogênio, amônia, aldeídos e nitrosaminas voláteis (nitrilas) (Quadro 1) (CARL, 1998). A fase particulada, também chamada de condensada é constituída de um aerossol contendo substâncias voláteis incluídas na fase de dispersão. Existem em média 5×10^9 partículas por mL de fumaça, com tamanho que varia de 0,1 a 0,8 μm . Os filtros somente retêm partículas com diâmetro igual ou superior a 0,3 μm . Segundo Rosemberg (1981), os constituintes mais importantes desta fase são: alcatrão, nicotina e água.

O alcatrão caracteriza-se por ser uma substância particulada, inalada quando o fumante traga o cigarro. Cada partícula de alcatrão é composta por uma enorme variedade de produtos químicos orgânicos e inorgânicos, destes os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos tem ação carcinogênica oncoincidiadora comprovada. Destacam-se o benzopireno, dibenzopireno e o benzantraceno (LARINI, 1999).

Constituinte	Concentração/ cigarro
FASE GASOSA	
Monóxido de carbono	17 mg
Amônia	60 μg
Acroleína	70 μg
Acetaldeído	800 μg
Dimetilnitrosamina	13 μg
Acetonitrila	123 μg
Ácido cianídrico	110 μg
FASE PARTICULADA	
Nicotina	1,5 mg
Fenol	85 μg
Cresóis (3 compostos)	70 μg

Benz(a)pireno	20 µg
Benz(a)antraceno	40 µg
Nitrosonicotina	250 µg
Nitrosoanatabina	1,5 µg
Cádmio	0,1 µg

Quadro 1 – Constituintes mais importantes da fumaça do tabaco (SALGADO, 1997).

O alcatrão contém ainda alguns tipos de íons metálicos, tais como: chumbo, cádmio, níquel e arsênio. No organismo, os metais citados concentram-se principalmente no fígado, rins e pulmões, tendo uma meia vida biológica de 10 a 30 anos (KALCHER et al., 1993). Existem substâncias que são adicionadas ao tabaco para melhorar suas características organolépticas. Outros compostos podem aparecer na fumaça como contaminantes, por exemplo, alguns agrotóxicos (SALGADO, 1997).

Farmacologicamente, a nicotina é o princípio ativo mais potente da fumaça do cigarro e uma das substâncias mais tóxicas conhecidas. De acordo com Rosemberg (1981) a dose letal média para o homem situa-se entre 40 a 60 mg (1 cigarro contém de 0,3 a 1 mg). Ela é absorvida com avidez pela pele, mucosas e pulmões. A via pulmonar produz efeitos no sistema nervoso central (SNC) perceptíveis em pouco menos de sete segundos (NAKAIAMA, 1993). Como a fumaça do cigarro tem caráter ácido, a nicotina permanece na forma não protonada, não sendo absorvida pela mucosa bucal, e sim pelos alvéolos (ROSEMBERG, 1981).

Ao fumar um cigarro, o fumante inala de 20 a 25% da quantidade total de nicotina através da corrente primária; a porção restante é destruída pela pirólise e é perdida na corrente secundária. Da quantidade tragada, 90% da nicotina são absorvidos rapidamente, de forma progressiva, atingindo um valor máximo dentro de 10 minutos, possuindo uma meia vida biológica de 2 horas para o tabagista crônico (NAKAIAMA, 1993).

A nicotina liga-se fracamente a proteínas plasmáticas, o que favorece sua distribuição sistêmica, atravessa a placenta e é encontrada no leite materno, sofre metabolização hepática e sua excreção renal é dependente do pH urinário, sendo favorecida pela urina ácida (LARINI & SALGADO, 1997). O alcalóide nicotina, induz

sintomatologias de natureza cardiovascular como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial como vasoconstrição, especialmente dos capilares (GYTON, 1985).

Outro químico altamente tóxico presente na fumaça do cigarro é o cádmio. Sua absorção pulmonar é maior que a gastrintestinal, chegando a uma taxa de 50% do que é inalado, enquanto que em torno de 5% do que é ingerido é absorvido pela via gastrintestinal (GOYER, 1996). O cádmio inibe sistemas enzimáticos, pois tem a capacidade de deslocar metais de metaloenzimas devido ao fato de ter afinidade por grupamentos sulfidrílicos (MITCHEL et al., 1977; FURST et al., 1998; PEIXOTO et al., 2003). O metal interfere na fosforilação oxidativa, nos canais de cálcio da membrana plasmática, nas Ca^{2+} -ATPases, impede o reparo do DNA (provável mecanismo de indução de tumores) (FURST et al., 1998).

O monóxido de carbono (CO) resulta da combustão incompleta do cigarro, sendo rapidamente absorvido ao nível de aovéolo pulmonar, tem alto poder de difusão plasmática e se fixa à hemoglobina (Hb). A formação do CO altera o transporte de O_2 , e a intoxicação pelo CO produz hipóxia tissular, resultante do transporte diminuído de O_2 (GYTON, 1985).

3.1.3 Complicações pulmonares

Sabe-se que a exposição à fumaça do cigarro, ativa ou passiva, está relacionada com um amplo espectro de complicações para o fumante, como: câncer de pulmão, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), risco aumentado de infecções bacterianas e virais, tuberculose e asma (KUPER et al., 2002).

O cigarro compromete diretamente a integridade do epitélio respiratório, aumenta a permeabilidade desta barreira física e compromete a manutenção das mucosas (JONES et al., 1980; BURNS et al., 1989; DYE & ADLER, 1994). Além disso, a exposição à fumaça do cigarro leva a um aumento no número de macrófagos aoveolares e também à ativação destas células para a produção de mediadores pró-inflamatórios, espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas (De BOER et al., 2000; RUSSELL et al., 2002).

Diversos estudos têm demonstrado que o número de células NK e sua atividade estão diminuídas em pacientes fumantes comparados com os não fumantes (TOLLERUD et al., 1989). Estudos clínicos sugerem que o número de células dendríticas (DCs) maduras está reduzido nas vias aéreas de pacientes fumantes com DPOC (JAHNSEN et al., 2006). A presença de linfócitos B e T é abundante em pulmões de fumantes. Sabe-se que as células T podem ativar os macrófagos alveolares para produzirem metaloproteinases o que leva à progressão da doença pulmonar (GRUMELLI et al., 2004; HAUTAMAKI et al., 1997).

3.2 Sistema colinérgico

A ACh (Fig.1) é o neurotransmissor endógeno das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos sistemas nervoso central e periférico. É sintetizada na junção neuroefetora e ganglionar a partir do acetil-CoA, um produto do metabolismo celular, e da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídeos da dieta, pela ação da enzima colina aciltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6) (SOREQ & SEIDMAN, 2001; PRADO et al., 2002).

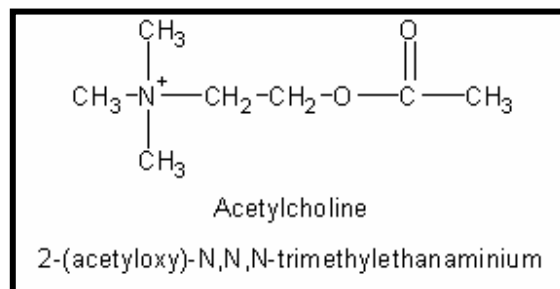


Figura 1 - Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina.

(<http://www.facultystaff.vwc.edu/acetylcholine.gif>)

A síntese da ACh é finamente regulada, e esta é acondicionada em vesículas que protegem o neurotransmissor da hidrólise pela ação de colinesterases intracelulares. Dois principais mecanismos contribuem na regulação dos níveis de ACh nas células: inibição da ChAT por retroalimentação induzida por ACh e pela disponibilidade dos seus precursores, acetil-CoA e colina. A propagação do

potencial de ação no terminal nervoso desencadeia a liberação do neurotransmissor por exocitose num mecanismo Ca^{2+} -dependente (PRADO et al., 2002).

A ACh é amplamente distribuída no sistema nervoso central (SNC), onde seus efeitos são principalmente excitatórios, efetivados pela ativação de receptores específicos, designados como receptores colinérgicos e, subdivididos em dois grandes grupos: nicotínicos e muscarínicos, os quais transmitem os sinais por mecanismos diferentes (RANG et al., 2004).

Os receptores muscarínicos estão em sua maioria acoplados à proteína G e promovem a ativação de canais iônicos e uma variedade de segundos mensageiros, resultando na despolarização, dependendo do tipo de canal que estiver associado a este receptor. Muitos dos efeitos comportamentais associados às vias colinérgicas parecem ser produzidos pela ação da ACh sobre estes receptores (SOREQ & SEIDMAN, 2001; RANG et al., 2004). Os receptores nicotínicos são compostos por cinco subunidades designadas: α , β , γ e δ . As subunidades α são expressas em duas formas α_1 e α_2 , e são necessárias duas moléculas de ACh para estimular o receptor, que ao se ligarem produzem mudanças conformacionais permitindo a entrada de cátions. Estes receptores atuam também ao facilitar a liberação de outros transmissores, como a dopamina (UNGLESS & CRAGG, 2006).

Após exercer sua ação, a ACh sofre hidrólise pelas colinesterases com a liberação de ácido acético e colina, que é recaptada em parte para o terminal pré-sináptico, através de um mecanismo de recaptção de alta afinidade (SOREQ & SEIDMAN, 2001).

3.2.1 Colinesterases

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de funções como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos. Estas enzimas são classificadas de acordo com as suas propriedades catalíticas e especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ et al., 1993).

Existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE). A AChE (EC 3.1.1.7) também chamada de colinesterase verdadeira ou específica hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a ACh) e a BuChE (EC 3.1.1.8) ou pseudocolinesterase hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. A AChE é predominantemente encontrada em cérebro (10 vezes mais abundante que a BuChE), junção neuromuscular e eritrócitos. Já a BuChE, é principalmente encontrada em plasma, rins, fígado, intestino, pulmão e tem uma distribuição neuronal muito mais restrita que a AChE (MESULAM et al., 2002).

3.2.2 Acetilcolinesterase

Esta enzima possui um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica. Ela é responsável pela hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina. É uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular (MASSOULIÉ et al., 1993).

A AChE também foi localizada e identificada em linfócitos onde provavelmente apresenta um papel importante na regulação das funções imunes (KAWASHIMA & FUJII, 2000). Assim uma inibição ou ativação desta enzima pode ter conseqüências devastadoras no cérebro e em outros órgãos (MESULAN et al., 2002).

3.2.2.1 Estrutura da acetilcolinesterase

A AChE existe em duas classes gerais de formas moleculares: como oligômeros homoméricos simples de subunidades catalíticas e como associações heteroméricas de subunidades catalíticas e subunidades estruturais (MASSOULIÉ et al., 1993; TAYLOR & RADIC, 1994).

Os oligômeros homoméricos simples aparecem como: monômeros, dímeros e tetrâmeros, dando origem, assim, às formas globulares (G): G1, G2 e G4. As associações heteroméricas de subunidades catalíticas e subunidades estruturais resultam nas formas estruturais assimétricas (A): A4, A8 e A12 (Fig.2) (MASSOULIÉ et al., 1993). As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, provavelmente com o intuito de exportação, ou então se apresentam associadas à membrana externa da célula por meio de uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou de um glicofosfolípídeo acoplado. A AChE que se apresenta nas formas heteroméricas encontra-se associada com a lâmina basal externa na sinapse e é particularmente abundante na junção neuromuscular (TAYLOR & BROWN, 1999). A maior parte da AChE encontrada no tecido nervoso é do tipo globular, predominantemente G4, ligada à membrana (MASSOULIÉ et al., 1993).

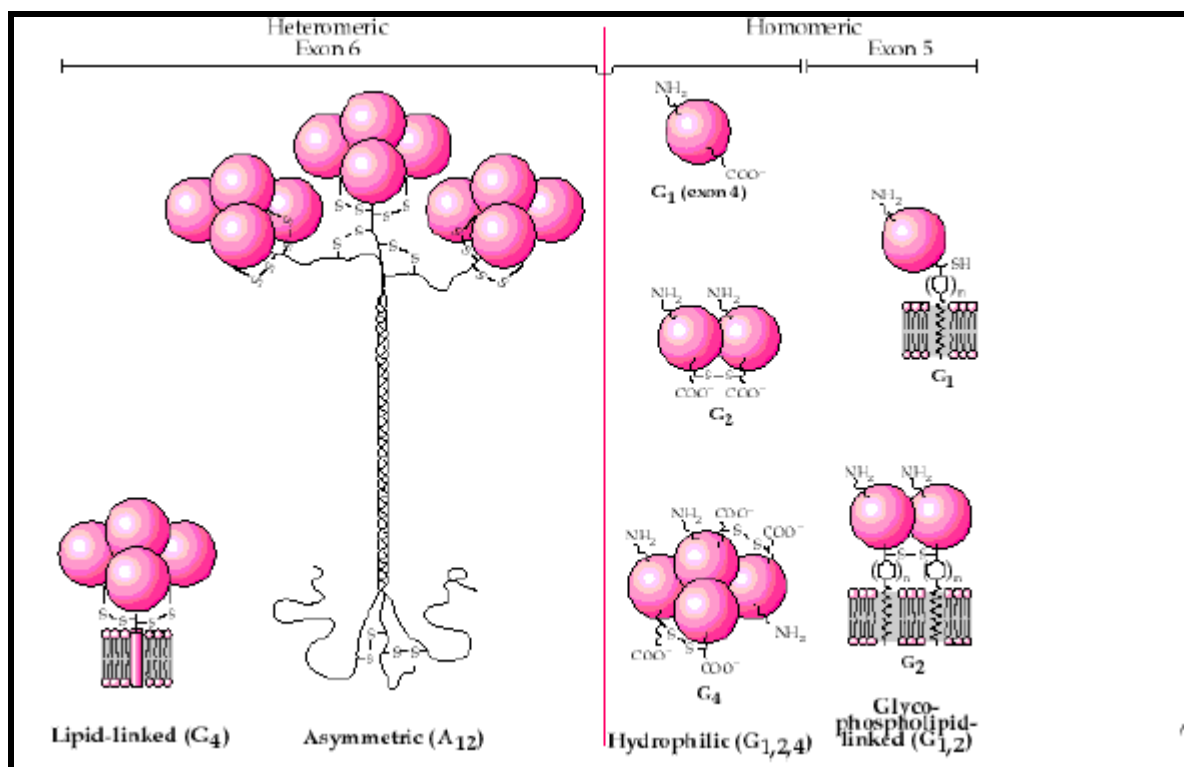


Figura 2 – Estrutura molecular (G1, G2, G4) e assimétrica (A12) da AChE (http://www.chemistry.emory.edu/.../ach_inactivation.htm)

3.2.2.2 Mecanismo de ação

A estrutura tridimensional da AChE demonstra que seu sítio ativo é formado por resíduos da chamada tríade catalítica: serina 203, histidina 447 e glutamato 334. A visão tradicional do sítio ativo da AChE foi considerada como tendo dois subsítios: um sítio carregado negativamente ou aniônico, ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga, e um sítio esterásico contendo os verdadeiros resíduos catalíticos, o qual aloja o grupamento éster e carbonila da ACh (Fig.3A) (TAYLOR & BROWN, 1999). Um segundo sítio aniônico que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (*peripheral anionic site*-PAS), foi proposto com base na ligação de compostos bis quaternários. Tem sido proposto que este sítio possa estar envolvido na reação de determinados inibidores da enzima ou ainda na inibição por excesso de substrato (NUNES-TAVARES et al., 2002).

A AChE é classificada como uma serina hidrolase e seu mecanismo catalítico assemelha-se ao de outras hidrolases, onde o grupamento hidroxila da serina torna-se altamente nucleofílico por um sistema de reposição de cargas que envolvem o grupamento carboxila do glutamato, o imidazol da histidina e hidroxila da serina (SUSSMAN et al., 1991).

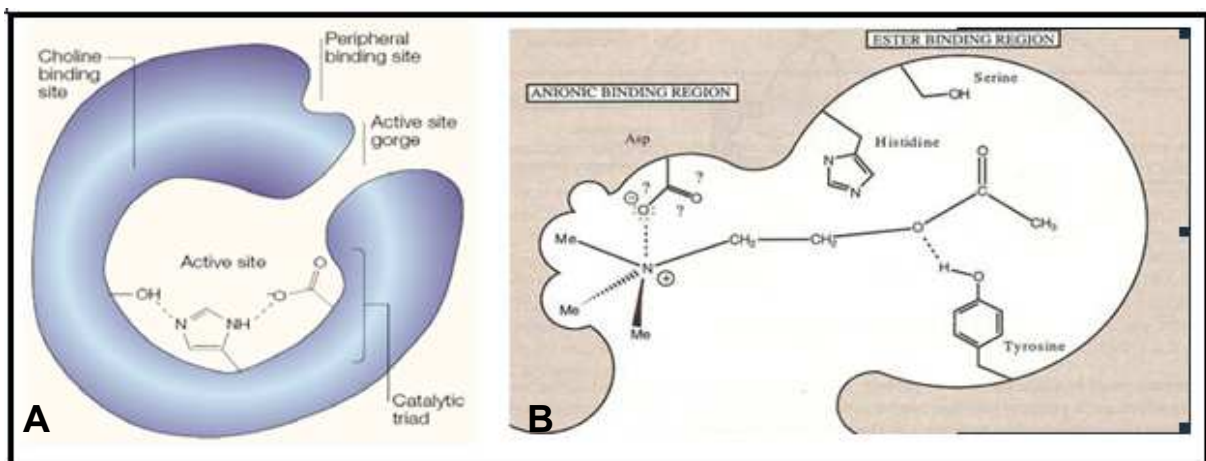


Figura 3 – A) Sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico (PAS). Adaptado de Soreq & Seidman (2001). B) Interação do substrato com o sítio esterásico da AChE. Adaptado de Patric (2001).

A primeira etapa da ligação enzima-substrato se dá pelo ataque nucleofílico da hidroxila da serina do local esterásico sobre o grupamento éster carbonila do

substrato, promovendo a quebra da ligação éster (Fig.3B). Durante o ataque enzimático sobre o éster, é formado um intermediário tetraédrico entre a enzima e o éster que se rompe e forma um conjugado acetil-enzima, com a liberação concomitante da colina. O complexo acetil-enzima é passível de hidrólise e esta resulta na liberação de acetato e na regeneração da enzima ativa (TACHIKAWA et al., 2005). O processo enzimático é extraordinariamente eficiente por causa da proximidade do nucleófilo serina e a catálise ácido/básica da histidina, sendo que uma molécula da ACh é hidrolisada em 100 microsegundos (PATRICK, 2001).

3.2.3 Sistema colinérgico *versus* sistema imune

O envolvimento da acetilcolina (ACh) na modulação de respostas imunes dependentes de células T foi primeiramente proposto por Maslinski (1989). Desde então, ensaios de *binding* confirmaram a presença de receptores muscarínicos (mAChRs) em linfócitos (GORDON et al., 1978; ZALCMAN et al., 1981; ADEM et al., 1986), e agonistas de mAChRs têm demonstrado aumentar os níveis de GMPc, a citotoxicidade linfocítica (ILLIANO et al., 1973; STROM et al., 1974) e reduzir os níveis intracelulares de AMPc (MASLINSKI et al., 1988).

A síntese de citocinas, moléculas sinalizadoras envolvidas na resposta imune, é regulada pela interação de receptores $\alpha 7$ nAChR e seus agonistas, como a ACh. Assim, a AChE desempenha um papel importante na sinalização imune, regulando a disponibilidade de ACh. Este sistema responsável pela regulação da resposta imune é denominado de “via antiinflamatória colinérgica” (PAVLOV & TRACEY, 2005).

Kawashima e Fujii (2000) demonstraram que a ACh sangüínea é originada principalmente de linfócitos T, e que o estímulo de receptores do tipo mAChRs induz oscilações nas concentrações intracelulares de cálcio e ativa a expressão do gene da proteína c-fos, relacionada com o processo apoptótico, em linfócitos T e B.

3.3 Sistema purinérgico

3.3.1 Nucleotídeos de adenina

Os nucleotídeos de adenina tais como o ATP, ADP e AMP, e o nucleosídeo adenosina (Fig.4) atuam como moléculas sinalizadoras (ZIMMERMANN, 2001), mediando seus efeitos através de receptores purinérgicos localizados na superfície celular (ILLES & RIBEIRO, 2004). Estas moléculas estão presentes nos fluidos extracelulares em baixas quantidades micromolares devido a vários fatores como: a quantidade liberada, os mecanismos de recaptção, situações de lise celular e a presença de enzimas como as ectonucleotidases (RATHBONE et al., 1999).

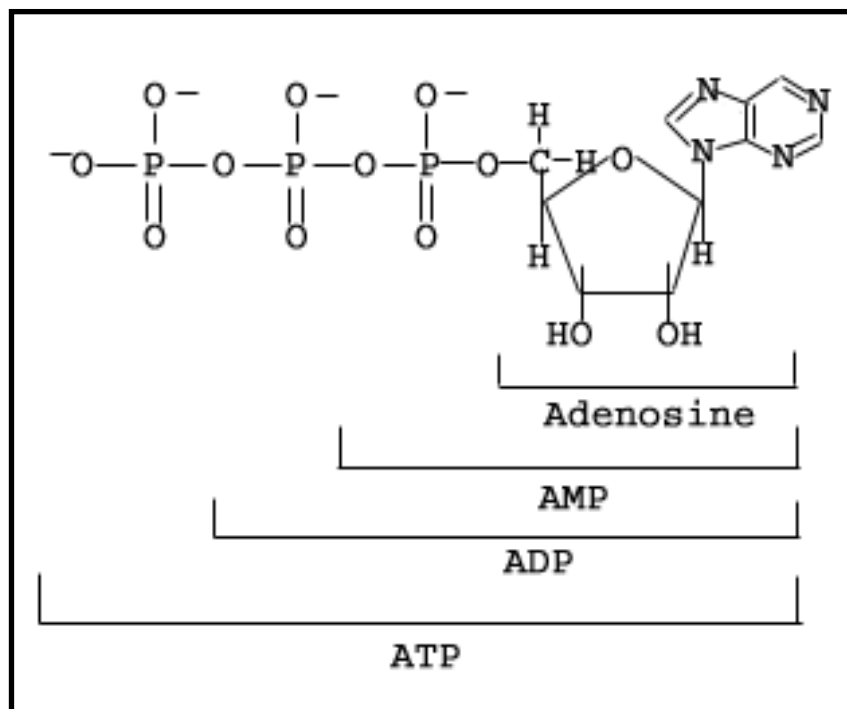


Figura 4 – Estrutura dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina.
(<http://textbookofbacteriology.net/metabolism.html>)

3.3.2 Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina

Os nucleotídeos de adenina extracelulares são hidrolisados por enzimas conhecidas como ecto-nucleotidases. Dentre estas, destacam-se a NTPDase (apirase, CD39, ATP difosfohidrolase) e a 5'-nucleotidase, duas enzimas capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como ATP, ADP e AMP a seus receptores específicos (ZIMMERMANN, 2001).

E-NTPDases (Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) é o termo genérico para designar uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (PAPANIKOLAOU et al., 2005). Estas enzimas hidrolisam tanto ATP como ADP, formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (CHAN et al., 1986; ZIGANSHIN et al., 1994). O AMP é subsequentemente convertido à adenosina pela 5'-nucleotidase, com a liberação de fosfato inorgânico (ROBSON et al., 2006).

As NTPDases são enzimas amplamente distribuídas na natureza, tendo sido bem caracterizadas em plantas, parasitas, insetos e em vários tecidos e células de mamíferos, como por exemplo em córtex cerebral, linfócitos, células endoteliais e plaquetas (BATTASTINI et al., 1991; SARKIS et al., 1995; PILLA et al., 1996; WANG & GUIDOTTI, 1998; LEAL et al., 2005).

3.3.2.1 Família NTPDase

As enzimas da família das NTPDases são expressas pelos genes ENTPD. Oito membros desta família já foram identificados e diferem quanto à especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; BIGONNESSE et al., 2004). Quatro das NTPDases estão localizadas na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular (NTPDase1, 2, 3, 8). As NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular e NTPDase 4 e 7 são enzimas intracelulares cujos centros ativos estão direcionadas para o lúmen das organelas citoplasmáticas (Fig.5) (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006).

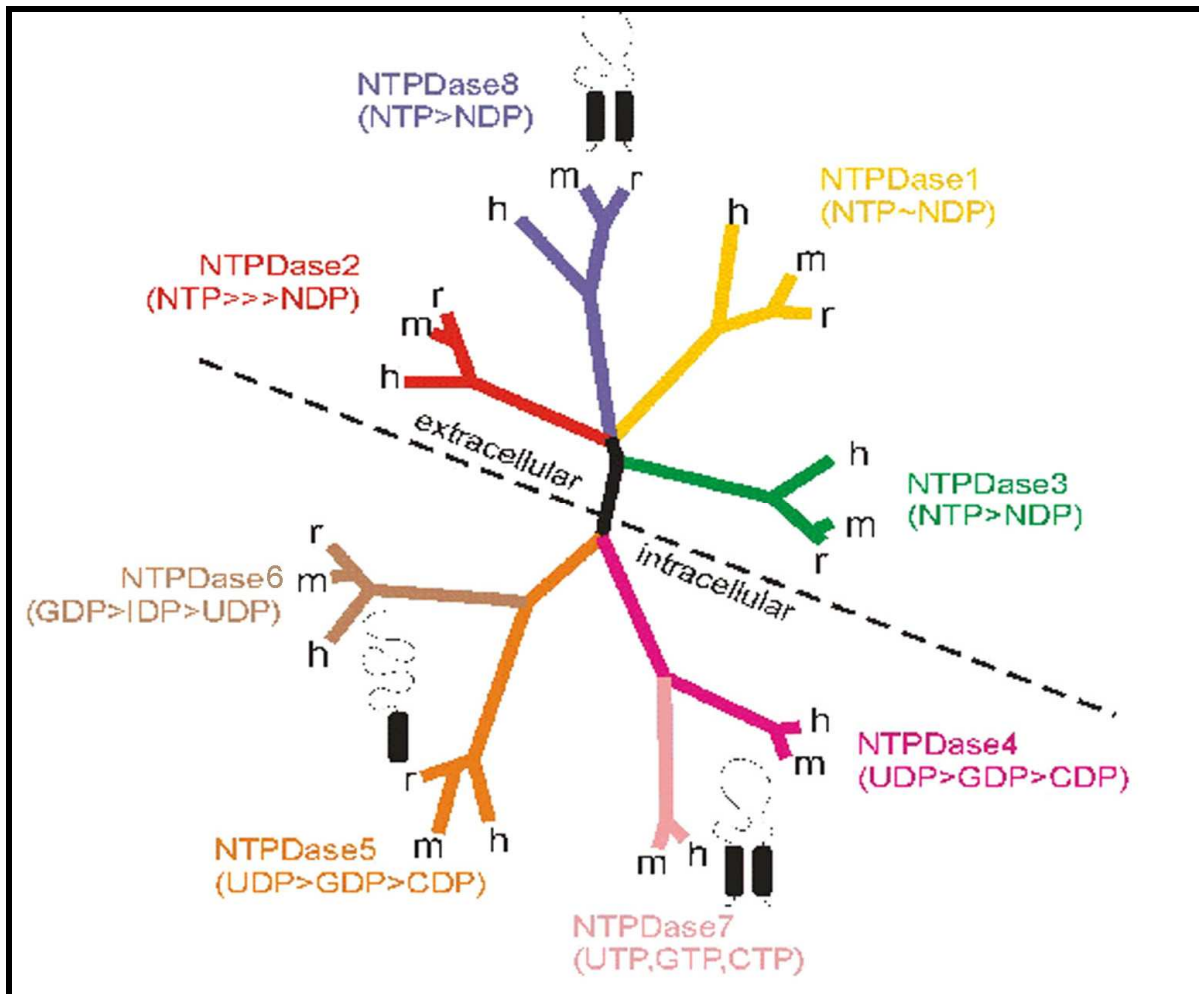


Figura 5 – Estrutura das enzimas da família NTPDase (1 – 8). Adaptado de Robson et al. (2006).

A NTPDase1 é a principal ectonucleotidase presente na rede vascular, podendo também estar presente a NTPDase2 (ENJYOJI et al., 1999; ROBSON et al., 2006).

Estas enzimas apresentam um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos. A análise das seqüências de todas as NTPDases mostra a existência de cinco regiões conservadas as quais foram chamadas de *apyrase conserved regions* ACRs (ACR I – ACR V) e estão envolvidas na formação do sítio catalítico da enzima, para que ocorra a hidrólise dos nucleotídeos tri e difosfatos (SCHULTE et al., 1999; ZIMMERMANN, 2001; SÉVIGNY et al., 2002; ROBSON et al., 2006).

As regiões ACR I e ACR IV são similares aos domínios de ligação de fosfato β e γ da actina-hsp 70 hexoquinase. Uma mutação em um resíduo de ácido aspártico da região conservada ACR I e ACR IV reduz a atividade hidrolítica da NTPDase em mais de 90% (FLAHERTY et al., 1991; SMITH & KIRLEY, 1999). As NTPDases são

proteínas oligoméricas, cujos domínios transmembrana são responsáveis pela formação de tetrâmeros. Apresentam dois domínios transmembrana (domínio I e domínio II), de tamanhos similares, com segmentos NH₂ e COOH terminais citoplasmáticos e um grande domínio extracelular com a atividade enzimática formando uma grande fenda que compõe o sítio catalítico (VORHOFF et al., 2005). As NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão firmemente ancoradas na membrana através dos domínios transmembranas, os quais interagem entre seus monômeros (GRINTHAL & GUIDOTTI, 2002). Estes domínios podem movimentar-se durante o processo de ligação da enzima com o nucleotídeo e durante sua hidrólise (BORK et al., 1992).

Os subtipos da NTPDase diferem quanto a sua localização e função. As formas NTPDase 1, 2, 3 e 8 são diferenciadas de acordo com a sua preferência pelo substrato sendo dependentes de íons Ca²⁺ ou Mg²⁺ para realizarem sua atividade máxima (ZIMMERMANN, 2001). A NTPDase1, hidrolisa tanto ATP quanto ADP na mesma proporção, NTPDase 3 e 8 possuem maior afinidade pelo ATP, sendo classificadas como ecto-ATPases (KUKULSKI et al., 2005; ROBSON et al., 2006).

3.3.2.2 NTPDase1

A NTPDase (ATP difosfohidrolase, apirase, NTPDase1, Ecto/CD 39) foi a primeira enzima da família E-NTPDase a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Fig.6) (ZIMMERMANN, 2001). Esta enzima hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca²⁺ e Mg²⁺ (ZIGANSHIN et al., 1994).

Esta enzima vem sendo estudada nos últimos anos tanto em condições patológicas quanto em modelos experimentais (BONAN et al., 2000; LUNKES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005). A função geral da apirase tem sido atribuída à hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP e ADP e, portanto, dependendo da localização tecidual a atividade enzimática possui diferentes papéis fisiológicos (SARKIS et al., 1995; ZIMMERMANN, 1999; BONAN et al., 2001).

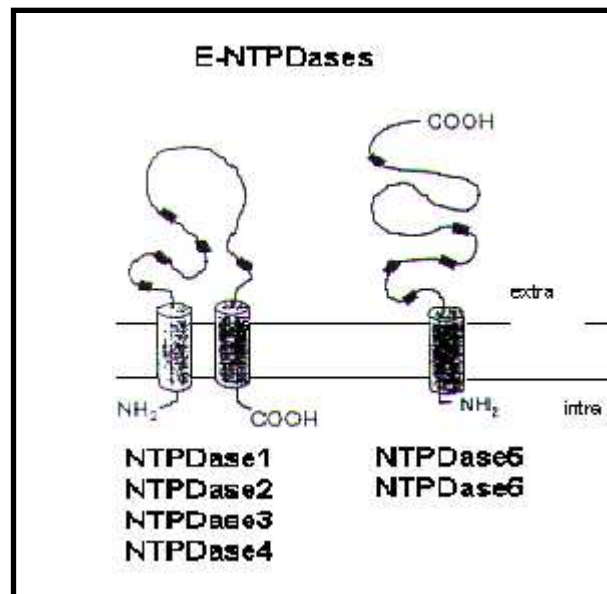


Figura 6 – Estrutura das enzimas da família NTPDase (1 – 6) e ACRs. Adaptado de Zimmermann (2001).

3.3.2.3 Papel fisiológico da NTPDase1

Os nucleotídeos modulam várias funções teciduais, como o fluxo sanguíneo, produção de secreções, inflamação e reações imunes. Influem nos processos que afetam o metabolismo celular, na adesão, ativação e migração celular (LUTHJE, 1989; NEARY & ABBRACCHIO, 2001). A sinalização purinérgica exerce um profundo impacto na proliferação, diferenciação e apoptose celular, pois influenciam na secreção de fatores de crescimento celular, citocinas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão e na síntese de ácido nítrico (ERLINGE, 1998; HOU et al., 2002). No sistema vascular a sinalização purinérgica está associada com o controle do tônus vascular pela liberação de ATP dos nervos e das células vasculares. A migração, proliferação e apoptose das células vasculares constituem um importante papel no desenvolvimento das doenças arteriais como a arterosclerose (SCHACHTER, 1990). A NTPDase1, sendo uma enzima que hidrolisa nucleotídeos, desempenha um importante papel na trombo-regulação e controle dos processos inflamatórios nos pacientes que apresentam hipercolesterolemia (PAPANIKOLAOU et al., 2005). Estas enzimas inibem a agregação plaquetária, regulam a liberação de

fatores mitogênicos das células musculares lisas (SMCs) e fatores de crescimento plaquetário e a secreção de citocinas inflamatórias ao hidrolisar os nucleotídeos na membrana vascular (LUNKES et al., 2003; MARKUS et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005; ROBSON et al., 2006) (Fig.7).

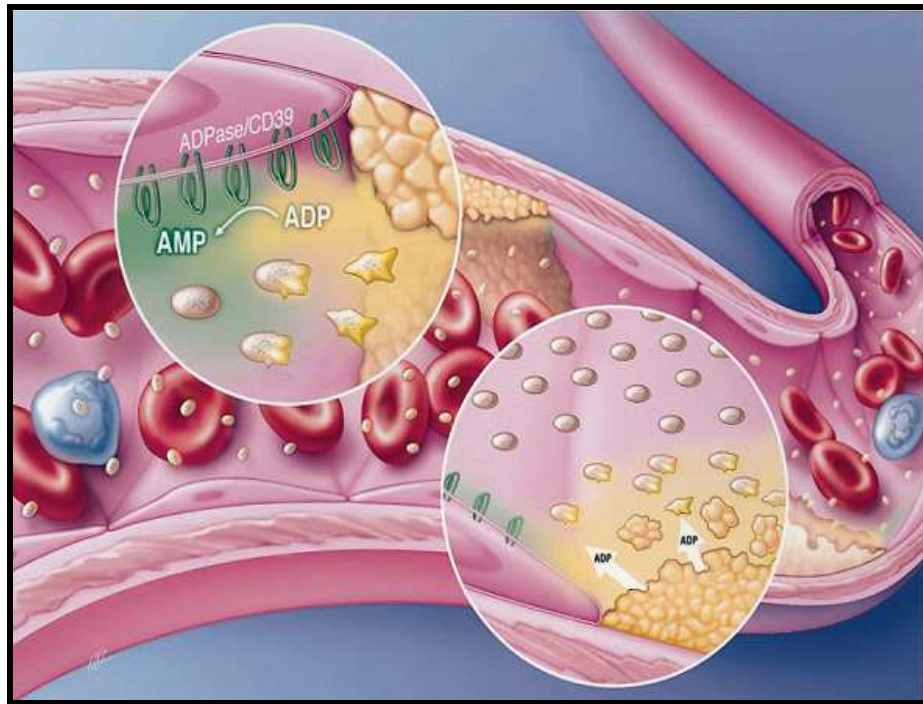


Figura 7 – Papel fisiológico da NTPDase no endotélio vascular. Adaptado de Marcus et al. (1997).

3.3.3 Receptores purinérgicos

Os nucleotídeos liberados do citoplasma de vários tipos de células, antes de serem metabolizados por ectonucleotidases, devem interagir com receptores específicos da membrana plasmática, os purinoreceptores P2 (DI VIRGILIO et al., 2001; KUNAPULI et al., 2003). Os purinoreceptores P2 podem ser divididos em duas subclasses: acoplados a proteína G (metabotrópicos), chamados de P2Y, e os ligados a canais iônicos (ionotrópicos), designados P2X. Em mamíferos já foram identificados cinco receptores do tipo P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁) e sete P2X (P2X₁₋₇) que foram clonados e caracterizados farmacologicamente (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

A ligação de agonistas ao purinoreceptor P2Y induz ativação de fosfolipase C (PLC) e/ou estimulação/inibição da adenilato ciclase. Todos os P2Y são ativados por ATP, mas em 2 deles, P2Y₄ e P2Y₆, o UTP é o ativador mais potente. Os canais iônicos dos receptores P2X são estimulados por ATP, que medeia uma rápida mudança na permeabilidade a cátions mono e divalentes como Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ (DI VIRGILIO et al., 2001). Um dos membros desta subclasse, o P2X₇, desperta notável interesse pela sua peculiar habilidade de sofrer progressivo aumento de tamanho quando ativado por altas concentrações de ATP, levando à formação de grandes poros não seletivos na membrana celular, o que fatalmente conduz a célula à morte. Enquanto isso, estímulos ocasionados por baixas quantidades de ATP são relatados como promotores da proliferação celular (ADINOLFI et al., 2005).

3.3.4 Sistema purinérgico *versus* sistema imune

Os antígenos ou marcadores de superfície celular são responsáveis pela identificação e auxiliam na discriminação de diferentes populações celulares. Estes antígenos recebem a designação CD (*cluster differentiation*). Esta classificação dos antígenos permite a identificação das células do sistema imune, seus tipos de resposta e funções efetoras. Estas moléculas têm funções como promover interações e adesão célula-a-célula e traduzir sinais que levem à ativação de linfócitos (ABBAS et al., 2002).

Entre os CDs presentes nos linfócitos podemos encontrar o CD39 (NTPDase1), envolvido no metabolismo de nucleotídeos extracelulares e originalmente identificado como um marcador da ativação linfóide expresso em linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, células NK e células endoteliais, tendo sido também reconhecido em plaquetas e megacariócitos (KANSAS et al., 1991; DOMBROWSKI et al., 1998; KOZIACK et al., 1999; COPPOLA et al., 2005).

O ATP via receptores P2X₇ causa um aumento abrupto dos níveis citoplasmáticos de cálcio dentro da célula, seguido por condensação do citoplasma, tumefação celular. A interação do ATP com estes receptores também dispara mecanismos que levam a alterações apoptóticas na célula. O receptor P2X₇

também é responsável pela liberação de IL-1 β e indução da morte celular, a qual é controlada por uma família de proteases intracelulares conhecidas como caspases (FERRARI et al., 1999).

Tem sido sugerido que a NTPDase1 desempenha um importante papel no controle da função dos linfócitos, incluindo reconhecimento do antígeno e/ou ativação de atividades efetoras das células T-citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990).

3.4 Co-existência e co-liberação de ACh e ATP

O ATP é co-armazenado e co-liberado juntamente com o neurotransmissor ACh (na taxa de aproximadamente 1:5) na sinapse neuromuscular e, uma vez na fenda sináptica ele é degradado até adenosina pela ação das ectonucleotidases (LING et al., 2005). Assim, o ATP modula a liberação de ACh através de seu metabólito adenosina e também pela presença de seus receptores P2X e P2Y na sinapse neuromuscular (DE LORENZO et al., 2006). Apesar de existir pouca informação sobre a interação da sinalização purinérgica e colinérgica no SNC, foi demonstrado por DÍAZ-HERNÁNDEZ et al. (2002) que receptores de nucleotídeos ionotrópicos estão presentes nos terminais colinérgicos, sendo capazes de induzir a liberação de ACh sinaptossomal.

A concepção de que o ATP e a ACh poderiam ser co-armazenados em vesículas sinápticas, levantando à possibilidade de co-liberação e de funções relacionadas na neurotransmissão, emergiu de estudos de Dowdall e colaboradores (1974). Evidências recentes revelam que os dois mensageiros, ATP e ACh, não estão restritos apenas a funções neurais, mas que exercem uma considerável variedade de funções não-neurais em tecidos não inervados (ZIMMERMANN, 2008).

3.5 Curcumina

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) (Fig.8), conhecida no mercado internacional por *turmeric* é originária do sudeste asiático, considerada uma preciosa especiaria, tem sua importância econômica devida às peculiaridades características de seus rizomas. É uma espécie herbácea e perene da família botânica Zingiberaceae conhecida por diversos nomes populares, dentre eles: açafrão, falso-açafrão, gengibre amarelo, açafroa, açafrão-da-terra, açafrão-da-Índia, turmeric, dentre outros (FILHO et al., 2000).

Além de sua principal utilização como condimento, possui substâncias antioxidantes, antimicrobianas e corantes que lhe conferem possibilidade de emprego nas áreas de cosméticos, têxtil, medicinal e alimentício (FILHO et al., 2000).

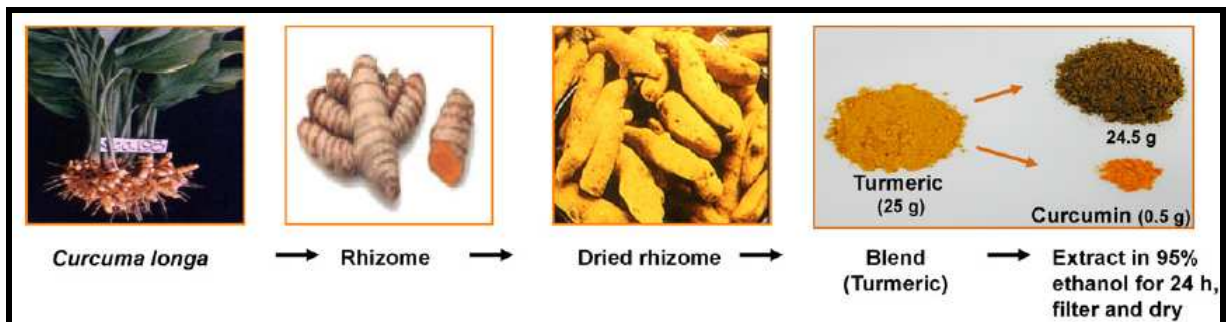


Figura 8 – Isolamento, extração e estrutura da curcumina. Adaptado de Aggarwal et al. (2010).

3.5.1 Propriedades biológicas da curcumina

A curcumina (Fig.9) ou diferuloilmetano é o princípio ativo da cúrcuma e tem demonstrado apresentar diversas propriedades. Sabe-se que a curcumina se liga a uma variedade de proteínas e inibe a atividade de diversas quinases. Modulando a ação de diversos fatores de transcrição a curcumina regula a expressão de diversos fatores inflamatórios, citocinas e moléculas de adesão (AGGARWAL et al., 2010).

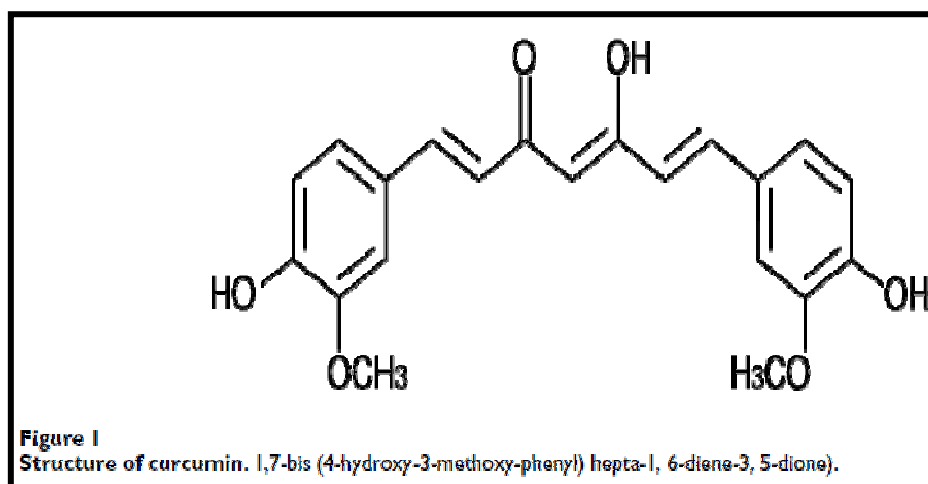


Figura 9 – Estrutura química da curcumina. Adaptado de Kowluru & Kanwar (2007).

Sabe-se que a curcumina possui capacidades antioxidantes, antiinflamatórias (ARAÚJO & LEON, 2001; SEEHOFER et al., 2009), neuroprotetoras (BALA et al., 2006; ZHAO et al., 2008; SETHIA et al., 2009), anti-cancerígenas e antimicrobial (RAO et al., 1995; DE et al., 2009), trombosupressora (PAN et al., 2007), protetora cardiovascular contra o infarto do miocárdio (AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009), hipoglicêmica (ARUN & NALINI, 2002), anti-arterosclerótica (DEODHAR et al., 1980).

Uma das propriedades mais bem estudadas da curcumina é a sua característica antiinflamatória, tendo sido investigada em uma ampla variedade de doenças como a retinopatia diabética (KOWLURU & KANWAR, 2007), obesidade induzida pela inflamação (AGGARWAL, 2010), infecção pelo *Helicobacter pylori* (KOOSIRIRAT et al., 2010), fibrose e inflamação hepática induzida por compostos químicos (WU et al., 2010), dentre outras.

3.5.2 Curcumina e doenças pulmonares

Um estudo recente (SUZUKI et al., 2009) demonstrou que a curcumina é capaz de atenuar, em camundongos, o desenvolvimento de enfisema pulmonar induzido pela exposição à fumaça do cigarro e pela elastase pancreática (PPE). Neste trabalho, foi observado que a curcumina inibiu significativamente o aumento

de neutrófilos e macrófagos em lavado broncoalveolar induzida pela exposição à fumaça do cigarro depois de dez dias consecutivos e atenuou o espessamento das vias aéreas causada pela fumaça do cigarro após 12 semanas de exposição.

Outro estudo, realizado por Shishodia e colaboradores (2003) demonstrou que o tratamento oral com a curcumina foi eficaz em reverter efeitos da exposição à fumaça do cigarro como a ativação do NF- κ B e a sua expressão em células de câncer de pulmão via supressão da I κ B α quinase.

4 MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de dois manuscritos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos.

4.1 Manuscrito 1: A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of NTPDase activity

4.2 Manuscrito 2: Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin

4.1 Manuscrito 1

A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of NTPDase activity

Jeandre Augusto dos S. Jaques^{ab}, João Felipe Peres Rezer^{ab}, Jader Betsch Ruchel^b,
Jessié Gutierrez^a, André Valle Bairros^a, Iria Luiza Gomes Farias^a, Sonia Cristina
Almeida da Luz^b, Cláudia de Mello Bertoncheli^b, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a,
Vera Maria Morsch^a, Daniela Bitencourt Rosa Leal^b

^a Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Laboratório de Enzimologia Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, Prédio 18, Sala 2208, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

^b Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, Prédio 20, Sala 4102, RS, Brasil

Short title: **Isolation of lymphocytes from rat lung tissue for NTPDase assay**

Corresponding author:

Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal (dbitencourtrosaleal@gmail.com)

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

Prédio 20 – Sala 4102

Phone: + 55 55 3220 9581.

Abstract

Methods for the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and human lung mononuclear cells (LMCs) have been proposed previously. This study describes a method that allows the separation of lymphocyte-rich LMCs from rats. Trypan blue was applied to determine cell viability. White blood cell (WBC) and differential cell (DC) counts were also performed. Relationships between NTPDase activities expressed in mg of protein, millions of cells and millions of viable cells were examined as linear correlations. The lung tissue yielded 82.46% lymphocytes, 8.6% macrophages, 2.20% monocytes and 1.27% polymorphonuclear cells (PMNs). In LMCs, a very strong correlation was observed as follows: (1) between NTPDase activity, as determined using ATP or ADP as a substrate, expressed in mg of protein and that expressed in millions of cells ($r \geq 0.91$); (2) between NTPDase activity expressed in mg of protein and that expressed in millions of viable cells ($r \geq 0.91$); and (3) between NTPDase activity expressed in millions of cells and that expressed in millions of viable cells ($r \geq 0.98$). Based on our results, we affirm that NTPDase activity could be expressed in millions of viable cells, millions of cells or mg of protein.

Keywords: lymphocytes; lung; NTPDase; mononuclear cells; nucleotides.

1 Introduction

Airways are often exposed to pathogens, dust particles, sulfur dioxide and cigarette smoke. Despite adaptations, such as pseudostratified columnar ciliated epithelium with goblet cells, some antigens also get into the small airways. The lung cells involved in innate immunity are activated neutrophils (PMNs), alveolar macrophages (AMs) and eosinophils (Eos), but during the establishment of a chronic infection, acquired immunity, which is characterized by recruited lymphocytes, is activated [1].

Lymphocytes have an important role in the development of lung diseases, such as emphysema and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [2, 3], and are responsible for preventing infection from spreading [4]. One of the ways in which lymphocyte function is regulated is through a family of enzymes called ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases), which catalyze the sequential dephosphorylation of nucleoside triphosphates to nucleoside monophosphates ($ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP$) [5, 6]. These nucleotides (ATP, ADP and AMP) are involved in the regulation of immune defenses and serve as a means of communication among immune cells in lymphoid organs; lymphocytes are a well-known recipient of nucleotides signaling [5, 7]. Some authors have demonstrated the inherent role of ecto-nucleotidases in airway diseases [6] as well as the involvement of lymphocytes in some immune system diseases and host-pathogen interactions [8, 9, 10, 11].

Because lymphocytes are involved in the management of pathologies and in triggering the immune response [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18], the development of a rapid and adequate method that allows for the separation of a rich lymphocyte phase from lung tissue is essential. For this purpose, using a combination of approaches

[19, 20] and experiments, we have developed a novel method for isolating rat lung lymphocytes. To verify the efficacy of this new assay in maintaining viable cells and achieving purity, cell integrity, white blood cell counts and differential cell counts were assessed.

2 Material and methods

2.1 Chemicals

Nucleotides, acetylthiocholine iodide, Coomassie Brilliant Blue G and trypan blue were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and the highest purity.

2.2 Animals

Male Wistar rats of 200 to 300 g bodyweight were used for all of the experiments, which were performed in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources (COBEA) and in accordance with international guidelines. The study was approved by the local Ethical Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) under the protocol number 23081.004963/2009-71.

2.3 Lung tissue preparation and procedures

A total of 10 rats (n = 5) were used to isolate lung lymphocytes. Lungs from two rats were pooled (4 g) to obtain a sufficient amount of cells and to attain a final suspension of 0.1 to 0.2 mg of protein. After excision, the specimens were washed with physiologic solution (FS), transferred to Petri dishes with 12 mL of FS at 0°C and

then chopped using scissors. The cell suspension was then filtered through a 1.5-mm nylon strainer. The resulting filtrate was centrifuged for 10 minutes at 1400 rpm, and the supernatant was discarded. The pellet was suspended with FS to obtain a final volume of 6 mL. To purify the suspension, the homogenate was carefully layered over 4 mL of a standard Ficoll-Hypaque gradient in another tube and immediately centrifuged for 30 minutes at 1800 rpm. The cell interface layer, which was composed of mononuclear cells, was carefully harvested and transferred to another tube. A volume of 10 mL of FS was pipetted over this sample, which was then homogenized and centrifuged for 10 minutes at 1500 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended with 5 mL of hemolytic buffer-EDTA-ammonium chloride and centrifuged for 10 minutes at 1000 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended with FS to a final protein concentration of 0.1 to 0.2 mg/mL.

2.4 Isolation of mononuclear cells from blood

PBMCs were isolated from rat peripheral blood collected with EDTA (4 mL) and separated on Ficoll-Hypaque density gradients as described [19].

2.5 Cell integrity

Cell membrane integrity was determined by trypan blue dye exclusion [21].

2.6 White blood cell (WBC) count and differential cell count

WBC counts were performed using a microscope counting chamber, the Neubauer hemocytometer (Brand, Wertheim, Germany). Differential cell counts of Giemsa-

stained cytocentrifuge (MARCA) preparations were performed using overall morphological criteria, including differences in cell size and nuclear shape.

2.7 NTPDase activity assay

After the isolation of lung lymphocytes and other mononuclear cells, NTPDase activity was determined as previously described by our group [22], measuring the amount of liberated inorganic phosphate (Pi) using a colorimetric assay. The reaction medium contained 0.5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 in a final volume of 200 µL. Twenty microliters of intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction medium (2-4 µg protein) and preincubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was started by adding the substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2 mM and stopped with 200 µL 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The samples were chilled on ice for 10 minutes before assaying the release of inorganic phosphate (Pi) as described previously [23], using malachite green as a colorimetric reagent and KH₂PO₄ as a standard. Light absorbance was measured at 630 nm. Control reactions were performed by adding the enzyme preparation after the addition of TCA to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate, and the specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.8 Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method as described [24], using serum albumin as a standard.

2.9 Statistical analysis

The relationships between NTPDase activities expressed in mg of protein, millions of cells and millions of viable cells were examined as linear correlations using Pearson's correlation coefficient.

3 Results

3.1 Cell integrity

Trypan blue staining showed that 89.5 to 98% of the blood mononuclear cells were viable and that 77% to 98.5% of the lung mononuclear cells were viable (Table 1).

3.2 White blood cell (WBC) count and differential

After the isolation of MNCs (mononuclear cells), we found that the WBC count ranged from $2.6 - 7.27 \times 10^6$ cells in PBMCs and from $1.8 - 5.05 \times 10^6$ in LMCs (Table 1). For the differential cell counts of Giemsa-stained cytocentrifuged preparations (Fig. 1 A-D), we observed a percentage of 93% lymphocytes, 4.20% monocytes and 2.8 PMNs in the PBMCs preparation and 82.46% lymphocytes, 8.6% macrophages, 0.66% monocytes and 0.71% PMNs in the LMCs preparation (Table 1).

After the differential cell counts of Giemsa-stained cytocentrifuged preparations (Fig. 1 A-D), we observed a predominant presence of lymphocytes in the PBMCs (93%) and LMCs (82%) (Table 1).

3.3 NTPDase assay

NTPDase activity, as determined using ATP or ADP as a substrate and expressed in mg of protein, in the LMCs preparation was more than three-fold that found in the PBMCs preparation (Table 1).

A significant correlation was observed as follows: between the NTPDase activity in blood mononuclear cells, as determined using ATP as a substrate, expressed in mg of protein and that expressed in millions of cells ($r = 0.98$, $P < 0.05$, $n = 5$); between that expressed in mg of protein and that expressed in millions of viable cells ($r = 0.99$, $P < 0.05$, $n = 5$); and between that expressed in millions of cells and that expressed in millions of viable cells ($r = 0.99$, $P < 0.001$, $n = 5$) (Fig. 2). A significant correlation was also observed as follows: between the NTPDase activity in blood mononuclear cells, as determined using ADP as a substrate, expressed in mg of protein and that expressed in millions of cells ($r = 0.98$, $P < 0.05$, $n = 5$); between that expressed in mg of protein and that expressed in millions of viable cells ($r = 0.98$, $P < 0.05$, $n = 5$); and between that expressed in millions of cells and that expressed in millions of viable cells ($r = 0.99$, $P < 0.001$, $n = 5$) (Fig. 3).

Analyzing the NTPDase activity in lung mononuclear cells, using ATP as a substrate, it was observed significant correlations as follows: between the activity expressed in mg of protein and that expressed in millions of cells ($r = 0.97$, $P < 0.05$, $n = 5$); between that expressed in mg of protein and that expressed in millions of viable cells ($r = 0.97$, $P < 0.05$, $n = 5$); and between that expressed in millions of cells and that expressed in millions of viable cells ($r = 0.99$, $P < 0.001$, $n = 5$) (Fig. 4). In the same cells, using ADP as a substrate, NTPDase also showed significant correlations as follows: between the activity expressed in mg of protein and that expressed in millions of cells ($r = 0.91$, $P < 0.05$, $n = 5$); between that expressed in

mg of protein and that expressed in millions of viable cells ($r = 0.91$, $P < 0.05$, $n = 5$); and between that expressed in millions of cells and that expressed in millions of viable cells ($r = 0.98$, $P < 0.05$, $n = 5$) (Fig. 5).

4 Discussion

The epithelial layer of the airway is an innate immunity defense system against infection that manages responses to inhaled pathogens through signals (growth factors, cytokines and nucleotides) provided by epithelial, inflammatory and immune cells [25]. When an exogenous agent disturbs the pulmonary homeostasis and the adaptive immune response is triggered, lymphocytes play an important role in lung defense and are recruited into the tissue [26, 27].

Using a combination of approaches, we developed a simple and rapid methodology to isolate a rat lymphocyte-rich LMCs phase that requires reagents commonly used in our lab, such as FS and Ficoll-Hypaque, and a small tissue sample (4 g). In the first method described for this type of cell isolation, PBMCs were separated from human blood [19]; this method is also suitable for the separation of PBMCs from rat blood. In another previously reported method, human lung T cells were isolated from resection specimens that weighed between 10 and 40 g, but this method is unsuitable for rat cell isolation due to the large amount of tissue required [20]. Moreover, this previously proposed method requires reagents such as RPMI media, fetal bovine serum (FBS) and phosphate buffer, making it unfeasible to use samples prepared via this method in NTPDase activity assays because the NTPDase activity is calculated by the amount of phosphate released.

On average, less than 5% of PBMCs and 8% of LMCs were stained by trypan blue, indicating the efficacy of this methodology to obtain viable cells that are suitable for enzymatic assays or other purposes. With our method, we were able to obtain about 1.2×10^6 PBMCs/mL of blood and 0.8×10^6 cells/gram of lung tissue, whereas other researchers [22] were able to obtain 10^7 cells/gram of lung cancer resection tissue. However, their sample source was an inflammation site, whose

microenvironment is largely infiltrated by inflammatory cells such as lymphocytes [28, 29, 30], which, we believe, might have contributed to the large quantity of cells isolated.

Considering that fact in this study, we focused on the separation of lymphocytes from rat lung tissue. We obtained a considerable percentage of lymphocytes from lung tissue (>80%) compared to that from blood (>90%). However, we found some contaminating cells, such as macrophages and, to a lesser degree, monocytes and polymorphonuclear cells. In the PBMCs isolated from blood, we only found a few monocytes and polymorphonuclear cells.

The results obtained for NTPDase activity, as determined using ATP or ADP as a substrate and expressed in mg of protein, in PBMCs in previous studies were similar to those found by our group [9, 10, 11]. However, the NTPDase activity for the hydrolysis of ATP or ADP in LMCs was more than three-fold that found in PBMCs. Airway ATP concentrations are regulated by ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). High levels of this nucleotide, which can result from damaged epithelia, bacterial lysis, mechanical and osmotic stress or can even be present under resting conditions, may cause lung edema and exacerbate inflammatory responses [6, 31]. Therefore, we predict that lung lymphocytes, which remove excess ATP, have an adaptable configuration that could lead to overexpression of the enzyme or that they may undergo some three-dimensional modification, such as phosphorylation, methylation or some other structural change, that leads to higher catalytic activity.

Surprisingly, when we analyzed the correlation between the results achieved for NTPDase hydrolysis of ATP and ADP expressed in nmol of Pi/min/mg of protein, nmol of Pi/min/million of cells and nmol of Pi/min/million of viable cells, the correlation

coefficient was very strong for both blood ($r \geq 0.98$, $P < 0.05$, $n=5$) and lung ($r \geq 0.91$, $P < 0.05$, $n=5$). This very strong correlation suggests that we can express this enzyme activity by mg of protein, millions of viable cells and millions of cells when following the methodology proposed in this paper. All of the results presented here demonstrate that this simple and rapid method, which does not require many uncommon reagents, is efficient for isolating a rat lymphocyte-rich LMCs preparation with a high degree of viability and in a sufficient amount for NTPDase enzyme activity assays.

This study reveals a novel technique for the separation of lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue and demonstrates that the NTPDase activity in lymphocytes from blood or lungs can be expressed in mg of protein, millions of cells or millions of viable cells.

6 Conflicts of Interest statement

There are no actual or potential conflicts of interest.

7 Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Figure Legends

Figure 1. (a) Mononuclear cells isolated from whole blood by centrifugation as previously described, Giemsa (200x). (b) Higher magnification of (A), Giemsa (400x). (c) Mononuclear cells isolated from lung tissue by centrifugation as previously described, Giemsa (200x). (d) Higher magnification of (C), Giemsa (400x). L, lymphocytes; Ma, macrophages; Mn, monocytes; PMN, polymorphonuclear cells.

Figure 2. Pearson's correlation coefficients (r) (a) between NTPDase activity in blood mononuclear cells, as determined using ATP as a substrate, expressed in mg of protein and that expressed in millions of cells, (b) between that expressed in mg of protein and that expressed in millions of viable cells and (c) between that expressed in millions of cells and that expressed in millions of viable cells. As indicated in the figure, correlation coefficients between NTPDase activity expressed in mg of protein, millions of cells and millions of viable cells were significant ($n = 5$).

Figure 3. Pearson's correlation coefficients (r) (a) between NTPDase activity in blood mononuclear cells, as determined using ADP as a substrate, expressed in mg of protein and that expressed in millions of cells, (b) between that expressed in mg of protein and that that expressed in millions of viable cells and (c) between that expressed in millions of cells and that that expressed in millions of viable cells. As indicated in the figure, correlation coefficients between NTPDase activity expressed in mg of protein, millions of cells and millions of viable cells were significant ($n = 5$).

Figure 4. Pearson's correlation coefficients (r) (a) between NTPDase activity in lung mononuclear cells, as determined using ATP as a substrate, expressed in mg of

protein and that expressed in millions of cells, **(b)** between that that expressed in mg of protein and that that expressed in millions of viable cells and **(c)** between that that expressed in millions of cells and that that expressed in millions of viable cells. As indicated in the figure, correlation coefficients between NTPDase activity expressed in mg of protein, millions of cells and millions of viable cells were significant ($n = 5$).

Figure 5. Pearson's correlation coefficients (r) **(a)** between NTPDase activity in lung mononuclear cells, as determined using ADP as a substrate, expressed in mg of protein and that that expressed in millions of cells, **(b)** between that that expressed in mg of protein and that that expressed in millions of viable cells and **(c)** between that that expressed in millions of cells and that that expressed in millions of viable cells. As indicated in the figure, correlation coefficients between NTPDase activity expressed in mg of protein, millions of cells and millions of viable cells were significant ($n = 5$).

References

- [1] L. Taraseviciene-Stewart, N.F. Voelkel, Molecular pathogenesis of emphysema, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 394-402.
- [2] S. Grumelli, D.B. Corry, L.Z. Song, L. Song, L. Green, J. Hug, J. Hacken, R. Espada, R. Bag, D.E. Lewis, F. Kheradmand, An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema, *PLoS Med.* 1 (2004) e8.
- [3] J.C. Hogg, F. Chu, S. Utokaparch, R. Woods, W.M. Elliott, L. Buzatu, R.M. Cherniack, R.M. Rogers, R.C. Sciruba, H.O. Coxson, P.D. Paré, The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 2635-7.
- [4] X. Shi, N.J. LeCapitaine, x.L. Rudner, S. Ruan, J.E. Shellito, Lymphocyte apoptosis in murine *Pneumocystis pneumonia*, *Resp. Res.* 10 (2009) 1-15.
- [5] J Barankiewicz, H.M. Dosch, A. Cohen, Extracellular nucleotide catabolism in human B and T lymphocytes, the source of adenosine production, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 7094–7098.
- [6] L.H. Burch, M. Picher, E-NTPDases in human airways, Regulation and relevance for chronic lung diseases, *Purinergic Signal.* 2 (2006) 399-408.

[7] H. Zimmermann, ATP and acetylcholine, equal brethren, *Neurochem. Int.* 52 (2008) 634-48.

[8] F.M. Sansom, S.C. Robson, E.L. Hartland, Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72 (2008) 765-781.

[9] D.B.R. Leal, C.A. Streher, C.M. Bertoncheli, L.F.D. Carli, C.A.M. Leal, J.E.P. Silva, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1746 (2005) 134.

[10] R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, R. Schmatz, G. Thomé, M. Bagatini, M. Corrêa, C. Rosa, N. Stefanello, L.P. Bellé, M.B. Moretto, L. Oliveira, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients, *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 210-214.

[11] E.M. Saucedo, R.S. Pereira, G.M. Barbosa, V. Batisti, C.A.M. Leal, J. Fleck, R.C.V. Santos, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, D.B.R. Leal, Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in lymphocytes and platelets of immunosuppressed rats, *Biomed. Pharmacother.* [Epub Ahead of Print] (2010).

[12] C. Vancheri, C. Mastruzzo, E. Trovato-Salinaro, E. Gili, D. Lo Furno, M.P. Pistorio, M. Caruso, C. La Rosa, C. Crimi, M. Failla, N. Crimi, Interaction between

human lung fibroblasts and T-lymphocytes prevents activation of CD4⁺ cells, *Resp. Res.* 6 (2005) 1-13.

[13] W.F. Carson, L.A. Guernsey, A. Singh, A.T. Vella, C.M. Schramm, R.S. Thrall, Accumulation of regulatory T cells in local draining lymph nodes of the lung correlates with spontaneous resolution of chronic asthma in a murine model, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145 (2008) 231-243.

[14] F.R. D'Alessio, K. Tsushima, N.R. Aggarwal, E.E. West, M.H. Willett, M.F. Britos, M.R. Pipeling, R.G. Brower, R.M. Tudler, J.F. McDyer, L.S. King, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 2898-2913.

[15] J. Dodd, S. Riffault, J.S. Kodituwakku, A.C. Hayday, P.J.M. Openshaw, Pulmonary Vγ4⁺ γδ T cells have proinflammatory and antiviral effects in viral lung disease, *J. Immunol.* 182 (2009) 1174-1181.

[16] C.A. Granville, R.M. Memmott, A. Balogh, J. Mariotti, S. Kawabata, W. Han, J. LoPiccolo, J. Foley, D.J. Liewehr, S.M. Steinberg, D.H. Fowler, M.C. Hollander, P.A. Dennis, A central role for Foxp3⁺ regulatory T cells in K-Ras-driven lung tumorigenesis, *PLoS ONE* 4 (2009) e5061.

[17] L. Heath, A. Fox, J. McClure, K. Diem, A.B. Wout, H. Zhao, D.R. Park, J.T. Schouten, H.L. Twigg, L. Corey, J.I. Mullins, J.E. Mittler, Evidence for limited genetic compartmentalization of HIV-1 between lung and blood, *PLoS ONE* 4 (2009) e6949.

- [18] B.D. Medoff, E. Seung, S. Hong, S.Y. Thomas, B.P. Sandall, J.S. Duffield, D.A. Kuperman, D.J. Erle, A.D. Luster, CD11b⁺ myeloid cells are the key mediators of Th2 cell homing into the airway in allergic inflammation, *J. Immunol.* 182 (2009) 623-635.
- [19] A. Böyum, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97 (1968) 77-89.
- [20] C.E. Day, S.D. Zhang, J. Riley, T. Gant, A.J. Wardlaw, C. Guillen, A novel method for isolation of human lung T cells from lung resection tissue reveals increased expression of GAPDH and CXCR6, *J. Immunol. Methods* 342 (2009) 91-7.
- [21] W. Struber, Trypan blue exclusion test of cell viability, In: J. Coligan, A. Kruisbeek, D. Marguiles, E. Shevach, W. Strober, editors. *Curr. Protoc. Immunol.* (2001) A-3B.
- [22] D.B.R. Leal, C.A. Streher, 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.
- [23] K. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for the Ca²⁺-ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375-80.

- [24] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-54.
- [25] A. Pelleg, E. Schulman, Adenosine 5'-triphosphate axis in obstructive airway diseases, *Am. J. Ther.* 9 (2002) 454-64.
- [26] R. Condos, W.N. Rom, M. Weiden, Lung-specific immune response in tuberculosis, *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 4 (2000) S11-7.
- [27] J. Beck, M. Warnock, H. Kaltreider, J. Shellito, Host defenses against *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of CD4⁺ lymphocytes, *Chest* 103 (1993) 116S-118S.
- [28] L.M. Coussens, Z. Werb, Inflammation and cancer, *Nature* 420 (2002) 860-7.
- [29] N. Azad, Y. Rojanasakul, V. Vallyathan, Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species, *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 11 (2008) 1-15.
- [30] M.R. Stämpfli, G.P, Anderson. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer, *Nat. Rev. Immunol.*, 5 (2009) 377-84.

[31] E.R. Lazarowski, R.C. Boucher, T.K. Harden, Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules, *Mol. Pharmacol.*, 64 (2003) 785-95.

Figure 1

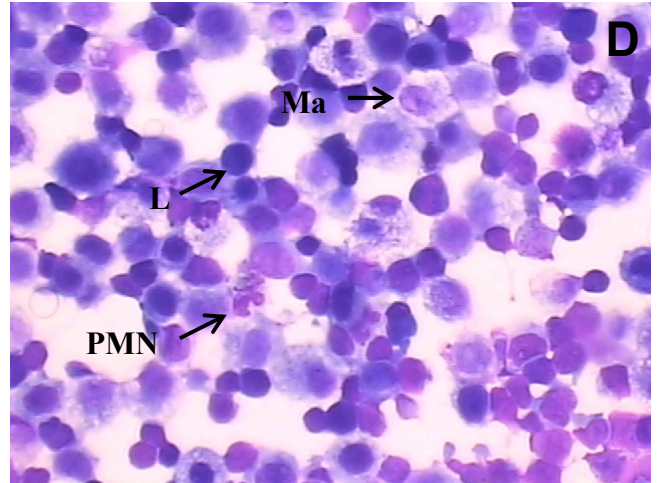
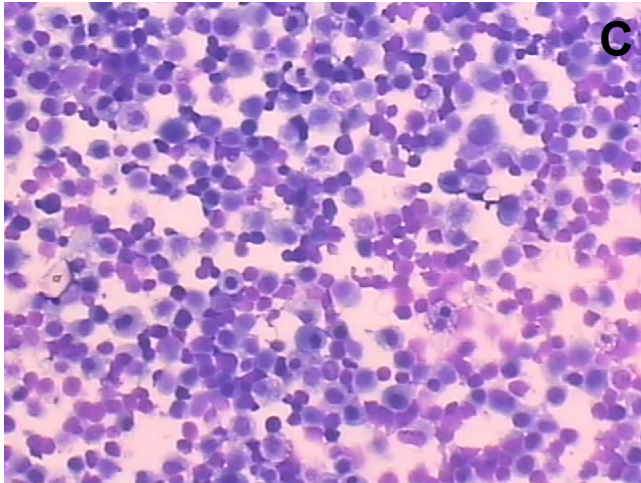
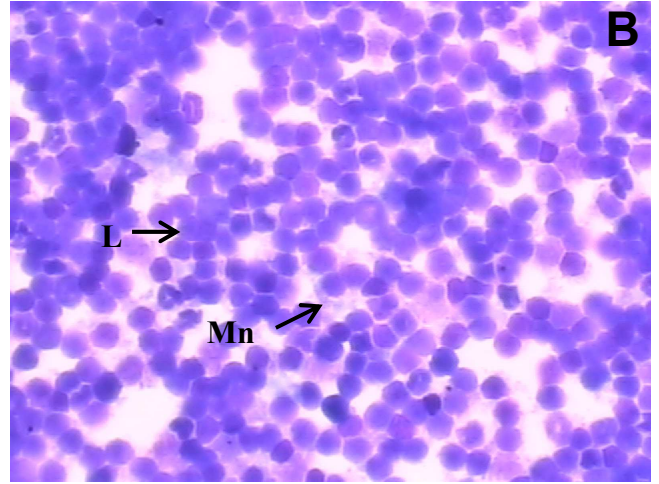
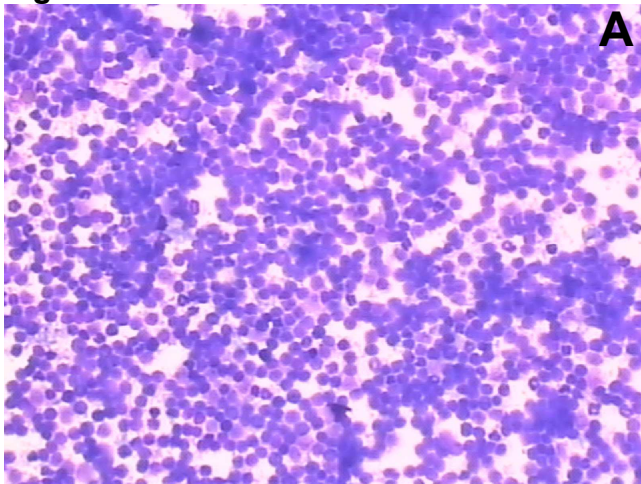


Figure 2

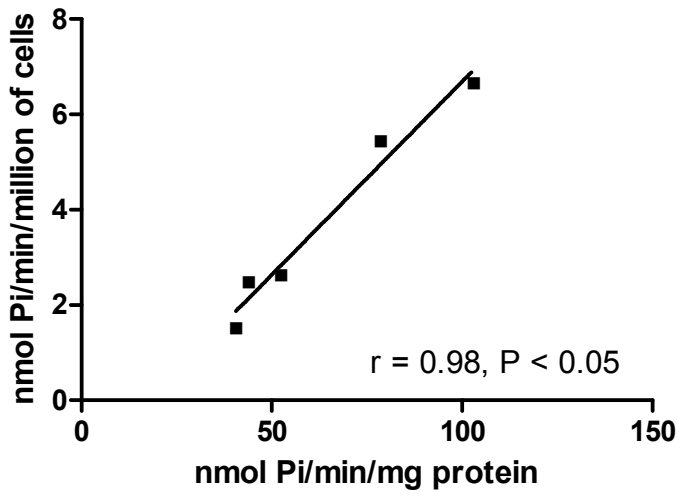
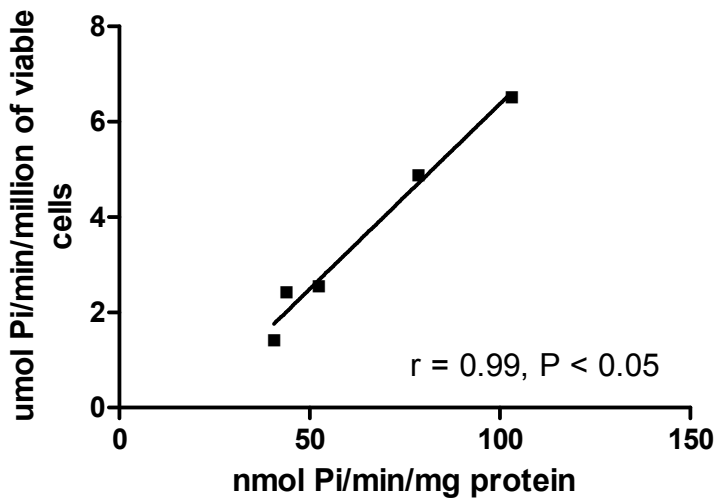
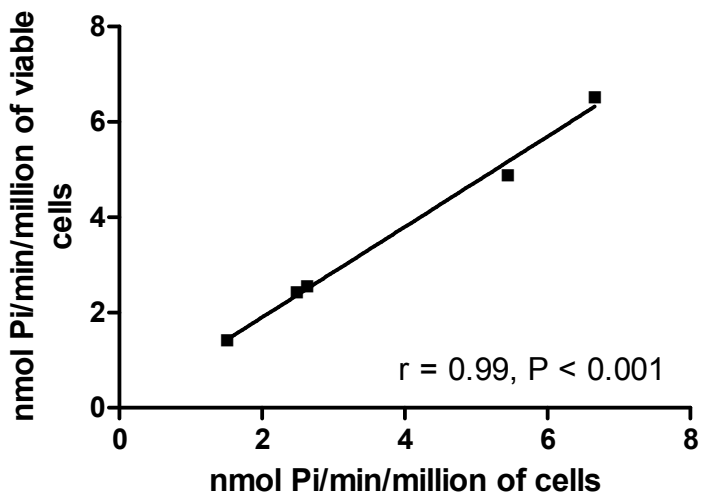
a**b****c**

Figure 3

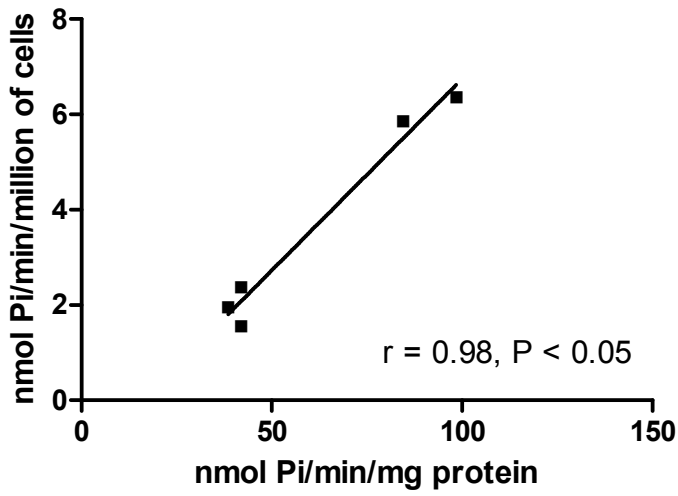
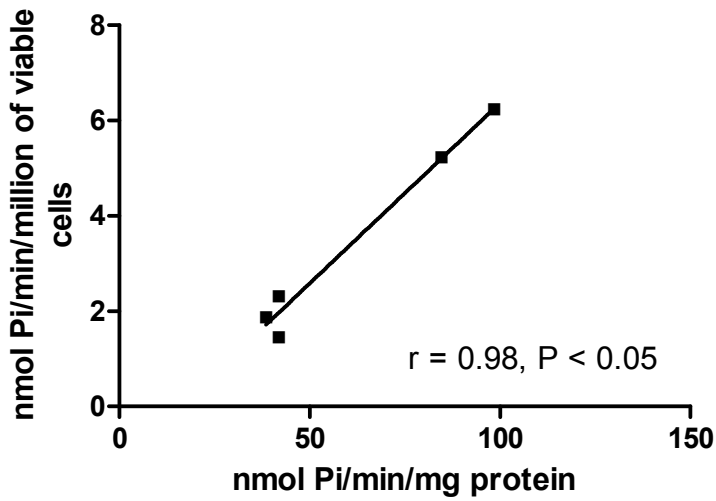
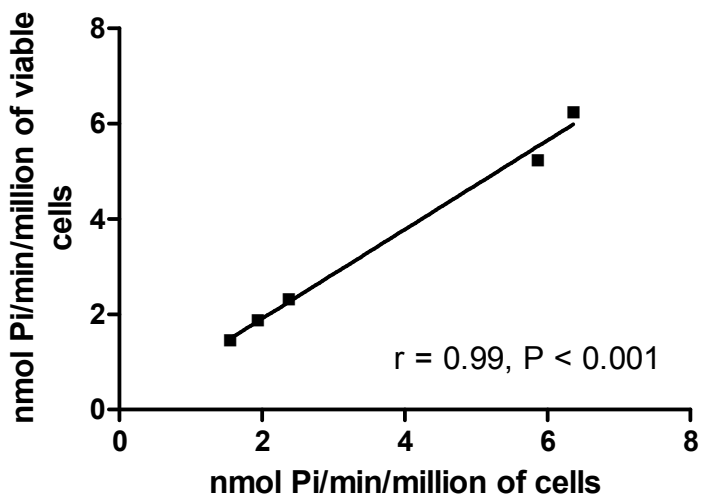
a**b****c**

Figure 4

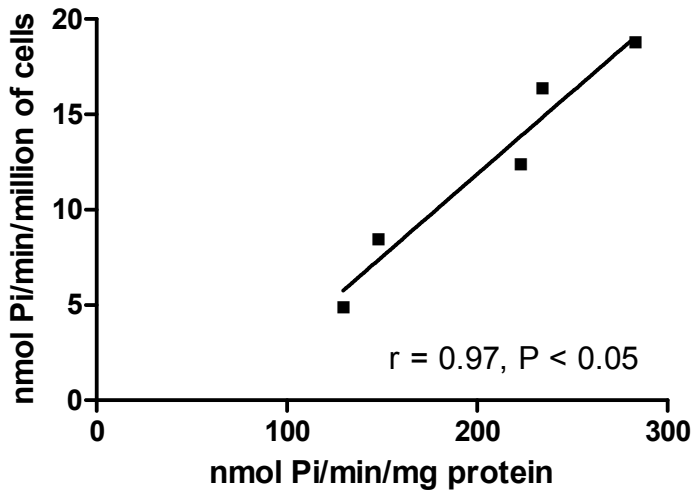
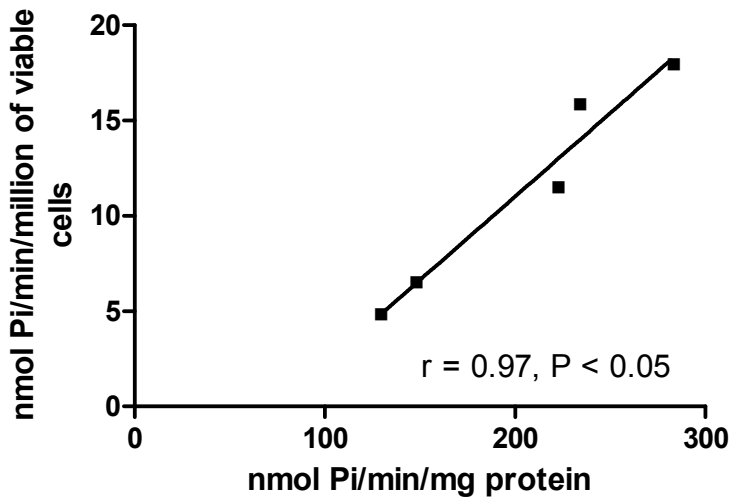
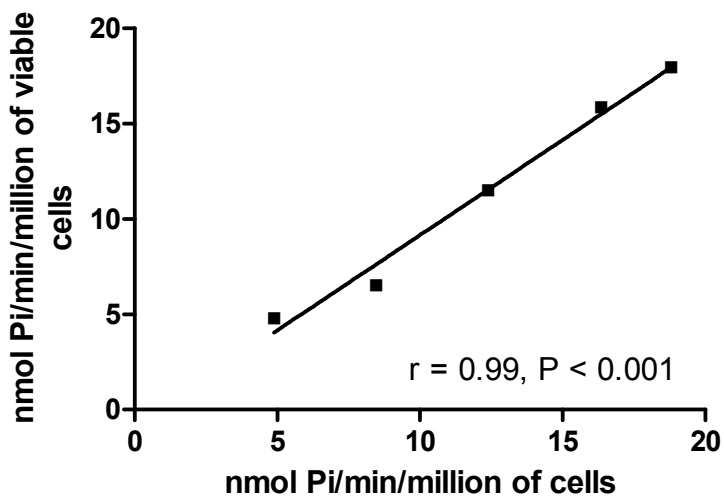
a**b****c**

Figure 5

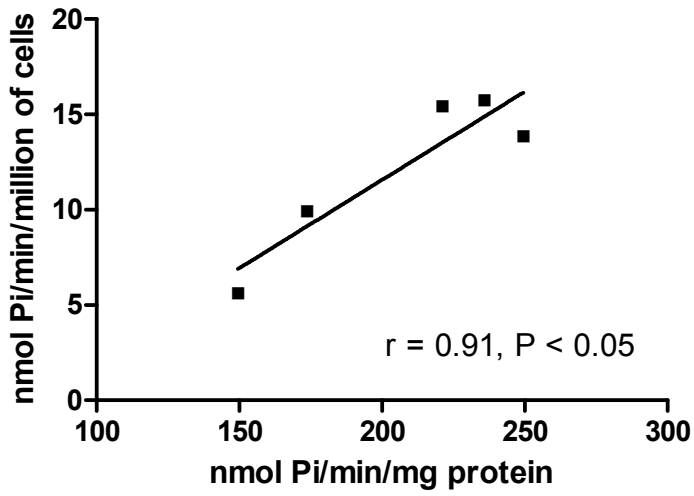
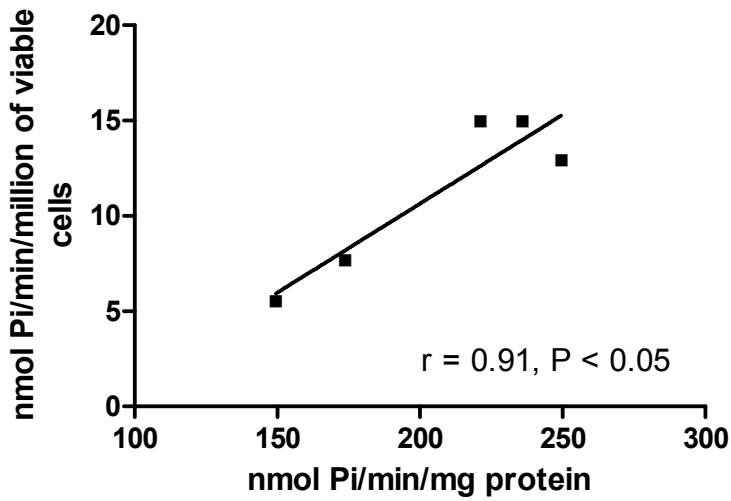
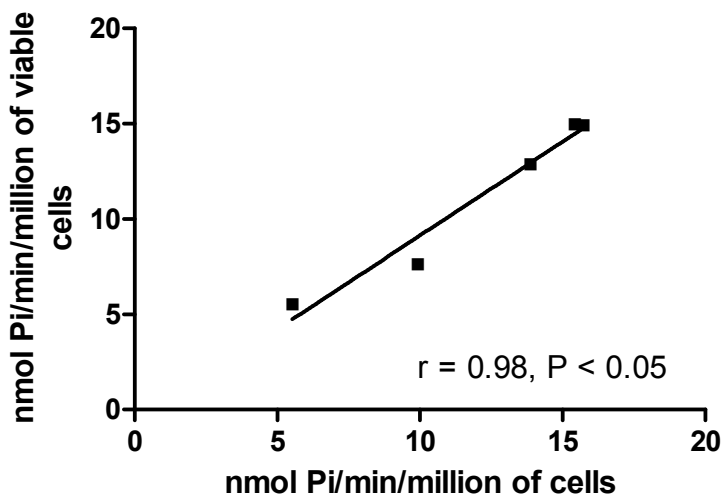
a**b****c**

Table 1 – Comparison of blood and lung separated mononuclear cells viability, WBC count, differential and NTPDase activity using ATP or ADP as substrate and expressed by mg of protein, million and million of viable cells.

	Blood mononuclear cells		Lung mononuclear cells	
	Mean	SEM	Mean	SEM
Cell viability (%)	95.1	1.61	92.1	8.69
WBC count	4.79 x 10 ⁶	1.65 x 10 ⁶	3.24 x 10 ⁶	0.61 x 10 ⁶
Differential (%)				
Lymphocytes	93	2.39	82.46	8.37
Macrophages	-	-	8.60	8.60
Monocytes	4.20	1.49	2.20	0.66
Polymorphonuclear cells	2.80	1.39	1.27	0.71
NTPDase activity (ATP)				
by mg of protein	63.68	11.41	203.57	28.53
by million of cells	3.74	0.98	12.17	2.53
by million of viable cells	3.55	0.93	11.32	2.55
NTPDase activity (ADP)				
by mg of protein	61.07	12.66	205.96	19.08
by million of cells	3.61	1.03	12.11	1.92
by million of viable cells	3.42	0.96	11.19	1.95

4.2 Manuscrito 2

**Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in
cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin**

Jeandre Augusto dos Santos Jaques^{1 2}, João Felipe Peres Rezer^{1 2}, Jader Betsch
Ruchel², Lara Becker¹, Cíntia Saydelles¹, Viviane do Carmo Gonçalves Souza²,
Sônia Cristina Almeida da Luz², Jessié Martins Gutierrez¹, Jamile Fabbrin
Gonçalves³, Vera Maria Morsch¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{1 3}, Daniela
Bitencourt Rosa Leal²

¹ Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Laboratório de
Enzimologia Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Campus
Universitário, Camobi, Prédio 18, Sala 2208, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

² Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia,
Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, Prédio 20,
Sala 4102, RS, Brasil

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil.

Corresponding author:

Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal (dbitencourtrosaleal@gmail.com)

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

Prédio 20 – Sala 4102

Phone: + 55 55 3220 9581

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the activity of the enzymes NTPDase and acetylcholinesterase (AChE) in lung lymphocytes (LL) and peripheral lymphocytes (PL) from cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin (Cur). The animals were treated with cigarette smoke and curcumin, once a day, 5 days each week. The experimental procedures were divided into two sets of experiments. In the first set, the animals were distributed into four groups: vehicle, Cur 12.5, Cur 25 and Cur 50 mg/kg. In the second set, the animals were divided into five groups: vehicle, smoke, smoke and Cur 12.5 mg/kg, smoke and Cur 25 mg/kg, smoke and Cur 50 mg/kg. After thirty days the lung was removed and the peripheral blood collected for separation of lymphocytes. The treatment with curcumin prevented alterations observed in the cigarette smoke-exposed animals such as the decrease of ATP and ADP hydrolysis in PL and LL, and the increase of AChE activity in PL. We suggest that the treatment with curcumin was protective, since the high concentrations of ATP are positively related with inflammation and tissue damage, and the histological injury observed in cigarette smoke-exposed rats was not observed in the groups treated with curcumin.

Key words: Lymphocytes; NTPDase; acetylcholinesterase; cigarette-smoke; curcumin.

Introduction

Cigarette smoke-exposure, both active and passive, is known to be the main epidemiologically proven causal factor involved in many lung diseases such as emphysema, Chronic Obstructive Lung Disease (COPD) and lung cancer (Kuper et al. 2002; Stämpfli and Anderson, 2009). Relevant to the development of these diseases are the effects of cigarette smoke on the immune system, including damage and inflammatory and immunosuppressive events (Sopori, 2002; Barnes, 2004).

Cigarette smoke has been shown to affect a wide range of host defense mechanisms such as the respiratory epithelium, alveolar macrophages, natural killer cells (NK), dendritic cells (DCs) and B cells and T cells (Stämpfli and Anderson, 2009). Particularly of interest to this study are the cigarette smoke exposure effects on the lymphocytes. The B cells are abundantly present in cigarette smoke-exposed lungs, but their role in the progression of lung disease is still obscure. Similarly, CD8⁺ T cells, which codify cytotoxic proteins and can activate alveolar macrophages to produce metalloproteinase 12 (MMP12), are widely present in the lungs of chronic smokers (Grumelli et al. 2004).

Leukocyte surface CD39 is a cell surface-located member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family recognized as a B lymphocyte activation marker (Maliszewski et al. 1994). This ectoenzyme catalyzes the sequential dephosphorylation of nucleoside triphosphates to nucleoside monophosphates (ATP → ADP → AMP) (Burch and Pitcher, 2006), regulating the pericellular levels of these nucleotides and guiding, in part, the course of the immune response (Dwyer et al. 2007). The participation of this enzyme in the progress of diseases involving several tissues and cell types has been widely discussed (Schetinger et al. 2007)

The synthesis of cytokines, signaling molecules involved in the triggering of the immune response, is regulated via $\alpha 7nAChR$ binding with its agonist acetylcholine (ACh). Moreover, acetylcholinesterase (AChE) is the enzyme involved in the hydrolysis of acetylcholine into choline and acetate, thus regulating the signaling transmitted by ACh. This system responsible for regulating the immune response is termed the “cholinergic anti-inflammatory pathway” (Pavlov and Tracey, 2005)

The conception that ATP and ACh could be co-stored in synaptic vesicles, raising the possibility of co-release and of related functional roles in neurotransmission, has emerged from a study of Dowdall and colleagues (1974). More recent evidence reveals that the two messengers are not confined to neural functions, but rather exert a considerable variety of non-neural functions in non-innervated tissues (Zimmerman, 2008).

Curcumin (diferuloylmethane), a polyphenol and the major yellow pigment in turmeric which is derived from the herb *Curcuma longa* Linn, has been proposed to have several biological activities such as antioxidant (Ilbey et al. 2009; Kamat et al. 2008), anti-inflammatory (Kowluru and Kanwar, 2007), neuroprotective (Reeta et al. 2009; Tang et al. 2009), anticarcinogenic and antimicrobial (De et al. 2009; Rao et al. 1995), thrombosuppressive (Pan et al. 2007), cardiovascular (i.e, as protection against myocardial infarction) (Aggarwal and Harikumar, 2009), hypoglycemic (Arun and Nalini, 2002) and antiarthritic (i.e., as protection against rheumatoid arthritis) (Deodhar et al. 1980). Its anti-inflammatory properties are one of the more studied characteristics of curcumin, being investigated in a wide variety of diseases and clinical manifestations such as the diabetes retinopathy (Kowluru and Kanwar, 2007), inflammation-induced obesity (Aggarwal, 2010), *Helicobacter pylori* infection

(Koosirirat et al. 2010), chemical-induced liver inflammation and fibrosis (Wu et al. 2010).

Based on the findings showing curcumin to be a potent anti-inflammatory agent, the purpose of this study was to evaluate the effect of curcumin on NTPDase and acetylcholinesterase activities in peripheral blood and lung lymphocytes from rats exposed to cigarette smoke.

Materials and Methods

Reagents

Nucleotides, Trizma Base, Percoll, HEPES and Coomassie brilliant blue G, curcumin (curcumin $\geq 80\%$; curcuminoid content $\geq 94\%$) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The brand of cigarette used in the experiment was manufactured by Souza Cruz S.A., Brazil. According with the commercial package the cigarette contains nearly 10 mg tar, 0.9 mg nicotine, and 10 mg carbon monoxide. All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of highest purity.

Animals

Male Wistar rats (90-110 days) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. They were housed five to a cage on a natural day/night cycle at a temperature of 21°C with free access to water and standard chow *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from the UFSM (protocol under number: 23081.004963/2009-71).

Cigarette smoke exposure and treatment with curcumin

The experimental procedure was divided in two sets of experiments. In the first set, the animals were randomly divided into four groups (4-10 rats in each group): Vehicle (corn oil); Cur 12.5 mg/kg body weight; Cur 25 mg/kg body weight; Cur 50 mg/kg body weight. In the second experimental set, the animals were divided into 5 groups (4-10 rats in each group): Vehicle (corn oil); smoke exposed; smoke and Cur 12.5 mg/kg body weight; smoke and Cur 25 mg/kg body weight; smoke and Cur 50 mg/kg body weight. Curcumin was diluted with corn oil, administered by oral gavage, not exceeding 0.1 ml/kg body weight. The treatment with curcumin and cigarette smoke was carried out once a day, 5 days each week, during 30 days. First, was administered the curcumin or corn oil and approximately 10 minutes later the smoking groups were exposed to the aged and diluted sidestream smoke of commercial cigarettes inside a whole-body smoke exposure. Control animals were placed in an equal chamber for the same amount of time, but without exposure to smoke. When the smoke exposure was carried out, the control group was always outside, without any contact with smoke (Thomé et al. 2009).

Smoke generation

After placing the rats inside the exposure chamber (size 564 x 385 x 371 mm; volume 53,100 ml/1795 oz; plastic material), 4 cigarettes were lit and a stopwatch was turned on. Cigarettes were fixed in a metal holder, allowing them to be fully burned down within a period of 15 minutes. After lighting the cigarettes, the chamber was immediately closed, with only a small opening (371 x 40 mm) in the chamber for ventilation. A metal grille was placed on top of the cigarette holder to avoid direct contact with the cigarettes and thus prevent the rats from injuring themselves. The

inhalation exposure of our study was to aged and diluted sidestream smoke, used as a surrogate of environmental tobacco smoke (ETS) as experienced by non-smokers (Thomé et al. 2009).

Anatomopathologic analysis of lung tissue

To confirm this model of exposure, an anatomopathologic analysis of lung tissue was carried out. Samples of lung tissue, ex vivo, were collected and fixed in 10% formalin solution and then dehydrated and embedded in paraffin, followed by sectioning and histological staining with hematoxylin and eosin (H&E) (Tolosa & Rodrigues, 2003). The slides were observed in an optical microscope (x400) to check for possible changes in the lung tissue indicative of exposure to cigarette smoke.

Isolation of lymphocytes from lung and blood

Lymphocytes were isolated from blood (4 mL) collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum (1968) and from lung tissue as described by Day et al. (2009) with some modifications.

NTPDase activity

After lymphocyte isolation, NTPDase activity was determined as described by Leal et al. (2005), where the reaction medium contained 0.5 mM CaCl_2 , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0, with a final volume of 200 μL . Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution were added to the reaction medium (2-4 μg of protein) and pre-incubated for 10 min at 37°C and incubation proceeded for 70 min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mM

and stopped with 200 μ L of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1986) using malachite green as colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

AChE activity

AChE activity was determined according to the method described by Ellman et al. (1961) modified by Fitzgerald and Costa (1993). Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1-0.2 mg/mL. 0.2 mL of intact cells were added to a solution containing 1.0 mM acetylthiocholine (ATC), 0.1 mM 5'5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0). Immediately before and after incubation for 30 min at 27°C the absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. AChE activity was calculated from the quotient between lymphocyte AChE activity and protein content and the results are expressed as μ mol AcSCh/h/mg of protein.

Protein determination

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

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls Multiple Comparison Test. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference among the analyses used. All data were expressed as mean \pm S.E.M.

Results

Anatomopathology of lung tissue

The findings of the histopathological analysis observed in the experimental groups in the sections colored by H&E are described in figure 1. The tissue in the control group was preserved, with no sign of lesion (Fig.1A). All the animals exposed to cigarette smoke presented alveolar septal thickening at the expense of mononuclear infiltrate, intense peribronchiolar mononuclear infiltrate and emphysematous alterations (Fig.1B). In the experimental groups exposed to cigarette smoke and treated with Cur 12.5 mg/kg, Cur 25 mg/kg and Cur 50 mg/Kg a normal appearance of the tissue was observed, with slight diffuse alveolar septal thickening, chronic interstitial infiltrate and occasional peribronchial lymphoid aggregates (Fig.1C, 1D and 1E). There were no morphological changes in the lung tissue of rats treated with curcumin only (data not shown).

NTPDase activity

NTPDase activities from peripheral blood lymphocytes were not modified by curcumin *per se* treatment (Fig.2A and 2C). In the hydrolysis of ATP in peripheral blood lymphocytes, the smoke group presented a decrease compared to the control (58.3%). The rats treated with curcumin at the doses of 12.5, 25 and 50 mg/kg differed significantly from the smoke ($p < 0.05$) group in that the activities returned to

the basal levels (Fig.2B). Regarding ADP hydrolysis in peripheral blood lymphocytes, the smoke group also presented a decrease compared to the control (50%), which was reversed by treatment with Cur 12.5, Cur 25 and Cur 50 mg/kg ($p<0.05$) (Fig.2D).

NTPDase activities from lung lymphocytes were not modified by curcumin *per se* treatment (Fig 3A and 3C). In the hydrolysis of ATP in lung lymphocytes, the smoke group presented a decrease compared to the control (62.8%) ($p<0.05$) and treatment with Cur 12.5, Cur 25 and Cur 50 mg/kg maintained the basal levels (Fig.3B). Regarding ADP hydrolysis in lung lymphocytes, the smoke group also presented a decrease compared to the control ($p<0.05$) (58,3%) and the treatment with Cur 12.5, Cur 25 and Cur 50 mg/kg reversed this effect (Fig.3D).

As can be observed in the figures 2B, 2D, 3B and 3D, the oral administration of curcumin was effective in preventing the changes in NTPDase activity promoted by cigarette smoke exposure.

AChE activity

The results obtained for AChE activity in peripheral blood and lung lymphocytes are presented in Figure 4. As can be observed, AChE activity was not modified by curcumin *per se* treatment (Fig.4A and 4C). AChE activity in the peripheral blood lymphocytes was significantly increased in the smoke group ($p<0.05$) compared to the others. The enzyme activity was more than 2 fold that found in control and Cur 12.5, 3 fold Cur 25 and more than 4 fold that found in Cur 50 mg/kg (Fig.4B). Regarding the lung lymphocytes no difference was observed among the groups (Fig.4D).

Discussion

The purpose of the present study was to investigate the effects of curcumin, a polyphenol which has been shown to suppress effects of various inflammatory stimuli (Aggarwal, 2010; Koosirirat et al. 2010), on NTPDase and AChE activities in lung lymphocytes (LL) and peripheral lymphocytes (PL) in a model of passive cigarette smoke exposure.

Many studies, corroborating with our results (Suzuki et al. 2009; Thomé et al. 2009), have demonstrated the occurrence of histological injuries to lung tissue caused by cigarette smoke exposure. Furthermore, many of the alterations that assail the immune system have been investigated. Doz et al. (2008), for example, demonstrated that exposure of the airways to acute cigarette smoke (two cigarettes twice daily) induces acute inflammation dependent of Toll like receptor 4 (TLR4) and IL-1R1 signaling, and a recruitment of neutrophils in the bronchoalveolar space and pulmonary parenchyma. Some authors have demonstrated that emphysematous activated lung T cells exhibit a predominantly T helper type 1 (T_H1) effector phenotype, which by chemokine CXCL10 control the release of elastolytic matrix metalloproteinases (MMPs) (Barnes et al. 2003; Molet et al. 2005; Michaud et al. 2006). Cigarette smoke has both immune activating and suppressing activities (Sopori, 2002) that can persist years after smoking cessation (Beutler et al. 2006), and these effects could be autoimmune responses to an endogenous lung antigen induced by smoking. Considering this, and with the knowledge that T_H1 cells are linked to the autoimmune processes, Lee et al. (2007) investigated the participation of human collagen I and elastin peptides in cytokine secretion and demonstrated that emphysema is an autoimmune disease characterized by the presence of antielastin antibody and T_H1 responses.

Taking into consideration that the purinergic system enzymes are intimately involved in the modulation of the immune system, participating in the modulation of pro and anti-inflammatory events (Dwyer et al. 2007), the effect of curcumin upon NTPDase activity was investigated in PL and LL of rats exposed to cigarette smoke. In PL from rats exposed to the cigarette smoke, it was observed that using ATP as a substrate, NTPDase activity was decreased compared to control and in these same cells, using ADP as a substrate NTPDase was also decreased. We believe that this reduction in ATP hydrolysis represents an increase in the concentration of this nucleotide in the physiologic context and that the reduction in ADP hydrolysis is just a consequence of the decrease of this nucleotide.

Many biological functions for ATP have been demonstrated, particularly of interest to this study, the regulation of inflammation. To execute this function, released ATP interacts with P2X7 receptors, inducing the release of cytokines. An example of this is that ATP stimulation of lymphocytes and the endothelium have been linked to the induction of largely pro-inflammatory responses, such as the release of interleukin (IL)-1 (or IL-8) (Imai et al. 2000; la Sala et al. 2003) which may contribute to the systemic effects of cigarette smoke and nicotine. Cigarette smoke exposure does not act only in harming the lung tissue, but also in disturbing other systems such as the cardiovascular system. According to Benowitz (1996), nicotine affects cardiovascular function and also stimulates the release of catecholamines by the adrenal glands, increasing the cardiovascular effects.

The treatment with curcumin, a polyphenol well known for its anti-inflammatory properties, was effective in preventing the decrease of NTPDase activity using ATP or ADP as a substrate in rats exposed to cigarette smoke. The reduction of ATP levels could be one way by which curcumin acts as an anti-inflammatory molecule.

Moreover, curcumin possess a strong antioxidant capacity, which, in part, is responsible for maintaining the integrity of cell surfaces. Considering that the pericellular ATP levels are lower than those in the cytoplasm, this antioxidant property may contribute to maintain the normal levels of extracellular nucleotides, since it protects membrane lipids from reactive species. Many studies have investigated and demonstrated the anti-inflammatory effects of curcumin (Kowluru and Kanwar, 2007; Koosirirat et al. 2010; Wu et al. 2010), corroborating with our results.

Regarding the activity of NTPDase in the LL from rats exposed to cigarette smoke, a significant decrease in the NTPDase activity was observed using both ATP and ADP as substrate. It is known that damaged cells release significant amounts of ATP in the pericellular milieu (Burch and Picher, 2006). Cigarette smoke exposure inflicts cellular damage by generating reactive oxygen species (EROs) and other mechanisms (Kalpana and Menon, 2004) and this injury would be responsible for the release of large amounts of ATP molecules into the extracellular environment. We believe that the NTPDase activity observed in this study possibly contributes to the phenotype of lung damage observed in the histological analysis and this damage would be an outcome of the higher concentrations of extracellular ATP.

The treatment with curcumin was effective in preventing the decrease of NTPDase activity using ATP and ADP as a substrate in rats exposed to cigarette smoke. Many studies have demonstrated the therapeutic effects of curcumin against lung diseases and tissue injuries (Punithavathi et al. 2000; Punithavathi et al. 2003; Kalpana and Menon, 2004; Xu et al. 2007; Aggarwal and Harikumar, 2009). In accordance with our results some authors have demonstrated that curcumin is effective in preventing the deleterious effects promoted by cigarette smoke exposure,

for example NF- κ B activation (Shishodia et al. 2003), lipid alterations (Vanisree and Sudha, 2006) and pulmonary emphysema (Suzuki et al. 2009).

No alterations were observed in AChE activity in LL, however the rats exposed to cigarette smoke showed a more than two fold increase in AChE activity in the PL compared to that found in the control group and a four-fold increase compared to that found in the Cur 50 mg/kg group. According to Kawashima and Fujii (2003), ACh and other mAChR and nAChR agonists enhance lymphocyte cytotoxicity, increase their content of cGMP and inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃), and modulate DNA synthesis and cell proliferation, supporting the idea that the lymphocytic cholinergic system is involved in the regulation of immune function via AChRs coupled to phospholipase-C (PLC). Furthermore, findings from Fujii and Kawashima (2000 a, b, c) suggest that ACh released from T cells induces intracellular Ca⁺⁺ signaling in T and B cells via mAChRs. Additionally, the influx of extracellular Ca⁺⁺, promoted by nAChRs, and the release of intracellular Ca⁺⁺ into the cytoplasm, promoted by mAChRs, increase the concentrations of prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes, enhancing the inflammatory process. As already mentioned, the exceeding ATP molecules, a consequence of the decreased NTPDase activity, could act to damage cells, and this event *per se* also culminates in the increase of inflammation. Accordingly, ACh leads to the increase of the inflammation through the lymphocytic cholinergic system and the increased AChE activity in rats exposed to the cigarette smoke might be a compensatory mechanism to down-regulate the inflammation. Since the effects of cigarette smoke exposure were attenuated by curcumin, as demonstrated by the histological analyses, the groups treated with curcumin would not present a developed inflammatory process, which could explain the fact that there was no difference in AChE activity between the groups treated with curcumin and the control.

In conclusion, the results of this manuscript indicate that oral curcumin administration, at the doses tested is effective in preventing histological injuries and alterations in NTPDase and AChE activity in both lung and peripheral lymphocytes and that curcumin alone did not affect enzyme activities. The effects provided by curcumin are a result of its anti-inflammatory property, since the high levels of ATP are related with cellular injury and inflammation and of its antioxidant property, which protects the cellular membrane from reactive species.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. We also would like to thank FINEP-IBNET and INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection.

Conflicts of Interest statement

There are no actual or potential conflicts of interest.

References

- Aggarwal, B.B. 2010. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. *Annu. Rev. Nutr.* **30**: 173-199.
- Aggarwal, B.B., and Harikumar, K.B. 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **41**(1): 40-59.
- Arun, N., and Nalini, N. 2002. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant. Foods Hum. Nutr.* **57**(1): 41-52.
- Barnes, P.J., Shapiro, S.D., and Pauwels, R.A. 2003. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur. Respir. J.* **22**(4): 672-688.
- Barnes, P.J. 2004. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD.* **1**(1): 59-70.
- Benowitz, N.L. 1996. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**: 597-613.
- Beutler, B., Jiang, Z., Georgel, P., Crozat, K., Croker, B., Rutschmann, S., Du, X., and Hoebe, K. 2006. Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu. Rev. Immunol.* **24**: 353-389.

Dowdall, M.J., Boyne, A.F., and Whittaker, V.P. 1974. Adenosine triphosphate, a constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem. J.* **140**: 1-12.

Bøyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **97**: 77-89.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Burch, L.H., and Picher, M. 2006. E-NTPDases in human airways, Regulation and relevance for chronic lung diseases. *Purinergic Signal.* **2**(2): 399-408.

Chan, K.M., Delfert, D., and Junger, K.D.. 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -NTPase activity. *Anal. Biochem.* **157**(2): 375-378.

Day, C.E., Zhang, S.D., Riley, J., Gant, T., Wardlaw, A.J., and Guillen, C. 2009. A novel method for isolation of human lung T cells from lung resection tissue reveals increased expression of GAPDH and CXCR6. *J. Immunol. Methods.* **342**(1-2): 91-97.

De, R., Kundu, P., Swarnakar, S., Ramamurthy, T., Crowdhury, A., Nair, G.B., and Mukhopadhyay, A.K. 2009. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter*

pilori isolates from India and during infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53** (4): 1592-1597.

Deodhar, S.D., Sethi, R., and Srimal, R.C. 1980. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J. Med. Res.* **71**: 632-634.

Doz, E., Noulin, N., Boichot, E., Guénon, I., Fick, L., Le Bert, M., Lagente, V., Ryfel, B., Schnyder, B., Quesniaux, V.F.J., and Couillin, I. 2008. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J. Immunol.* **180**(2): 1169-1178.

Dwyer, K.M., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T.B., and Robson, S.C. 2007. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* **3**(1-2): 171:180.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., and Feather-Stone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.

Fitzgerald, B.B., and Costa, L.G. 1993. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and brain areas following repeating organophosphate exposure in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **20**(2): 210-216.

Fujii, T. and Kawashima, K. 2000a. Ca^{2+} oscillation is induced by muscarinic acetylcholine receptor stimulation in human leukemic T- and B-cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**: 14-21.

Fujii, T. and Kawashima, K. 2000b. Calcium signaling and c-fos gene expression via M_3 muscarinic acetylcholine receptors in human T- and B-cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **84**(2): 124-132.

Fujii, T. and Kawashima, K. 2000c. YM905, a novel M_3 antagonist, inhibits Ca^{2+} and c-fos gene expression mediated via muscarinic receptors in human T cells. *Gen. Pharmacol.* **35**(2): 71-75.

Grumelli, S., Corry, D.B., Song, L.Z., Song, L., Green, L., Huh, J., Hacken, J., Espada, R., Bag, R., Lewis, D.E., and Kheradmand, F. 2004. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med.* **1**(1): e8.

la Sala, Ferrari, A.D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., and Girolomoni, G. 2003. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukoc. Biol.* **73**(3): 339-343.

Ilbey, Y.O., Ozbek, E., Cekmen, M., Simsek, A., Otunctemur, A., and Somay, A. 2009. Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum. Reprod.* **24**(7): 1717-1725.

Imai, M., Goepfert, C., Kaczmarek, E., and Robson, S.C. 2000. CD 39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**(1): 272-278.

Kalpana, C., Menon, V.P. 2004. Curcumin ameliorates oxidative stress during nicotine-induced lung toxicity in Wistar rats. *Ital. J. Biochem.* **53**(2): 82-86.

Kamat, C. D., Gadai, S., Mhatre, M., Williamson, K.S., Pye, Q.N., and Hensley, K. 2008. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J. Alzheimers. Dis.* **15**(3): 473-493.

Kawashima, K., and Fujii, T. 2003. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.* **74**(6): 675-696.

Koosirirat, C., Limpisarn, S., Changsom, D., Chawansuntati, K., and Wipasa, J. 2010. Investigation of the anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Int. Immunopharmacol.* doi: 10.16/j.intimp.2010.04.021.

Kowluru, R.A., and Kanwar, M. 2007. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutr. Metab.* **4**: 1-8.

Kuper, H., Adami, H.O., and Boffetta, P. 2002. Tobacco use, cancer causation and public health impact. *J. Intern. Med.* **252**(6): 455-466.

Leal, D.B.R., Streher, C.A., Bertoncheli, C.M., Carli, L.F.D., Leal, C.A.M., Silva, J.E.P., Morsch, V.M., and Schetinger, M.R.C. 2005. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1746**(2): 129-134.

Lee, S., Goswami, S., Grudo, A., Song, L., Bandi, V., Goodnight-White, S., Green, L., Hacken-Bitar, J., Huh, J., Bakaeen, F., Coxson, H.O., Cogswell, S., Storness-Bliss, C., Corry, D.B., and Kheradmand, F. 2007. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat. Med.* **13**(5): 567-569.

Maliszewski, C. R., Delespesse, G.J., Schoenborn, M.A., Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Poindexter, K., and Birks, C. 1994. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* **153**(8): 3574-3583.

Michaud, S. E., Dussault, S., Groleau, J., Haddad, P., and Rivard, A.. 2006. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**(2): 275-284.

Molet, S., Belleguic, C., Lena, H., Germain, N., Bertrand, C.P., Shapiro, S.D., Planquois, J.M., Delaval, P., and Lagente, V. 2005. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm. Res.* **54**(1): 31-36.

Pan, C.J., Tang, J.J., Shao, Z.Y., Wang, J., and Huang, N. 2007. Improved blood compatibility of rapamycin-eluting stent by incorporating curcumin. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces*. **59**(1), 105-111.

Pavlov, V.A., and Tracey, K.J. 2005. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav. Immun.* **19**(6): 493-499.

Punithavathi, D., Venkatesan, N., and Babu, M. 2000. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Br. J. Pharmacol.* **131**(2): 169-172.

Punithavathi, D., Venkatesan, N., and Babu, M. 2003. Protective effects of curcumin against amiodarone-induced pulmonary fibrosis in rats. *Br. J. Pharmacol.* **139**(7): 1342-1350.

Rao, C.V., Rivenson, A., Simi, B., and Reddy, B.S. 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer. Res.* **55**(2): 259-266.

Reeta, K.H., Mehla, J., and Gupta, Y.K. 2009. Curcumin is protective against phenytoin-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Brain Res.* **1301**: 52-60.

Schetingler, M.R., Morsch, V.M., Bonan, C.D., and Wyse, A.T. 2007. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors.* **31** (2): 77-98.

Shishodia, S., Potdar, P., Gairola, C.G., and Aggarwal, B.B. 2003. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-KappaB activation through inhibition of IKappaBAlpha kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9, and cyclin D1. *Carcinogenesis*. **24**(7): 1269-1279.

Sopori, M. 2002. Effects cigarette smoke on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**(5): 372-737.

Stämpfli, M. R., and Anderson, G.P. 2009. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **9**(5): 377-384.

Suzuki, M., Betsuyaku, T., Ito, Y., Nagai, K., Odajima, N., Moriyama, C., Nasuhara, Y., and Nishimura, M. 2009. Curcumin attenuates elastase- and cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **296**(4): L614-L623.

Tang, H., Lu, D., Pan, R., Qin, X., Xiong, H., and Dong, J. 2009. Curcumin improves spatial memory impairment induced by human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 V3 loop peptide in rats. *Life Sci.* **85**(1-2): 1-10.

Thomé, G. R., Mazzanti, C.M., Ahmed, M., Corrêa, M., Spanevello, R.M., Maldonado, P.A., Luchese, C., Cargnelutti, D., Morsch, V.M., Duarte, M.M., Fiorenza,

A.M., Nogueira, C.W., De Bona, K.S., Moretto, M.B., Da Luz, S.C., Mazzanti, A., and Schetinger, M.R.C. 2009. Activity of ectonucleotidases and adenosine deaminase in rats exposed to cigarette smoke. *Inhal. Toxicol.* **21**(11): 906-912.

Tolosa E. M. C., and Rodrigues, C.J. 2003. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2nd ed. Manole, São Paulo, p. 1-241.

Vanisree, A. J., and Sudha, N. 2006. Curcumin combats against cigarette smoke and ethanol-induced lipid alterations in rat lung and liver. *Mol. Cell. Biochem.* **288**(1-2): 115-123.

Wu, S. J., Tam, K.W., Tsai, Y.H., Chang, C.C., and Chao, J.C. 2010. Curcumin and saikosaponin a inhibit chemical-induced liver inflammation and fibrosis in rats. *Am. J. Chin. Med.* **38**(1): 99-111.

Xu, M., Deng, B., Chow, Y.L., Zhao, Z.Z., and Hu, B. 2007. Effects of curcumin in treatment of experimental pulmonary fibrosis: a comparison with hydrocortisone. *J. Ethnopharmacol.* **112**(2): 292-299.

Zimmermann, H. 2008. ATP and acetylcholine, equal brethren. *Neurochem. Int.* **52** (4-5): 634-648.

Figures captions

Figure 1

(A) Control; normal histological aspect of rat bronchiole (1) and adjacent alveoli (2), H&E (100X). (B) Smoke exposed rat; focal areas of diffuse alveolar septal thickening (3) occasionally accompanied by emphysematous change (4). A small number of lymphocytes are seen infiltrating peribronchiolar connective tissue (5), H&E (100X). (C) Cur 12.5 mg/kg; (D) Cur 25 mg/kg; (E) Cur 50 mg/kg; normal appearance of rat lung tissue with slight diffuse alveolar septal thickening (6) with chronic interstitial infiltrate and occasional peribronchial lymphoid aggregates (7), H&E (100X).

Figure 2

NTPDase activity in peripheral blood lymphocytes from cigarette smoke exposed rats treated with curcumin and controls using ATP (A, B) and ADP (C, D) as substrate. Bars represent means \pm S.E.M. ($p < 0.05$; $n = 4-7$). ANOVA-Newman-Keuls Multiple Comparison Test. (B) * Different from all groups.

Figure 3

NTPDase activity in lung lymphocytes from cigarette smoke exposed rats treated with curcumin and controls using ATP (A, B) and ADP (C, D) as substrate. Bars represent means \pm S.E.M. ($p < 0.05$; $n = 4$). ANOVA-Newman-Keuls Multiple Comparison Test. (B) * Different from all groups.

Figure 4

AChE activity in peripheral blood (A, B) and lung (C, D) lymphocytes from cigarette smoke exposed rats treated with curcumin and controls. Bars represent means \pm S.E.M. ($p < 0.05$; $n = 4-10$). ANOVA-Newman-Keuls Multiple Comparison Test. (B) * Different from all groups.

Figure 1

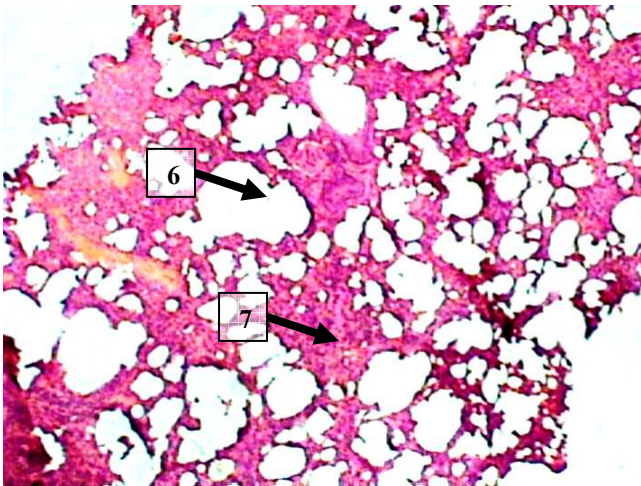
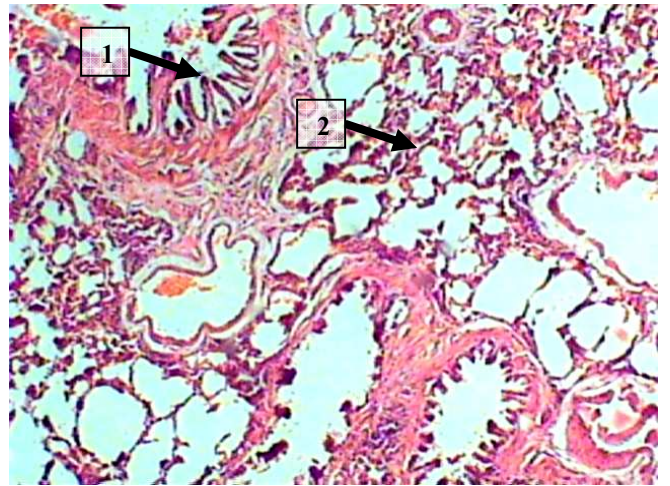
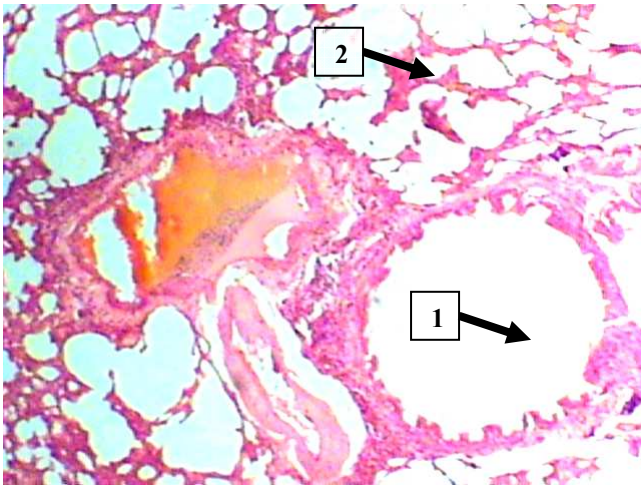
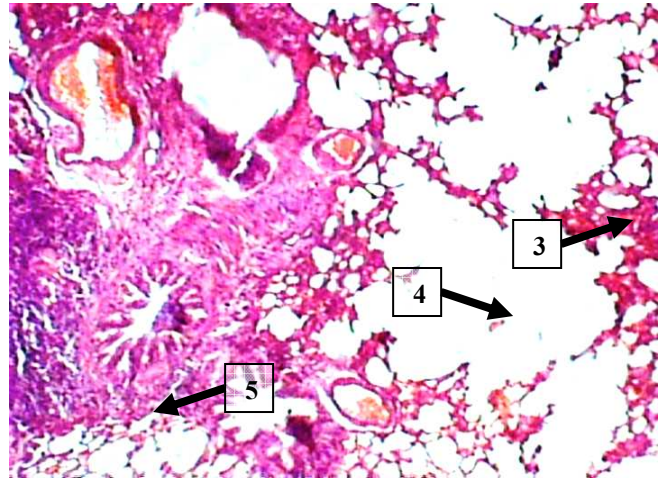
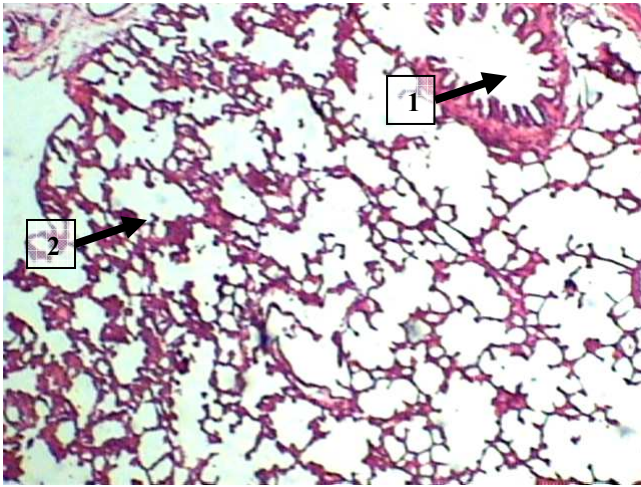


Figure 2

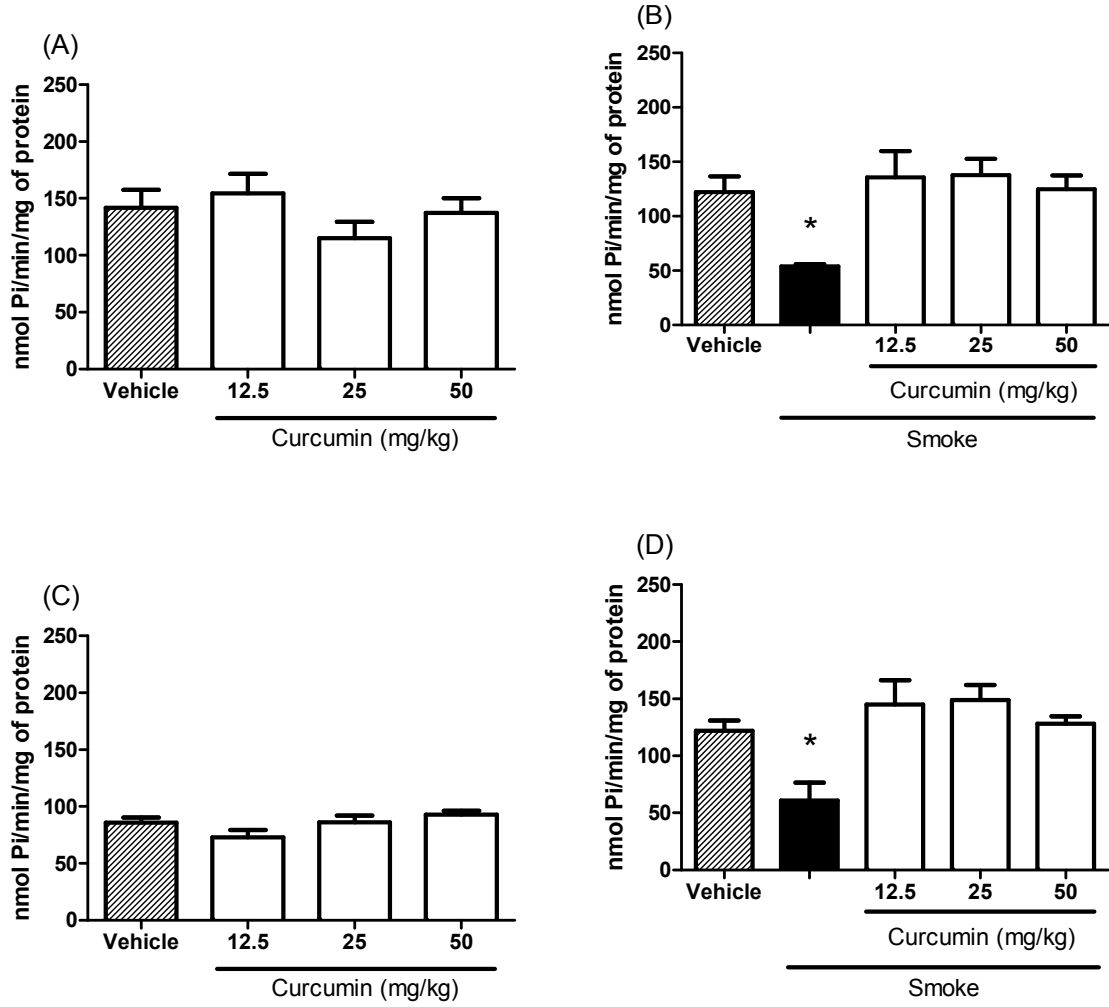


Figure 3

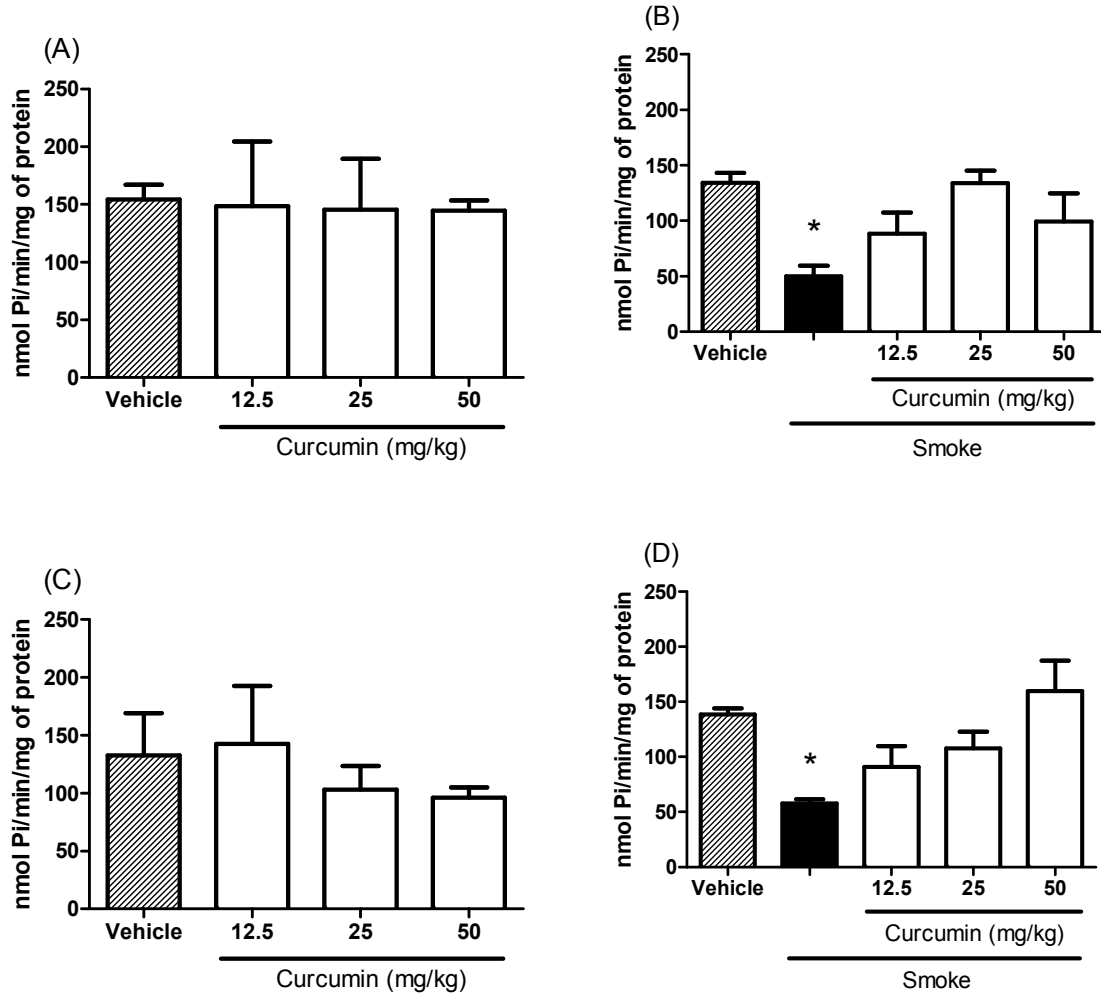
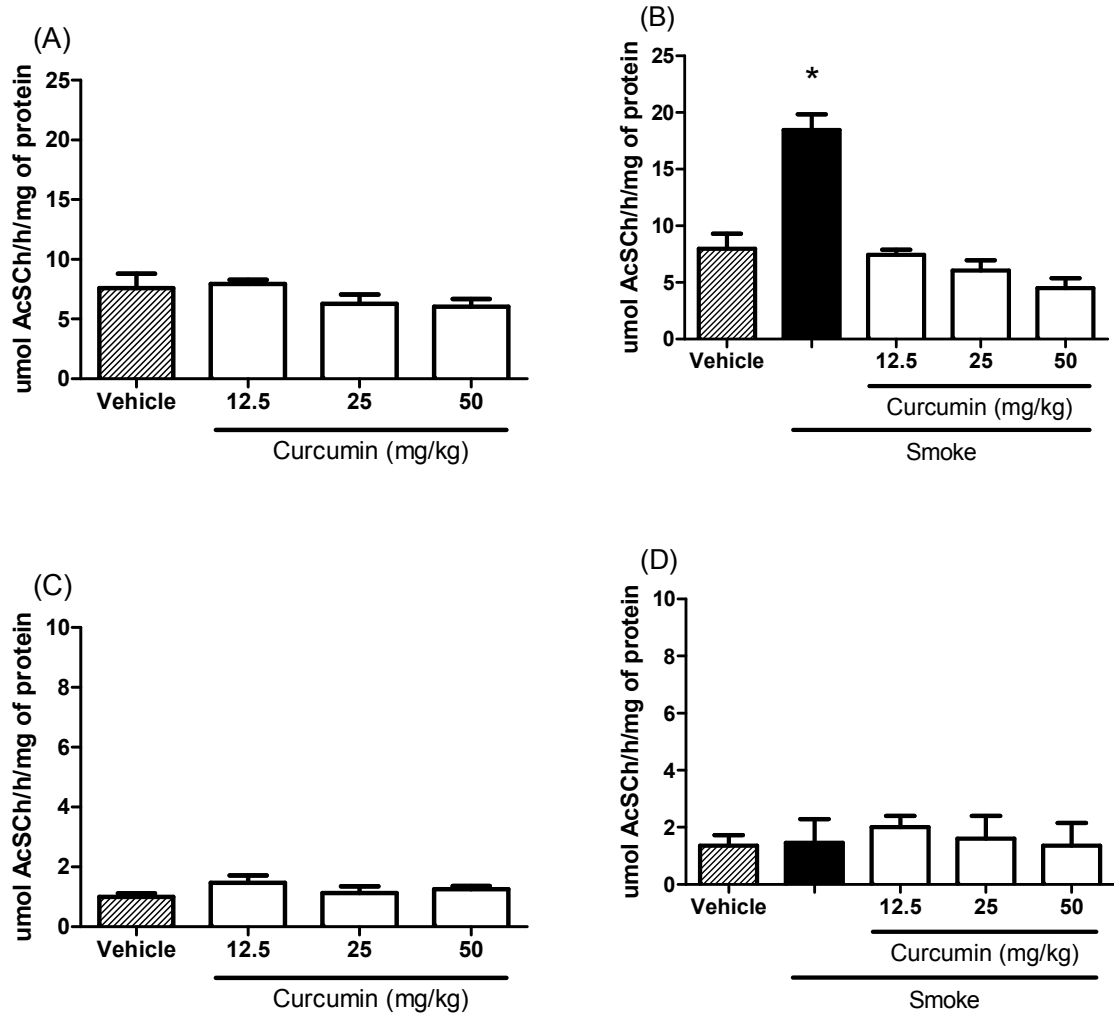


Figure 4



5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da curcumina, um polifenol que tem demonstrado ser capaz de suprimir os efeitos de diversos estímulos inflamatórios (AGGARWAL, 2010; KOOSIRIRAT et al., 2010), sob a atividade das enzimas NTPDase e AChE em linfócitos periféricos (PL) e linfócitos isolados de tecido pulmonar (LL) em um modelo de exposição passiva à fumaça do cigarro.

Devido à necessidade de uma técnica apropriada para a extração de linfócitos pulmonares e à pequena quantidade de amostra obtida dos animais utilizados no estudo, primeiramente, visou-se estabelecer um protocolo para o isolamento de células mononucleares de pulmão (LMCs) de ratos.

Assim, utilizando como referência diferentes protocolos, desenvolveu-se uma nova metodologia para o isolamento de células mononucleares ricas em linfócitos com reagentes comumente utilizados em nosso laboratório, como solução fisiológica e Ficoll-Hypaque, e com uma amostra pequena de tecido (4g). Dos protocolos já descritos até então, o primeiro traz a separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano (BÖYUM, 1968), que também pode ser usada para a separação destas mesmas células sanguíneas de outros animais. Em outra metodologia disponível, linfócitos T foram isolados de espécimes provenientes de ressecção pulmonar com massa de 10 a 40 g (DAY et al., 2009), o que a tornou inadequada para a separação de células de pulmão de ratos devido à quantidade de tecido necessária. Além da quantidade de tecido requerida para a extração dos linfócitos, esta última técnica ainda necessita de reagentes como o meio de cultura celular RPMI, soro fetal bovino (SFB) e tampão fosfato, o que dificultaria o uso de células extraídas por este método nos ensaios para determinação da atividade da enzima NTPDase, visto que sua atividade enzimática é calculada pela quantidade de fosfato inorgânico liberada.

Após a padronização do protocolo para a separação dos linfócitos pulmonares, menos de 5% das PBMCs e 8% das LMCs foram coradas com o azul de tripan, indicando a eficácia desta metodologia para a obtenção de células íntegras para a realização de ensaios enzimáticos ou para outros propósitos. Com esta metodologia obteve-se cerca de $1,2 \times 10^6$ PBMCs/mL de sangue e $0,8 \times 10^6$

células/grama de tecido pulmonar, enquanto outros pesquisadores (DAY et al., 2009) foram capazes de separar 10^7 células/grama de tecido proveniente de ressecção pulmonar. Contudo, esta fonte de amostra é um sítio inflamação, o qual é amplamente infiltrado por células inflamatórias como linfócitos (COUSSENS & WERB, 2002; AZAD et al., 2008; STÄMPFLI & ANDERSON, 2009), o que, acredita-se ter contribuído para a grande quantidade de células isoladas.

Obteve-se uma percentagem considerável de linfócitos de tecido pulmonar (>80%) em comparação com o sangue periférico (>90%), contudo, encontrou-se algumas células como macrófagos e em menor grau, monócitos e células polimorfonucleares (PMNs). Nas PBMCs isoladas de sangue, encontraram-se apenas alguns monócitos e PMNs.

Os resultados obtidos para a atividade da NTPDase, utilizando ATP ou ADP como substrato e expressos por miligrama de proteína, em PBMCs foram similares aos obtidos por nosso grupo de pesquisa (LEAL et al.; 2005; SPANEVELLO et al., 2010; SAUCEDO et al., 2010). Contudo em LMCs apresentaram-se em torno de três vezes mais altos do que nas PBMCs. Sabe-se que altos níveis de ATP podem resultar de tecido epitelial lesado, lise bacteriana, estresse mecânico e osmótico ou pode estar presente em condições de repouso, podendo causar edema pulmonar e exacerbar respostas inflamatórias (LAZAROWSKI et al., 2003; BURCH & PICHER, 2006). Assim, acredita-se que os linfócitos de pulmão, os quais também atuam na remoção do excesso de ATP, possuem uma configuração adaptativa que levaria à expressão aumentada da enzima NTPDase ou, talvez, a própria enzima sofresse uma alteração tridimensional, uma fosforilação, metilação ou alguma outra modificação estrutural que levasse ao aumento da atividade catalítica.

Surpreendentemente, quando se analisou a correlação entre os resultados obtidos para a hidrólise de ATP e ADP pela NTPDase expressa em nmol de Pi/min/mg de proteína, nmol de Pi/min/milhão de células e nmol de Pi/min/milhão de células viáveis, obteve-se uma correlação muito forte para sangue e pulmão o que sugere que os resultados para a atividade desta enzima podem ser expressos tanto em miligrama de proteína, milhões de células ou milhões de células viáveis.

Após a padronização da técnica de separação de linfócitos de pulmão foram realizados os experimentos com a curcumina e a exposição passiva à fumaça do cigarro.

Diversos estudos, corroborando com nossos resultados, têm demonstrado os danos histológicos observados no tecido pulmonar em consequência da exposição à fumaça do cigarro (SUZUKI et al., 2009; THOMÉ et al., 2009). Ainda, diversas alterações que acometem o sistema imune têm sido investigadas. Doz e colaboradores (2008), por exemplo, demonstraram que a exposição aguda à fumaça do cigarro (2 cigarros, duas vezes ao dia) induz inflamação aguda dependente da sinalização pelo receptor TLR4 (*Toll like receptor 4*) e IL-1R1 (*Interleukin-1R1*), e um recrutamento de PMNs no espaço broncoalveolar e parênquima pulmonar. Alguns autores demonstraram que as células T ativadas de pulmões enfisematosos exibem um fenótipo predominante do tipo T_H1 (*T helper type 1*), que pela liberação de quimiocinas CXCL10 controlam a liberação de metaloproteinases elastolíticas (MMPs) (BARNES et al., 2003; MOLET et al., 2005; MICHAUD et al., 2006). Sabe-se que a fumaça do cigarro possui características tanto supressoras quanto ativadoras do sistema imune (SOPORI, 2002) que podem persistir durante anos após o cessar do hábito (BEUTLER et al., 2006), e estes efeitos observados podem ser respostas auto-imunes a um antígeno pulmonar endógeno induzido pela exposição ao cigarro. Considerando este fato e com o conhecimento de que células T_H1 estão relacionadas a processos auto-imunes, Lee et al. (2007) investigaram a participação do colágeno humano do tipo I e peptídeos de elastina na secreção de citocinas e demonstraram que o enfisema é uma doença auto-imune caracterizada pela presença de anticorpos anti-elastina e respostas T_H1.

Levando em consideração que as enzimas do sistema purinérgico estão intimamente envolvidas com a modulação do sistema imune, participando da modulação de eventos pró e anti-inflamatórios (DWYER et al., 2007), foi investigado o efeito da curcumina em PL e LL de ratos expostos à fumaça do cigarro sob a atividade da NTPDase. Observou-se em PL de ratos expostos ao cigarro que a atividade da enzima NTPDase utilizando ATP como substrato estava diminuída em comparação ao grupo controle e que nestas mesmas células a atividade da enzima, utilizando o ADP como substrato, também estava diminuída. Acredita-se que esta redução na hidrólise de ATP represente um aumento na concentração deste nucleotídeo no contexto fisiológico e que a redução na hidrólise de ADP seja apenas uma consequência da redução deste nucleotídeo.

Diversas funções biológicas para o ATP têm sido demonstradas, de interesse a regulação de processos inflamatórios. Para executar esta função, moléculas de

ATP liberadas interagem com receptores do tipo P2X7, induzindo a liberação de citocinas. Exemplo disso é que o estímulo de linfócitos e do endotélio pelo ATP tem sido relacionado com a indução de respostas pró-inflamatórias, como a liberação de interleucina 1 (IL-1) (ou IL-8) (IMAI et al., 2000; IA SALA et al., 2003), o que pode contribuir para os efeitos sistêmicos da fumaça do cigarro e da nicotina. A exposição à fumaça do cigarro não age apenas lesando o tecido pulmonar, mas também afeta outros sistemas como o cardiovascular. De acordo com BENOWITZ (1996) a nicotina afeta a função cardiovascular e também estimula a liberação de catecolaminas pelas glândulas adrenais, aumentando os efeitos cardiovasculares.

O tratamento com a curcumina, polifenol conhecido por suas propriedades antiinflamatórias, foi eficaz em prevenir a redução da atividade da NTPDase utilizando ATP ou ADP como substrato em ratos expostos ao cigarro. A redução dos níveis extracelulares de ATP poderia ser uma das formas pelas quais a curcumina age como uma molécula antiinflamatória. Ainda, a curcumina possui uma forte propriedade antioxidante, a qual, em parte é responsável por manter a integridade da superfície celular. Considerando que os níveis pericelulares de ATP são menores que no citoplasma, esta capacidade antioxidante pode contribuir em manter os níveis extracelulares de nucleotídeos normais, uma vez que protege as membranas de espécies reativas. Diversos estudos já investigaram e demonstraram os efeitos antiinflamatórios da curcumina (KOWLURU & KANWAR, 2007; KOOSIRIRAT et al., 2010; WU et al., 2010) corroborando com nossos resultados.

Quanto a atividade da NTPDase em LL de ratos expostos à fumaça do cigarro observou-se um decréscimo significativo na atividade da enzima utilizando ATP ou ADP como substrato. Sabe-se que células que sofrem algum tipo de dano liberam quantidades significativas de ATP no meio pericelular (BURCH & PICHER, 2006). A exposição à fumaça do cigarro causa dano celular pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros mecanismos (KALPANA & MENON, 2004) e este dano pode ser responsável pela liberação de grandes quantidades de moléculas de ATP no ambiente extracelular. Acredita-se que a atividade da NTPDase observada neste estudo possivelmente contribua para o fenótipo de dano pulmonar observado nas análises histológicas e que este dano seja conseqüente das altas concentrações de ATP extracelular.

O tratamento com a curcumina foi eficaz em prevenir o decréscimo na atividade da NTPDase usando ATP ou ADP como substrato em ratos expostos ao

cigarro. Diversos estudos já demonstraram os efeitos terapêuticos da curcumina contra doenças pulmonares e danos teciduais (PUNITHAVATHI et al., 2000; PUNITHAVATHI et al., 2003; KALPANA & MENON, 2004; XU et al., 2007; AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009). Concordantes com nossos resultados, alguns autores já demonstraram que a curcumina é eficaz em prevenir os efeitos deletérios promovidos pela exposição à fumaça do cigarro, como por exemplo, a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (SHISHODIA et al., 2003), alterações lipídicas (VANISREE & SUDHA, 2006) e enfisema pulmonar (SUZUKI et al., 2009).

Não foram observadas alterações na atividade da enzima AChE em LL, contudo ratos expostos à fumaça do cigarro apresentaram um aumento na atividade da AChE em PL, representando mais de duas vezes a atividade do grupo controle e quatro vezes a atividade do grupo Cur 50 mg/kg. De acordo com Kawashima e Fujii (2003) a ACh e outros agonistas de receptores muscarínicos (mAChRs) e nicotínicos (nAChRs) de acetilcolina aumentam a citotoxicidade linfocitária, aumentam o conteúdo intracelular de GMP cíclico (GMPc) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), e modulam a síntese de DNA e proliferação celular, suportando a idéia de que o sistema colinérgico linfocítico está envolvido na regulação da função imune via receptores de acetilcolina (AChRs) ligados a fosfolipase C (PLC). Ainda, resultados de Fujii e Kawashima (2000 a, b, c) sugerem que a ACh liberada de células T induzem a sinalização intracelular de Ca⁺⁺ em células T e B via mAChRs. Adicionalmente, o influxo de Ca⁺⁺ extracelular, promovido pelos receptores nAChRs, e a liberação de Ca⁺⁺ intracelular no citoplasma, promovido pelos segundos mensageiros de receptores mAChRs aumentam as concentrações de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, aumentando o processo inflamatório. Como já mencionado, o excedente de moléculas de ATP, em consequência da redução da atividade da NTPDase pode atuar lesando células, e este evento *per se* também culmina no aumento da inflamação. Seguindo esta linha de raciocínio, a ACh leva ao aumento da inflamação pelo sistema colinérgico linfocítico e a atividade da AChE aumentada em ratos expostos à fumaça do cigarro pode ser um mecanismo adaptativo para diminuir a inflamação. Uma vez que os efeitos da exposição à fumaça do cigarro tenham sido atenuados pela curcumina, como demonstrado pelas análises histológicas, os grupos tratados com a curcumina não apresentariam o desenvolvimento de um processo inflamatório, o que explicaria a

atividade da AChE nos grupos tratados com a curcumina, sem diferir do grupo controle.

Finalmente, os resultados de nossos estudos indicam que a curcumina administrada oralmente nas doses testadas foi eficaz em prevenir os danos histológicos, alterações na atividade das enzimas NTPDase e AChE em linfócitos periféricos e pulmonares e que a curcumina sozinha não afetou as atividades enzimáticas. Este efeito demonstrado nos tratamentos com a curcumina é um resultado de sua propriedade anti-inflamatória, uma vez que os altos níveis de ATP estão relacionados com dano celular e inflamação, e sua propriedade antioxidante, a qual protege as membranas celulares de espécies reativas.

6 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- O protocolo otimizado de separação de linfócitos pulmonares foi eficaz em uma separação rica em linfócitos com alta viabilidade. Além disso, a forte correlação entre as formas em que a atividade da enzima foi expressa usando ATP e ADP como substrato indica que os resultados podem ser expressos tanto em miligramas de proteína, quanto em milhões de células quanto em milhões de células viáveis.
- De acordo com os resultados das análises histológicas os ratos expostos à fumaça do cigarro apresentaram alterações enfisematosas e o tratamento com a curcumina, por sua vez, demonstrou ser capaz de impedir tais lesões.
- O tratamento com a curcumina preveniu a redução na atividade ATPasica e ADPasica da enzima NTPDase em linfócitos periféricos e pulmonares de ratos expostos à fumaça do cigarro, reforçando sua propriedade antiinflamatória, uma vez que níveis elevados de ATP refletem em um quadro pró-inflamatório.
- A atividade da AChE em linfócitos periféricos de ratos expostos à fumaça do cigarro apresentou-se aumentada e o tratamento com a curcumina foi eficaz em manter os níveis basais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e Molecular**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

ADEM, A.; NORDBERG, A.; SLANINA, P. A muscarinic receptor type in human lymphocytes: a comparison of 3H-QNB binding to intact lymphocytes and lysed lymphocyte membranes. **Life Sciences**, v.38, p.1359-1368, 1986.

ADINOLFI, E. et al. P₂X₇ receptor: Death or life?. **Purinergic signaling**, v.1, p.219-227, 2005.

AGGARWAL, B.B. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. **Annual Review of Nutrition**, v.30, p.173-199, 2010.

AGGARWAL, B.B.; HARIKUMAR, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.41, n.1, p.40-59, 2009.

ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.l.], Rio de Janeiro, v.96, n.5, p.723-728, 2001.

ARAÚJO, M.C. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1740, p.421-426, 2005.

ARUN, N.; NALINI, N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. **Plants Foods for Human Nutrition**, v.57, n.1, p.41-52, 2002.

AZAD, N.; ROJANASAKUL, Y.; VALLYATHAN, V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species, **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.11, p.1-15, 2008.

BALA, K.; TRIPATHY, B. C.; SHARMA, D. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. **Biogerontology**, [S.l.], v.7, n.2, p.81-89, 2006.

BAKER, R.R.; ROBINSON, D.P. Tobacco combustion – the last ten years. **Research Advanced Tobacco Science**, v.16, p.3-71, 1990.

BARNES, P.J.; SHAPIRO, S.D.; PAUWELS, R.A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. **The European Respiratory Journal**, v.22, n.4, p.672-688, 2003.

BARNES, P.J. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. **COPD**, v.1, n.1, p.59-70, 2004.

BATTASTINI, A. M. O. et al. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochemical Research**, v.16, p.1303-1310, 1991.

BENOWITZ, N.L. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.36, p.597-613, 1996.

BEUTLER, B. et al. Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large. **Annual Review of Immunology**, v.24, p.353-389, 2006.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, v.43, p.5511-5519, 2004.

BONAN, C.D. et al. Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: implications in physiological and pathological conditions. **Drug Development Research**, v.52, p. 57-65, 2001.

BONAN, C.D. et al. Changes in synaptosomal ectonucleotidases activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v.39, p. 229-238, 2000.

BORK, P.; SANDER, C.; VALENCIA, A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock protein. **Proceedings of The National Academy of Sciences USA**, v.89, p.7290–7294, 1992.

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 1g, **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v.97, p.77-89, 1968.

BURCH, L.H.; PICHER, M. E-NTPDases in human airways, Regulation and relevance for chronic lung diseases, **Purinergic Signalling**, v.2, n.2, p.399-408, 2006.

BURNS, A.R. et al. Respiratory epithelial permeability after cigarette smoke exposure in guinea pigs. **Journal of Applied Physiology**, v.66, p.2109-2116, 1989.

CARL, A. et al. **Fundamentos de química clínica**. 4. ed. São Paulo: Guanabara, 1998.

CHAN, K.; DELFRET, D.; JUNGES, K. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v.157, p. 375–380, 1986.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v.420, p.860-867, 2002.

COPPOLA, A. et al. Vigorous exercise acutely changes platelets and B-lymphocyte CD39 expression. **Journal of Applied Physiology**, v.98, n.4, p.1414-1419, 2005.

DAY, S.D. et al. A novel method for isolation of human lung T cells from lung resection tissue reveals increased expression of GAPDH and CXCR6, **Journal of Immunological Methods**, v.342, n.1-2, p.91-7, 2009.

DE, R. et al. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.4, p.1592-1597, 2009.

DE LORENZO, S. et al. Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y receptors at the mouse neuromuscular junction. **Neuroscience**, v.142, p.71-85, 2006.

De BOER, W.I. et al. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. **Journal of Pathology**, v.190, p.619-626, 2000.

DELLA ROSA, H.V. Importância do controle biológico na prevenção das intoxicações. **Revista da Saúde Ocupacional**, v.16, p.51-52, 1981.

DEODHAR, S.D.; SETHI, R.; SRIMAL, R.C. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). **The Indian Journal of Medical Research**, v.71, p.632-634, 1980.

DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. et al. Colocalisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. **Neuropharmacology**, v.42, p.20-33, 2002.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide Receptors: An emerging Family of Regulatory Molecules in Blood Cells. **Blood**, v.97, p.587-600, 2001.

DOMBROWSKI, K. et al. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. **Immunological Reviews**, v.161, p.111-118, 1998.

DOWDALL, M.J.; BOYNE, A.F.; WHITTAKER, V.P. Adenosine triphosphate, a constituent of cholinergic synaptic vesicles. **The Biochemical Journal**, v.140, p.1-12, 1974.

DWYER, K.M. et al. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**, v.3, n.1-2, p.171-180, 2007.

DYE, J.A.; ADLER, K.B. Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. **Thorax**, v.49, p.845-834, 1994.

ENJYOJI, K. et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v.5, p.1010–1017, 1999.

ERLINGE, D. Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. **General Pharmacology**, v.1, p.1–8, 1998.

FERRARI, D. et al. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. **FEBS Letters**, v.47, p.71-75, 1999.

FILHO, A.B.C. et al. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.30, n.1, p.171-175, 2000.

FILIPPINI, A. et al. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector junctions. **Proceedings of The National Academy of Sciences USA**, v.87, p.8267-8271, 1990.

FLAHERTY, K.M.; MCKAY, D.B.; KABSCH, W. Similarity of the three dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.5041–5045, 1991.

FUJII, T.; KAWASHIMA, K. Ca^{2+} oscillation is induced by muscarinic acetylcholine receptor stimulation in human leukemic T- and B-cell lines. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.362, p.14-21, 2000a.

FUJII, T.; KAWASHIMA, K. Calcium signaling and c-fos gene expression via M_3 muscarinic acetylcholine receptors in human T- and B-cells. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.84, n.2, p.124-132, 2000b.

FUJII, T.; KAWASHIMA, K. YM905, a novel M_3 antagonist, inhibits Ca^{2+} and c-fos gene expression mediated via muscarinic receptors in human T cells. **General Pharmacology**, v.35, n.2, p.71-75, 2000c.

FURST, A.; RADDING, S.B.; WURZEL, K.A.; In.: WEXLER, P. **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego: Academic, v.605, p.207-209: Cadmium, 1998.

GORDON, M.A.; COHEN, J.J.; WILSON, I.B. Muscarinic cholinergic receptors in murine lymphocytes: demonstration by direct binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.75, p.2902-2904, 1978.

GOYER, R.A. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. 5ed. New York: McGraw-Hill, Cap.23, p.691-712: Toxic effects of metals, 1996.

GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras. **Biochemical Journal**, v.41, p.1947–1956, 2002.

GRUMELLI, S. et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. **PLoS Medicine**, v.1, n.1, p.e8, 2004.

GYTON. **Fisiologia Humana**. 6ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985.

HAUTAMAKI, R.D. et al. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. **Science**, v.277, p.2002-2004, 1997.

HOU, M. et al. UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P2Y₆ receptors **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v.282, p.H784–H792, 2002.

IA SALA, A. et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v.73, n.3, p.339-343, 2003.

ILBEY, Y.O. et al. Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. **Human Reproduction**, v.24, n.7, p.1717-1725, 2009.

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

ILLIANO, G. et al. Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate and the action of insulin and acetylcholine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, p.2443-2447, 1973.

IMAI, M. et al. CD 39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.270, n.1, p.272-278, 2000.

JAHNSEN, F.L. et al. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. **Journal of Immunology**, v.177, p.5861-5867, 2006.

JONES, J.G. et al. Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. **Lancet**, v.1, p.66-68, 1980.

KALCHER, K.; KERN, W.; PIETSCH, R. *Cadmium* and lead in the smoke of a filter cigarette. **The Science of the Total Environment**, v.128, p.21-35, 1993.

KALPANA, C.; MENON, V.P. Curcumin ameliorates oxidative stress during nicotine-induced lung toxicity in Wistar rats. **The Italian Journal of Biochemistry**, v.53, n.2, p.82-86, 2004.

KAMAT, C. D. et al. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.15, n.3, p.473-493, 2008.

KANSAS, G.S.; WOOD, G.S.; TEDDER, T.F. Expression, distribution and biochemistry of human CD30: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.16, p.2235-2244, 1991.

KAWSHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**, v.86, p.29-48, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**, v.74, n.6, p.675-696, 2003.

KOOSIRIRAT, C. et al. Investigation of the anti-inflammatory effect of Curcuma longa in Helicobacter pylori-infected patients. **International Immunopharmacology**, doi: 10.16/j.intimp.2010.04.021, 2010.

KOWLURU, R.A.; KANWAR, M. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. **Nutrition & Metabolism**, v.4, n.1-8, 2007.

KOZIAK, K. et al. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. **Thrombosis and Haemostasis**, v.82, n.5, p.1538-1544, 1999.

KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S.A.; LAVOIE E., G. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDase 1, 2, 3 and 8. **Purinergic Signalling**, v.1, p.193-204, 2005.

KUNAPULI, S.P. et al. Platelet Purinergic receptors. **Current Opinion in Pharmacology**, v.3, p.175-180, 2003.

KUPER, H.; ADAMI, H.O.; BOFFETTA, P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. **Journal of Internal Medicine**, v.252, n.6, p.455-466, 2002.

LARINI, L. In: LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, 230 p. Cap. 4, p.93-98: Inseticidas de Origem Vegetal, 1999.

LARINI, L.; SALGADO, P.E.T. In.: LARINI, L. **Toxicologia**. 3ed. São Paulo: Manole, 301p. Cap.5, p.59-72, 1997.

LAZAROWSKI, E.R.; BOUCHER, R.C.; HARDEN, T.K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules, **Molecular Pharmacology**, v.64, n.4, p.785-795, 2003.

LEAL, D.B.R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1721, n.1-3, p.9-15, 2005.

LEE, S. et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. **Nature Medicine**, v.13, n.5, p.567-569, 2007.

LING, K.K.Y. et al. ATP potentiates the formation of AChR aggregate in the co-culture of NG108-15 cells with C2C12 myotubes. **FEBS Letters**, v.579, p.2469-2474, 2005.

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

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

MASLINSKI, W. et al. Muscarinic receptors and receptor mediated actions on rat lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.17, p.256-274, 1988.

MASLINSKI, W. Cholinergic receptors of lymphocytes. **Brain Behavioral Immunity**, v.3, p.1-14; 1989.

MALISZEWSKI, C. R. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. **The Journal of Immunology**, v.153, n.8, p.3574-3583, 1994.

MARCUS, A. J. et al. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. **Journal of Clinical Investigation**, v.996, p.1351–1360, 1997.

MARCUS, A. J. et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD 39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.12, p.2497–2509, 2003.

MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v.41, n.1, p.31-91, 1993.

MESULAM, M.M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**, v.110, p.627-639, 2002.

MICHAUD, S. E. et al. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.41, n.2, p.275-284, 2006.

MOLET, S. et al. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Inflammation Research**, v.54, n.1, p.31-36, 2005.

MITCHEL, R.A.; DRAKE, J.E.; WITTLIN, L.A. Erythrocyte porphobilinogen synthase (delta-aminolaevulinic acid dehydratase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans. **Clinical Chemistry**, v.23:1, p.105-111, 1977.

NAKAIAMA, H. Nicotine metabolism in mammals. **Drugs Metabolism Interaction**, v.6, p.95-122, 1993.

NEARY, J.T.; ABBRACCHIO, M.P. Trophic roles of purines and pyrimidines. In: **HANDBOOK OF PHARMACOLOGY: PURINERGIC AND PYRIMIDINERGIC SIGNALLING**. Berlin, Germany: **Springer**, p. 305–338, 2001.

NUNES-TAVARES, N. et al. A Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, p.1071-1079, 2002.

- PAN, C.J. et al. Improved blood compatibility of rapamycin-eluting stent by incorporating curcumin. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v.59, n.1, p.105-111, 2007.
- PAPANIKOLAOU, A. et al. Cholesterol-dependent Lipid Assemblies Regulate the Activity of the Ecto-nucleotidase CD39. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.26404-26414, 2005.
- PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 2ed. Oxford, p.432-482, 2001.
- PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.19, n.6, p.493-499, 2005.
- PILLA, C.; EMANUELLI, T.; BATTASTINI, A. M. O.; DIAS, R. D.; SARKIS, J.. J. ATP diphosphohydrolase (APIRASE, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v.7, p.225– 230, 1996.
- PRADO, M.A.M. et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry Internacional**, v.41, p.291-299, 2002.
- PUNITHAVATHI, D.; VENKATESAN, N.; BABU, M. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.131, n.2, p.169-172, 2000.
- PUNITHAVATHI, D.; VENKATESAN, N.; BABU, M. Protective effects of curcumin against amiodarone-induced pulmonary fibrosis in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.139, n.7, p.1342-1350, 2003.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK G. Tri Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v.50, p.413-492, 1998.
- RANG, H.P. et al. **Dependência e abuso de fármacos**. In: Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. (Ed). *Farmacologia*. Elsevier, São Paulo, Brasil, p.674-695, 2004.
- RAO, C.V. et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. **Cancer Research**, v.55, n.2, p.259-266, 1995.

RATHBONE, M. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p.663-690, 1999.

REETA, K.H.; MEHLA, J.; GUPTA, Y.K. Curcumin is protective against phenytoin-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. **Brain Research**, v.1301, p.52-60, 2009.

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.

ROSEMBERG, J. **Tabagismo, sério problema de saúde pública**. São Paulo, ALMED\EDUSP, 1981, 370p.

RUSSELL, R.E. et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.283, L867-L873, 2002.

SALGADO, P.E.T. In.: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 515p. Parte3, p.153-172, Toxicologia dos metais, p.135: Monitorização biológica, 1997.

SARKIS, J. et al. ATP diphosphohydrolases: and overview. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.43, p.131-136, 1995.

SAUCEDO, E.M. et al. Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in lymphocytes and platelets of immunosuppressed rats, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.64, n.6, p.437-440, 2010.

SCHACHTER, M. Endothelium and smooth muscle: trophic interactions and potential for therapeutic intervention. **Journal of Human Hypertension**, v.4, p.17–21, 1990.

SCHULTE, A.M. et al. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. **Biochemical Journal**, v.38, p.2248–2258, 1999.

SEEHOFER, D. et al. Curcumin attenuates oxidative stress and inflammatory response in the early phase after partial hepatectomy with simultaneous

intraabdominal infection in rats. **Journal of Surgical Research**, v.17, n.4, p.1-6, 2009.

SETHIA, P. et al. Curcumin attenuates aluminium-induced functional neurotoxicity in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [S.l.], v.93, n.1, p.31-39, 2009.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. **Blood**, v.99, p.2801–2809, 2002.

SHI, J. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.17471-17478, 2001.

SHISHODIA, S. et al. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-KappaB activation through inhibition of IKappaBalpha kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9, and cyclin D1. **Carcinogenesis**, v.24, n.7, p.1269-1279, 2003.

SMITH, T.M.; KIRLEY, T.L. Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: Evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. **Biochemical Journal**, v.38, p.321–328, 1999.

SOPORI, M. Effects cigarette smoke on the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, v.2, n.5, p.372-737, 2002.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v.2, p.294-302, 2001.

SPANVELLO, R.M. et al. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients, **Clinica Chimica Acta**, v.411, n.3-4, p.210-214, 2010.

STÄMPFLI, M. R.; ANDERSON, G.P. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. **Nature Reviews. Immunology**, v.9, n.5, p.377-384, 2009.

STROM, T.B. et al. Cholinergic augmentation of lymphocyte mediated cytotoxicity: a study of the cholinergic receptor of cytotoxic T lymphocytes. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v.71, p.1330-1333, 1974.

SUSSMAN, J.L. et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo California: A prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v.253, p.872-879, 1991.

SUZUKI, M. et al. Curcumin attenuates elastase- and cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. **American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology**, v.296, n.4, p.L614-L623, 2009.

TACHIKAWA, H. et al. Ab initio model study on acetylcholinesterase catalysis: potential energy surfaces of the protontransfer reactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.79, p.11-23, 2005.

TANG, H. et al. Curcumin improves spatial memory impairment induced by human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 V3 loop peptide in rats. **Life Sciences**, v.85, n.1-2, p.1-10, 2009.

TAYLOR, P.; BROWN, J.H. **Acetylcholine. Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects**. In: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Albers, R.W.; Molinoff, P.B. (Ed.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, p.214-242, 1999.

TAYLOR, P.; RADIC, Z.. The cholinesterases: from gene to proteins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.34, p.281-320, 1994.

THOMÉ, G. R. et al. Activity of ectonucleotidases and adenosine deaminase in rats exposed to cigarette smoke. **Inhalation Toxicology**, v.21, n.11, p.906-912, 2009.

TOLLERUD, D.J. et al. Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells. **American Reviews of Respiratory Diseases**, v.139, p.194-198, 1989.

UNGLESS, M.A.; CRAGG, S.J. A Choreography of nicotinic receptors directs the dopamine neuron routine. **Neuron**, v.15, p.815-816, 2006.

VANISREE, A. J.; SUDHA, N. Curcumin combats against cigarette smoke and ethanol-induced lipid alterations in rat lung and liver. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.288, n.1-2, p.115-123, 2006.

VORHOFF, T.; ZIMMERMANN, H.; PELLETIER, J. Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to members of the E-NTPDase family and actin. **Purinergic Signalling**, v.1, p.259–270, 2005.

WANG, T.F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto- (Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.9898–9901, 1996.

WU, S. J. et al. Curcumin and saikosaponin a inhibit chemical-induced liver inflammation and fibrosis in rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.38, n.1, p.99-111, 2010.

XU, M. et al. Effects of curcumin in treatment of experimental pulmonary fibrosis: a comparison with hydrocortisone. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n.2, p.292-299, 2007.

ZALKMAN, S.J. et al. Muscarinic cholinergic binding sites on intact human lymphocytes. **Life Sciences**, v.29, p.69-73, 1981.

ZHAO, J. et al. Neuroprotective effect of curcumin on transient focal cerebral ischemia in rats. **Brain Research**, v.1229, p.224-232, 2008.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.20, p.231-236, 1999.

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

ZIMMERMANN, H. ATP and acetylcholine, equal brethren. **Neurochemistry International**, v.52, n.4-5, p.634-648, 2008.

ZIGANSHIN, A.U.; HOYLE, C.; BURNSTOCK, G. Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. **Drug Development Research**, v.32, p.134-146, 1994.