



UFSM

Dissertação de Mestrado

**HIDRÓLISE EXTRACELULAR DE ATP E ADP PELA ENZIMA
NTPDase1 EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA CRÔNICA-B**

Rafael Fernandes Zanin

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**HIDRÓLISE EXTRACELULAR DE ATP E ADP PELA ENZIMA
NTPDase1 EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA CRÔNICA-B**

por

Rafael Fernandes Zanin

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

PPGBT

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2006

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

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

**HIDRÓLISE EXTRACELULAR DE ATP E ADP PELA
ENZIMA NTPDase1 EM LINFÓCITOS DE PACIENTES
COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA-B**

Elaborada por Rafael Fernandes Zanin
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Dra. Dominguita Lühers Graça

Dr. Félix Antunes Soares

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2006.

Esta dissertação é dedicada ao meu pai
Izidoro, meu eterno incentivador.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que acreditaram e apoiaram este trabalho.

A minha mãe Maria Goreti e ao meu irmão Francisco pelo amor, carinho, paciência e estímulo à minha vida pessoal e profissional.

De maneira muito especial agradeço minha namorada Tatiane pelo seu amor, carinho e por se empenhar sempre em querer o meu melhor. Agradecimentos estendidos aos seus pais.

A minha orientadora Maria Rosa Chitolina Schetinger, juntamente com a Vera Maria Morsch pelos conhecimentos, amizade, dedicação, apoio e oportunidade de ampliar os meus conhecimentos que permitiram vencer mais esta etapa no meu crescimento profissional.

Agradeço de forma especial, a amizade, responsabilidade e partilha dos amigos: Maria do Carmo, André Morsch, Rosélia, Gilberto, Cinthia, Paula.

A Liliane Zimmerman, ao Dr. Juarez Chiesa, a Iria Farias e a Rita Bauschspiess, pois esta conquista também é um pouquinho de cada uma vocês.

Agradeço a todos os professores e colegas da pós graduação pelo auxílio, amizade e apoio.

Um agradecimento especial a todos os senhores e senhoras com leucemia linfocítica crônica que tão prontamente participaram da minha pesquisa. Agradeço a Deus por ter convivido com pessoas tão especiais.

ÍNDICE:

Agradecimentos	v
Índice	vi
Lista de abreviaturas	viii
Lista de figuras e tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xii
I. Introdução	1
II. Objetivo	6
III. Revisão Bibliográfica	8
III.1. Linfócitos	9
III.1.A. Origem e diferenciação	9
III.1.B. Função	10
III.2. Nucleotídeos	11
III.3. NTPDase1	12
III.4. Receptores Purinérgicos	15
III.5. Leucemia linfocítica crônica	16
III.5.A. Estadiamento	17
III.5.B. Prognóstico e Tratamento	18
III.5.C. Etiopatologia	18
IV. Artigo	20
IV. Abstract	22
IV.1. Introducion	23
IV.2. Materials and Methods	25

IV.2.1. Materiais	25
IV.2.2. Patients	25
IV.2.3. Isolation of the cells	26
IV.2.4. Viability	26
IV.2.5. NTPDase determination	27
IV.2.6. Protein determination	27
IV.2.7. Flow cytometry	27
IV.2.8. Statistical analysis	28
3. Result	28
3.1. Sample and viability	28
3.2 Influence of B-CLL stage (by Binet) on lymphocyte ATP and ADP hydrolysis	29
3.3. Correlation between NTPDase1 activity and white blood cell count	30
4. Discussion	30
6. References	33
V. Discussão	43
VI - Conclusão	47
VII - Referências Bibliográficas	49
VIII – Anexos	59

LISTA DE ABREVIATURAS:

ACR - Região Conservada da Apirase

ADP - Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

APCs – Células apresentadoras de antígeno

Ca²⁺ - íon cálcio

CTL – Linfócito T citotóxico

IL -2 – Interleucina-2

IL – 4 - Interleucina-4

IL – 5 - Interleucina-5

IL – 6- Interleucina-6

IL – 10 - Interleucina-10

INF - γ Interferon - γ

LDH – Lactato desidrogenase

LLC-B – Leucemia linfocítica crônica-B

MO – Medula óssea

NMP – Nucleosídeo monofosfato

NDP – Nucleosídeo difosfato

NTP – Nucleosídeo trifosfato

Pi - fosfato inorgânico

RNA - Ácido ribonucléico

Th1 – Linfócito CD4+ T helper 1

Th2 - Linfócito CD4+ T helper 2

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:

Figura III.3.2. Ecto-ATPases	13
Tabela 1.III.5.A. Sistema de estadiamento clínico	17
Tabela 1.IV.1. Characteristics of the patients with B-CLL	37
Tabela 2.IV.3.1 Percentage of viable lymphocytes	38
Figure -IV.1a. - ATP hydrolysis in different B-CLL stages	39
Figure -IV.1b. - ADP hydrolysis in different B-CLL stages	40
Figure- IV.2a. Correlation between ATP hydrolysis and white blood cell count of the patients with B-CLL	41
Figure- IV.2a. Correlation between ADP hydrolysis and white blood cell count of the patients with B-CLL	42

Título: Hidrólise extracelular de ATP e ADP pela enzima NTPDase1 em linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica-B

Aluno: Rafael Fernandes Zanin

Orientador: Maria Rosa Chitolina Schetinger

RESUMO:

A atividade da enzima NTPDase1 (E.C.3.6.1.5, Apyrase, ecto-ATP-difosfoidrolase,CD39) que hidrolisa ATP e ADP, foi analisada em linfócitos periféricos de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC-B), doença que possui como característica principal o acúmulo de linfócitos B maduros. A amostra foi composta por 23 pacientes com LLC-B, diagnosticados de acordo com critérios clínicos, laboratoriais e resultados de imunofenotipagem. Os pacientes foram divididos, conforme o sistema de classificação de Binet, em 4 grupos: estágio A (inicial), estágio B (intermediário), estágio C (avançado) e um grupo controle.

Os resultados demonstraram que a hidrólise do ATP foi significativamente aumentada ($F(29,3)=26.79$ $p<0.001$) em todos os estágios da doença e em relação ao controle e esse aumento é compatível com o avanço da doença mostrando a maior hidrólise no estágio C. A hidrólise do ADP acompanhou os resultados do ATP e também estava aumentada ($F(29,3)= 23.76$ $p<0.001$). Além disso, verificou-se uma forte correlação entre a atividade da enzima NTPDase1 e a contagem absoluta de glóbulos brancos do sangue periférico.

A alteração na atividade da enzima NTPDase1 em linfócitos de pacientes com LLC-B em seus diferentes estágios, vem confirmar o importante papel das ecto-nucleotidasas na regulação dos níveis de ATP e ADP, os quais atuam como moléculas sinalizadores em várias células sangüíneas como os

linfócitos. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar as funções desse sistema enzimático no controle de nucleotídeos e o seu papel na LLC-B.

PALAVRAS CHAVES: ATP; ADP; NTPDase1; Linfócitos; LLC-B.

Title: Extracellular ATP and ADP hydrolyzed by the NTPDase1 enzyme in lymphocytes from B-chronic lymphocytic leukemia patients

Student: Rafael Fernandes Zanin

Adviser: Maria Rosa Chitolina Schetinger

ABSTRACT:

The NTPDase1 enzymatic activity (E.C.3.6.1.5, Apyrase, ecto-ATP-diphosphohydrolase, CD39) which hydrolyses ATP and ADP, was analyzed in peripheral lymphocytes from patients with B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) which the main characteristic is the accumulation of monoclonal mature B-lymphocyte. The sample was composed by 23 patients with B-CLL whose were diagnosed according to the clinical and laboratorial criteria and also by the immunophenotypic characteristics. The patients were divided, according to the Binet staging system, in 4 groups: stage A (early), stage B (intermediate), stage C (advanced) and control group. The results demonstrated a significant increase in ATP hydrolysis ($F(29,3)=26.79$ $p<0.001$) for all the stages of the disease and related to the control as a function of length of disease advance with higher activity in stage C. ADP hydrolysis ($F(29,3)=23.76$ $p<0.001$) was also enhanced according to ATP results. Besides this it was found a great correlation between the activity of NTPDase-1 and the total absolute white cells count in peripheral blood. The alteration in NTPDase-1 activity in lymphocytes from patients with B-CLL at the different stages, contributes to confirm the ectonucleotidases role in regulate the ATP and ADP levels, which actuates like signalling molecules in many blood cells like the lymphocytes. Therefore more

studies need to be done so that we can elucidate such enzymatic system in the nucleotides and its role in the B-CLL.

Keywords: ATP; ADP; NTPDase1;lymphocytes ; LLC-B.

I . INTRODUÇÃO

O linfócito é uma das principais células envolvidas na defesa do organismo, mediando a resposta imune, juntamente com macrófagos e neutrófilos (Lorenzi, 2003). São originários de células indiferenciadas da medula óssea, passando por poucas fases intermediárias até a célula madura. As células maduras são encontradas no sangue circulante em porcentagens que variam em condições fisiológicas como idade e sexo. Em situações patológicas este número também pode sofrer alterações como em estímulos antigênicos, proliferações benignas e malignas (Lorenzi, 2003).

Entre os linfócitos podemos destacar dois grupos principais: linfócitos B ou células B, que quando ativados diferenciam-se em plasmócitos secretoras de anticorpos, e linfócitos T ou células T dos quais há duas classes principais. Uma classe se diferencia, quando ativada, em células T citotóxicas, as quais eliminam as células infectadas, ao passo que a segunda classe de células TL auxiliares, se diferencia em células que ativam outras linhagens celulares, como linfócitos B e os macrófagos (Janeway, 2002).

O papel de nucleotídeos como sinalizadores de moléculas extracelulares está bem estabelecido na literatura (Ikehara et al., 1981; Rapaport, 1990). Em linfócitos, a ação do AMP é pouco definida, mas a adenosina acumulada em excesso no meio extracelular pode contribuir para a imunodeficiência, pois exerce um efeito tóxico no desenvolvimento dessas células. (Luthje, 1989; Restta et al., 1997). O ADP está principalmente relacionado com a agregação plaquetária e tromboregulação (Zimmermann, 1999), porém suas ações ainda permanecem desconhecidas em linfócitos (Dombrowski et al., 1998).

O ATP tem um papel essencial nas funções desempenhadas por linfócitos sendo necessário para a secreção de importantes citocinas das células T como interferon- γ (INF- γ) e interleucina-2 (IL-2), que estão envolvidas na indução de resposta imune a antígenos estranhos, inclusive de células tumorais (Langston et al., 2003).

Os nucleotídeos extracelulares como ATP e ADP não atravessam a membrana celular, mas podem realizar suas ações biológicas através de receptores específicos na superfície celular denominados receptores purinérgicos (P2). Os receptores P2 estão divididos em duas subfamílias: acoplados à proteína G (P2Y) e ligados a canais iônicos (P2X). Mais recentemente receptores purinérgicos têm se tornado um foco de estudo em imunologia e hematologia devido ao seu alto nível de expressão em células sanguíneas e ao vasto potencial de aplicações terapêuticas que permitem a sua modulação (Di Virgílio et al., 2001).

Desde o início da década de 90 até os dias de hoje, há um crescente aumento nos estudos sobre as ações de nucleotídeos na proliferação e morte celular (Burnstock, 2002). O ATP em elevadas concentrações pode atuar como uma potente molécula citotóxica capaz de levar a célula à morte pela formação de grandes poros na membrana plasmática, através de sua ligação com receptores citotóxicos conhecidos atualmente como P2X₇ (Adnolfi et al., 2005). Filippini e colaboradores (1990) reportaram que altas atividades da ecto-ATPase em linfócitos T citotóxicos (CTL) têm um efeito citoprotetor contra a lise celular causada pelo ATP extracelular.

Com base nas ações desempenhadas por nucleotídeos, como ATP, em linfócitos, o estudo de mecanismos que interfiram ou que regulem os níveis destas moléculas extracelulares é importante. A degradação extracelular de nucleotídeos em linfócitos B e T intactos e em linhagens de células linfoblastóides foi descrita há mais de 15 anos, evidenciando, nestas células, a presença de atividade de ATPase, ADPase e AMPase (Barankiewicz et al., 1988). A atividade da enzima NTPDase1, em linfócitos, foi caracterizada em nosso laboratório por Leal et al. (2005). A NTPDase1 (EC 3.6.1.5, ecto-apirase, ecto-ATPDase, CD39) é uma proteína transmembrana que se liga a nucleotídeos extracelulares catalisando a hidrólise de ATP e ADP e, tendo como produto final a adenosina monofosfato (AMP) no espaço extracelular (Zimmerman, 1999;2001). É uma enzima largamente distribuída entre as células sangüíneas como plaquetas, leucócitos e células endoteliais. Esta enzima ainda possui um envolvimento em vários eventos celulares como, por exemplo, na neurotransmissão, na agregação plaquetária e em processos inflamatórios e imunes (Zimmerman, 2001).

Como descrito acima, os nucleotídeos extracelulares exercem tanto funções imunes quanto não imunes nos linfócitos (Dombrowski et al., 1998). A leucemia linfocítica crônica-B (LLC-B) é uma doença maligna caracterizada por um acúmulo de pequenos linfócitos B maduros no sangue periférico, medula óssea (MO) e linfonodos. Além disso, resulta em importantes alterações imunológicas como o aumento da atividade supressora causada pela inversão na relação CD4+/CD8+ (Scrivener et al., 2003).

O prognóstico da LLC-B assim como as diferentes opções de tratamento são variáveis, dependendo do risco individual. O prognóstico é usualmente feito utilizando-se dois sistemas clínicos de classificação propostos por Binet et al. (1981) e Rai et al (1975). Para este estudo iremos adotar o sistema de classificação de Binet, o qual considera três estágios: inicial (Binet A), intermediário (Binet B) e avançado (Binet C).

Portanto, é de interesse avaliar a atividade da enzima NTPDase1 em linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica-B em seus diferentes estágios para verificar as possíveis alterações na hidrólise extracelular de ATP e ADP assim inferindo uma possível relação da enzima com a doença.

II . OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

1. Verificar a integridade dos linfócitos para confirmar o aspecto extracelular da degradação de nucleotídeos;
2. Verificar a atividade da enzima NTPDase1, que degrada os nucleotídeos ATP e ADP, em linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica-B;
3. Verificar a influência do estágio da doença, sobre a atividade da enzima NTPDase1 em linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica-B;
4. Verificar a correlação entre a atividade da enzima e a contagem de glóbulos brancos.

III . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. Linfócitos

O termo linfócito foi utilizado pela primeira vez por Paul Ehrlich, em 1890, para identificar células do sangue que apresentavam morfologia igual à existente na linfa. Estas células têm como função principal defender o organismo contra a ação de agentes prejudiciais (Lorenzi, 2003)

III.1.A. Origem e diferenciação

Todos os linfócitos derivam de precursores hematopoiéticos multipotentes (stem cells) da medula óssea passando pelas fases de linfoblastos, prólinfócito e linfócito. Do ponto de vista fisiológico os linfócitos podem se diferenciar em 3 subpopulações: linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK.

As células T, assim como os demais linfócitos originam-se da medula, porém sua fase final de maturação ocorre no timo, daí a origem do T na nomenclatura. Eles ainda são subdivididos em: linfócitos CD8 ou citotóxico e CD4 ou auxiliares. Este último por sua vez subdividido em: T auxiliar 1 (Th1 ou T helper 1) e T auxiliar 2 (Th2 ou T helper 2), por secretarem diferentes citocinas em resposta à estimulação (Zago, 2004).

Os linfócitos B dos mamíferos sofrem seu processo de maturação na própria medula. A sua principal característica é possuir moléculas de imunoglobulinas inseridas na sua membrana plasmática que funcionam como receptores de antígenos específicos (Levinson, 1998).

Por fim, os linfócitos NK que são minoria e possuem um processo de diferenciação pouco conhecido se distinguem dos demais linfócitos por destruírem células-alvo (antígenos estranhos ao nosso organismo, principalmente células tumorais) sem prévia ativação (Janeway, 2002).

III.1.B. Função

Linfócitos T

As células T desempenham várias funções imunes que podem ser divididas em duas categorias chamadas de reguladora e de efetora. As funções reguladoras são realizadas por células T auxiliares (CD4+) as quais produzem importante linfocinas. O CD4+ Th1 é responsável pela produção de IL-2, que atua na ativação de CD4+, CD8+ e INF- γ o qual ativa macrófagos. O CD4+ Th2 é responsável pela produção de IL-4 e IL-5, as quais induzem nas células B a produção de anticorpos (imunoglobulinas), além de IL-6 e IL-10. As funções efetoras são desempenhas CD8+ ativadas que eliminam as células infectadas por vírus, células tumorais e enxertos (Zago, 2004; Lorenzi, 2003; Langston et al., 2003).

Linfócitos B

As células B desempenham duas funções importantes: a primeira é que quando ativadas por linfócitos T auxiliares diferenciam-se em plasmócitos secretores de anticorpos; a segunda é que atuam também como células apresentadoras de antígenos (APCs) a exemplo de macrófagos, células dendríticas do baço e células de Langerhans da pele, que são responsáveis pela

apresentação de antígenos aos linfócitos T auxiliares (Zago, 2004; Lorenzi, 2003; Levinson, 1998).

III.2. Nucleotídeos

Os nucleotídeos extracelulares tais como o ATP, o ADP, o UTP e também a diadenosina polifosfato atuam como moléculas sinalizadoras (Zimmermann, 2001). Estas moléculas estão presentes nos fluidos extracelulares em baixas quantidades micromolares devido a vários mecanismos como: lise celular, permeabilidade seletiva da membrana plasmática e exocitose de vesículas secretoras como os corpos densos plaquetários (Enjyoji et al., 1999). Os níveis de ATP também podem ser aumentados, sob condições agudas, pela secreção de linfócitos T citotóxicos ativados (Filippini et al., 1990).

A concentração de nucleotídeos depende da quantidade liberada, do efeito da diluição no espaço extracelular e da ação catalítica de enzimas como as ectonucleotidases (Malmsjo et al., 2000). É bem documentado que concentrações micromolares de ADP são suficientes para induzir a agregação plaquetária e recrutar novas plaquetas (Pilla et al., 1996), mas não se conhece seus efeitos sobre linfócitos (Luthje; 1989).

O ATP possui funções divergentes, *in vitro* estimula a síntese de DNA em células da medula óssea e timócitos, mas inibe a síntese de DNA em células esplênicas, linfócitos e células mononucleares periféricas (Ikehara et al., 1981).

Em células T também foi demonstrada a importância do ATP na secreção de INT- γ e IL-2, que são destacados mediadores na ativação da resposta imune (Langston et al., 2003). Além disso, concentrações elevadas de ATP extracelular podem induzir morte celular dependendo do tempo de incubação, da dose de ATP e também do tipo de célula (Adinolfi et al., 2005). O principal alvo desta ação citotóxica do ATP é o receptor P2X₇ (Surprenant et al., 1996).

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

A NTPDase1 (ATP difosfohidrolase, EC. 3.6.1.5, apirase, CD39) é uma ectonucleotidase pertencente à família das ecto-nucleosídeo 5'trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases). E-NTPDases é o termo genérico usado para designar uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de nucleotídeos di e trifosfatos, com variável preferência pelos tipos individuais de nucleotídeos, até adenosina monofosfato (Zimmerman, 2001) conforme o esquema abaixo:



Este NMP é convertido até seu respectivo nucleosídeo pela ação da enzima ecto-5'-nucleotidase (EC. 3.1.3.3.5, CD 73) (Sarkis et al., 1995; Pilla et al., 1996; Zimmermann, 2000; 2001). Estas enzimas localizadas na superfície extracelular catalisam a hidrólise de nucleotídeos e assim limitam sua atividade espaço-

temporal tendo como produto final de hidrólise os nucleosídeos e o fosfato inorgânico (Zimmermann, 2000).

A família das E-NTPDase é atualmente composta por 8 membros. Todos os membros desta família apresentam em sua estrutura no mínimo cinco domínios chamados regiões conservadas de apirase (ACR), que estão diretamente envolvidos na atividade catalítica da enzima e/ou na integridade estrutural das E-NTPDases. A NTPDase7 e a NTPDase8 foram recentemente clonadas e caracterizadas em mamíferos, porém até o momento não se conhece a topografia de membrana. Os demais 6 membros da família das E-NTPDases que apresentam estrutura topográfica de membrana podem ser separadas em 2 grupos de acordo com a figura 1 (Zimmermann,2001).

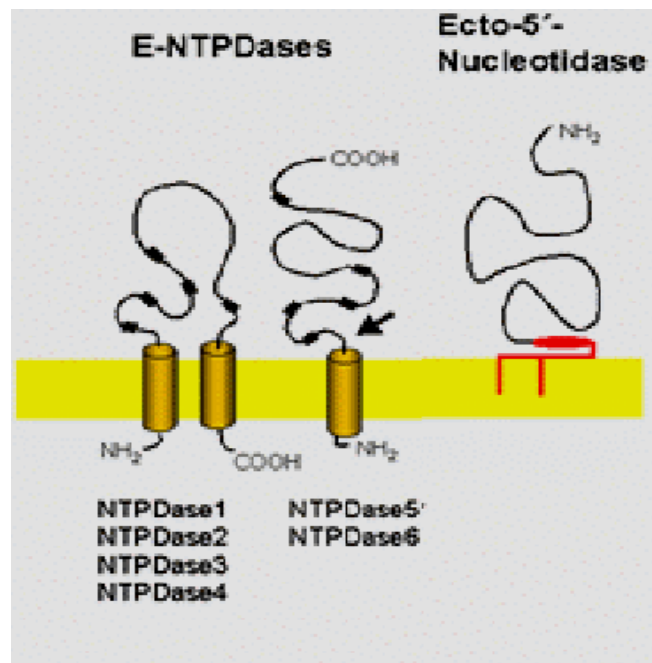


Figura 1. Ecto-ATPases. Adaptado de Zimmermann (2001).

O primeiro grupo inclui NTPDase1 a 4 que se caracterizam por apresentar domínios amino-terminal e carboxi-terminal hidrofóbicos, enquanto o segundo grupo que inclui NTPDase5 e 6, distingue-se do primeiro grupo por não apresentar um domínio hidrofóbico carboxi-terminal. Este conjunto de enzimas difere também em relação a suas preferências por nucleotídeos di e trifosfatos.

A NTPDase1, que degrada ATP e ADP em uma razão quase igual (1:1), é uma enzima bastante descrita na literatura e amplamente estudada nos últimos anos. Esta enzima foi descrita em vegetais (Valenzuela et al., 1989; Anich et al., 1990), invertebrados (Sarkis et al., 1986, Vasconcelos et al., 1993), em vários tecidos de mamíferos tais como cordão umbilical humano (Yagi et al., 1992), córtex cerebral (Battastini et al., 1991; Schetinger et al., 2001), útero e glândula mamária (Valenzuela et al., 1989) bem como em plaquetas de ratos (Frasseto et al., 1995), plaquetas humanas (Pilla et al., 1996; Lunkes et al., 2003) e linfócitos humanos (Plesner, 1995; Leal et al., 2005).

Na última década, o envolvimento dessa enzima tem sido relatado em vários eventos celulares (Zimmerman, 2001). Dependendo do tecido a sua atividade tem diferentes funções fisiológicas tais como a neurotransmissão (Edwards et al., 1992), o controle da agregação plaquetária e a regulação da vasculatura (Soslay et al., 1997; Robson et al., 1999; Birk et al., 2002) e ainda desempenha importante função na sinalização purinérgica e na tromboregulação (Zimmermann, 1999; Kittel et al., 2002; Pinsky et al., 2002). Sugere-se também que tenha uma participação na transdução de sinal através da adesão célula-célula (Yagi et al., 1992; Sarkis et al., 1995) além de

importantes funções imunes e inflamatórias (Dombrowski et al., 1995; Zimmermann, 2001; Langston et al., 2003).

III.4.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, chamados de P2Y e os ligados a canais iônicos, designados P2X. Em mamíferos já foram identificados cinco P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁) e sete P2X (P2X₁₋₇) que foram clonados e caracterizados farmacologicamente (Ralevic et al., 1998).

A ligação de agonista ao purinoreceptor P2Y induz ativação de fosfolipase C e/ou estimulação/inibição de 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 Ca⁺⁺ (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 a 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 reportados como promotores

da proliferação celular (Adinolfi et al, 2005).

III.5. Leucemia linfocítica crônica-B

A leucemia linfocítica crônica-B é uma neoplasia que se caracteriza pelo acúmulo de linfócitos monoclonais do tipo B com uma linfocitose absoluta geralmente de 40.000 a 150.000 células/mm³ (Lorenzi, 2003). Em estágios mais avançados a leucocitose pode ser mais severa atingindo números que podem chegar a 1.000.000 células/mm³. As células acumulam-se principalmente na medula óssea (MO), linfonodos e sangue periférico. A maioria dessas células leucemicas está na fase G₀ do ciclo celular. Além disso, estas células possuem uma sobrevivência aumentada, especialmente os linfócitos circulantes, em virtude de defeitos no mecanismo de apoptose (Kukhaei et al., 2005).

A função de linfócitos T está anormal na LLC-B, o que contribui para a deficiência imune da doença (Kukhaei et al., 2005). O número de células T está aumentado no sangue, na medula e nos linfonodos e os subtipos encontram-se redistribuídos, com o CD4 predominante na MO e nos linfonodos, enquanto o CD8+ está aumentado no sangue periférico. Os defeitos das células T pioram com a progressão da doença (Scrivener et al., 2003).

Além de uma alta leucometria, que geralmente progride com a evolução da doença, a LLC-B pode apresentar outros achados laboratoriais relevantes como: anemia, plaquetopenia, MO infiltrada com mais de 30% de

linfócitos maduros, fenômenos auto-imunes (anemia e trombocitopenia), hipogamaglobulinemia e LDH elevada.

III.5.A. Estadiamento

Os sistemas de estadiamento baseiam-se nas características clínicas e hematológicas e levam em conta a história natural que é resultante do acúmulo progressivo de células leucêmicas. Estes sistemas definem subgrupos de doentes e são fundamentais para a avaliação do prognóstico assim como as decisões terapêuticas. Os dois sistemas mais empregados e validados são os sistemas propostos por Rai et al. (1975) e Binet et al. (1981), os quais definem fase inicial (Binet A, Rai 0), intermediária (Binet B, Rai I/II) e avançada (Binet C, Rai III/IV). Estes estadiamentos levam em conta, basicamente, o envolvimento de áreas linfóides afetadas, presença de anemia e trombocitopenia (tabela 1).

Tabela 1. Sistema de estadiamento clínico adaptada de Kokhaei et al., 2005.

Classificação de Binet		Classificação de Rai		
Estágio	Definição	Risco do grupo	Estágio	Definição
A	< 3 áreas linfóides ^a	Baixo	0	somente linfocitose
B	> 3 áreas linfóides	Intermediário	I	linfadenopatia
			II	Hepato ou esplenomegalia ± linfadenopatia
C	Hemoglobina <10g/dl Plaquetas <100×10 ³ /dl ^b	alto	III	Hemoglobina <11g/dl ^b
			IV	Plaquetas <100×10 ³ /dl ^b

^a Áreas linfóides são consideradas as seguintes: linfonodo unilateral ou bilateral cervical, axilar e inguinal, baço e fígado.

^b com exclusão de hemólise e causas não relacionadas de anemia ou trombocitopenia.

III.5.B. Prognóstico e Tratamento

A sobrevida média, o prognóstico e o tratamento de cada paciente são variáveis. Alguns permanecem assintomáticos (Binet A, Rai 0), com boa qualidade de vida e sem indicação de tratamento, entretanto períodos regulares de observação são necessários para definir a necessidade de intervenção. A sobrevida para pacientes nos estágios iniciais da doença é de aproximadamente 10 ou mais anos. Para pacientes em estágios intermediários (Binet B, Rai I e II) existem 2 tipos de evolução. No primeiro, a doença é estável e os pacientes devem seguir sem tratamento. No segundo, a doença mostra progressão nos primeiros 1 ou 2 anos após o diagnóstico (aumento do baço e linfonodos, rápido aumento no número de linfócitos), sendo sua sobrevida estimada em 7 anos. Os pacientes com estágio C de Binet, III e IV de Rai devem ser tratados e a sobrevida é estimada em até 2 anos. Até o momento não existe tratamento curativo para a LLC-B, mas a terapia ideal recomendada (é ainda controversa entre os autores) inclui a fludarabina e o clorambucil como terapia inicial (Zwiebel et al., 1998; Kukhaei et al., 2005).

III.5.C. Epidemiologia

A maioria dos pacientes possui em média 65 anos, sendo que homens são mais acometidos por esta doença. Nos países ocidentais, a LLC-B representa 30% de todas as leucemias. No Brasil não existem dados, mas se

estima que a incidência seja de um a cinco casos por 100.000 habitantes (Zago, 2004).

A etiologia da LLC é desconhecida. A existência de casos familiares sugere uma predisposição genética pelo menos em alguns pacientes. A idade média ao diagnóstico nos casos familiares é de 10 anos antes do que a observada nos esporádicos (Byrd et al., 2005). Fatores ambientais representados pela exposição a agentes químicos e derivados do petróleo estão associados ao aumento do risco para a doença (Lorenzi, 2003).

IV. MANUSCRITO

**Extracellular ATP and ADP hydrolyzed by the NTPDase1 enzyme in
lymphocytes from B-chronic lymphocytic leukemia patients**

Rafael Fernandes Zanin¹, Paula Acosta Maldonado¹, Maria do Carmo Araújo²,
André L. B. Morsch¹, Liliame Zimmermann², Vera Maria Morsch¹, Maria Rosa
Chitolina Schetinger^{1*}

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

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

*Corresponding author:

Dr. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Departamento de Química

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria RS Brasil - 97105-900

E-mail: mariarosa@smail.ufsm.br

Abstract

The activity of the NTPDase enzyme (EC 3.6.1.5, apyrase, CD39), that hydrolyzes ATP and ADP to AMP, was analyzed in peripheral lymphocytes from B-Chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patients. The group studied was composed of 23 B-chronic lymphocytic leukemia patients. The patients were divided into 3 groups, according to the Binet staging system, which consisted of Stage A (early;n=10), Stage B (intermediate;n=5), stage C (advanced;n=8) and a control group (n=10). The results demonstrated a significant increase in ATP hydrolysis ($F(29,3)=26.79$ $p<0.001$) for all the stages, with higher activity in stage C comparable with stages A (early), B (intermediate) and the control. ADP hydrolysis ($F(29,3)=23.76$ $p<0.001$) agreed with ATP results. Such results suggest that the enhanced activity of NTPDase1 in peripheral lymphocytes of patients with advanced stages of B-CLL may have an influence on cell death because of the hydrolysis of cytotoxic extracellular ATP.

Key words: NTPDase1, B-Chronic Lymphocytic Leukemia, Lymphocytes, ATP, ADP.

1- Introduction

NTPDase1 (EC 3.6.1.5, CD39, ecto-Apyrase, ATP diphosphohydrolase) is an enzyme that belongs to the E-NTPDase family, and its activity is responsible for the hydrolysis of ATP and ADP to adenosine monophosphate (AMP) that can serve as a substrate for an ecto-5'nucleotidase (E.C. 3.1.3.5) with release of adenosine [1]. The NTPDase1 is an enzyme broadly distributed throughout blood cells, such as platelets [2,3], lymphocyte [4], endothelial cells and leukocytes [3].

NTPDase1 activity was newly characterized in peripheral lymphocytes by Leal et al. (2005), and its presence has been confirmed by flow cytometry [4]. The physiologic functions of NTPDase1 have been studied and have shown its involvement in several important cellular events, such as platelet aggregation, neurotransmission and inflammatory and immune response [1].

The role of the nucleotides as extracellular signaling molecules in blood cells has been well established [5]. ADP is associated mainly with platelet aggregation and also with the thromboregulation process [6], but its action in lymphocytes is still unknown [7]. ATP is more engaged with immune functions such as the secretion of IL2 and IFN- γ [8]. Nucleotides, which exert their function through the purinoreceptors, undergo inactivation by ecto-enzymes, such as NTPDase1, that act to control the levels of these substances in the extracellular medium [9,1].

More recently, there has been a growing interest in the long-term trophic actions of nucleotides and their effect on proliferation and cell death [5]. The cytotoxic effects of ATP were evidenced by Steinberg and Silverstein [10] in

macrophage cells lines where it was reported that such effects were caused by cytotoxic receptors and not by ATP perturbation on plasma membrane integrity. The main target of the cytotoxic action of ATP is the receptor P2X₇ [11,12,13], that is a member of the purinoreceptor family (P2), which is designated either as a P2Y receptor when coupled to G-proteins, or P2X when it is bound to gated-ion channels [12]. This receptor exhibits a dual behavior: a massive quantity of ATP leads to cell death, whereas a low quantity of ATP supports proliferation [13]. Filippini and collaborators 1990 [14] demonstrated that in cytolytic T-lymphocytes, high ecto-ATPase activity on the surface would protect from the lytic effects of extracellular ATP.

In relation to B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), the cells in greater circulation present a high resistance to cell death and a low index of proliferation [15,16,17]. This malignant pathology is characterized by the accumulation of monoclonal, mature B-lymphocytes in peripheral blood, bone marrow and lymphoid tissues. It is a pathology that almost exclusively occurs in older people, with an average of around 65 years. The survival rate is variable, and some patients live for about a decade or more while others die soon after the diagnosis. The variability in the prognosis, as well as the selection of different treatment options, depends on the individual risk [16].

The most common methods used to determine the prognosis in this pathology are the two clinical staging systems proposed by Binet and Rai, which define early (Rai 0, Binet A), intermediate (Rai I/II, Binet B) and advanced (Rai III/IV, Binet C) stages. These classifications are based on the extent of

the lymphoid area involved, and the presence of anemia and thrombocytopenia [17].

Taking into account the growing discovery of nucleotide involvement in mediating immune and non-immune functions in lymphocytes [18,8], and the crucial role that NTPDase1 plays in controlling nucleotides in the extracellular environment, the proposal of this study is to verify the activity of NTPDase1 in peripheral lymphocytes of patients with B-chronic lymphocytic leukemia at its different stages, according to the Binet classification, as well as to investigate the influence of these findings on this pathology.

2- Materials and Methods

2.1. Materials

Nucleotides, sodium azide, Trypan blue, HEPES, and Trizma base were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ficoll Hypaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Antibodies for flow cytometry analysis FITC-labeled anti-CD19 and PE-labeled were purchased from Beckman Coulter (SP, Brazil). Polyclonal FITC-conjugated rabbit antihuman κ light chain and λ light chain were purchased from Dako Cytomation (Biogen, Brazil). All the other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Patients

The sample was composed of peripheral lymphocytes isolated from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and healthy volunteers of

the same age range and the same social conditions. Samples of the 23 patients with B-CLL were obtained from the Oncology Hematology Laboratory of the Federal University of Santa Maria Hospital. The typical B-CLL was diagnosed according to standard clinical parameters and laboratory criteria. The leukemic cells were phenotyped by cell surface markers using flow cytometry. The characteristics of the patients with B-CLL, their classification according to the Binet staging system and immunophenotype are described in table 1. The control group was carefully select by blood count consisting on 10 individuals (6 males and 4 females) who did not undergo any pharmacologic during the last month. All the subjects gave written informed consent to participate in the study. The Human Ethics Committee approved the protocol from the Federal University of Santa Maria.

2.3. Isolation of the cells

The peripheral lymphocytes were isolated using Ficoll-Hypaque density gradients as described by Böyum [19]. After separation, only samples with at least 95% of lymphocytes, as verified in the coulter STKS (Miami-USA), were used.

2.4. Viability

Soon after lymphocyte separation, the lymphocytes viability was checked by the trypan blue 0.1% exclusion test and also by measuring enzyme lactate dehydrogenase (LDH) activity, obtained after lysis with Triton X-100 [20]. Both

procedures were repeated after the incubation to confirm the extracellular hydrolysis.

2.5. NTPDase determination

After lymphocyte isolation, NTPDase activity was determined according to the methods described by Leal et al. [4]. Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.2mg/ml or 23.1 ± 2.4 cells/ μ l. Twenty microliters of intact cells (4 μ g protein) were added to a reaction medium containing 0.5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 6 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 μ l. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 2.0 mM and stopped with 5% trichloroacetic acid (TCA). All the samples were run in triplicate, and enzymes (intact lymphocytes) were added to the control after the addition of TCA in order to correct the non-enzymatic hydrolysis of the substrate. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the method of Chan et al. [21] and enzymatic activity was reported as nmol Pi released/ mg protein/ min.

2.6. Protein determination

Protein was determined by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard [22].

2.7 Flow cytometry analysis

Peripheral blood cells were incubated with anti-CD19 and anti-CD5 ($\pm 10^6$ /cells) for 15 min in the dark in room temperature, lysed with reagent

FACSLysing and incubated again for 10 min in the dark. Cells were washed twice in PBS buffer 7.4 containing 0.02% sodium azide. The cells were then resuspended in PBS buffer and immediately analyzed by FACScalibur flow cytometer using Cellquest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), without fixation. The procedure was repeated with antihuman κ and λ but, with only one difference the sample was pre-treated with RPMI 1640 plus 5% SFB (Serum Fetal Bovine) and incubated for at least 3 hours.

2.8 Statistical analysis

All the data are expressed as the mean \pm S.D. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple test. Correlation was evaluated with the Pearson test. Differences were considered significant when the probability was $P < 0.05$.

3- RESULTS

3.1- Sample and viability

The coexpression of CD19+ with CD5+ is a useful marker for the detection of minimal disease besides cells B-CLL carry only a single light-chain type either κ or λ as a monoclonal characteristic. Both associations were observed in the patients, according to table 1.

The percentage of disrupted lymphocytes was less than 5% after separation, and between 5-7% after incubation table 2. These results indicate that the cell preparation and cells during the assay were predominantly intact.

3.2 – Influence of B-CLL stage (by Binet) on lymphocytes ATP and ADP hydrolysis

ATP hydrolysis was enhanced in proportion to the stages of the B-CLL classification by Binet ($F(29,3)=26.79$ $p<0.001$), and post-hoc comparisons by Duncan's multiple range test revealed that ATP hydrolysis was significantly increased at all the stages and that higher activity was present in stage C (advanced) in comparison with stage A (early), stage B (intermediate) and with the control subjects (Fig 1a).

ADP hydrolysis was also altered in relation to the stages of the B-CLL classified by Binet ($F(29,3)= 23.76$ $p<0.001$), and post-hoc comparisons by Duncan's multiple range test revealed that ADP hydrolysis was similar to the ATP hydrolysis.

3.3 Correlation between NTPDase1 activity and white blood cell count of the patients with B-CLL

A significant positive correlation was found between ATP hydrolysis (Fig 2a) and the white blood cell count ($r=0.802$, $P<0.01$). Similarly, significant positive correlation coefficients were found between the white blood cell count and ADP hydrolysis ($r=0.813$, $P<0.01$), Fig 2b.

4- DISCUSSION

This study evaluated NTPDase activity in patients with B-CLL, and the results clearly demonstrated a change in ATP and ADP hydrolysis. ATP and hydrolysis was significantly altered at all stages, with a gradual increase proportional to disease progression.

The P2X₇ receptor plays an important role in ATP apoptosis induction in human leukemic lymphocyte [23]. The binding of ATP to the P2X₇ induces the formation of pores in the plasma membrane of the cell, leading to the entrance of bivalent cations and large molecules, which generally cause cell death [24,12,13]. Human lymphocytes from patients with evolutive B-CLL, which is an advanced stage of the disease, have an increased P2X₇ expression, and this makes these cells more susceptible to the cytotoxic effects of ATP [25].

Goepfert et al. 2000 [26] demonstrated that, in endothelium cultures, the increase of NTPDase1 activity decreased the extent of apoptosis caused by purinergic receptors (P2X₇) in response to high concentrations of extracellular ATP, in vitro. In LCL cell lines, the association of CD39 and high ecto-ATPases activity contributed to the lack of activation mediated by P2X₇ receptor [27].

Our results demonstrated high NTPDase1 activity, especially in the advanced stage of the disease, where there is generally a great accumulation of B-leukemic lymphocytes in the peripheral blood [17], and this accumulation is mainly related to defective apoptosis in the cancer cells [28]. Furthermore, other complications are correlated with disease progression, such as the increase of serum lactate dehydrogenase levels [17] and an absolute CD8⁺ lymphocytosis [29]. CD8 cytotoxic lymphocytes are responsible for defense against foreign

antigens and can be repeatedly activated by B-CLL antigens. Thus, both the complication and activation of cytotoxic lymphocytes [7] and the increase of serum LDH levels must release a high ATP quantity to the extracellular medium. In this context, our results suggest that the B-CLL cells strongly hydrolyze the extracellular lytic ATP, which may cause an ATP level low enough to avoid the death of the cells by the activation of P2X₇, thus contributing to the resistance of B-leukemic cells.

The patients at the early stage of B-CLL usually have stable blood counts and do not experience a clinical progression of the disease. However, patients at the advanced stage present a clinical manifestation of the active disease. This is characterized by evident bone marrow failure, the development of anemia and/or thrombocytopenia, progressive splenomegaly, lymphadenopathy and a progressive increase of the lymphocyte count [30, 17]. In this context, our results found a strong correlation between NTPDase1 activity and the white blood cell count (Fig. 2a and 2b), which corroborates with our hypothesis that the high activity of the enzyme may contribute to the decrease of cell death in B-CLL cells and, consequently, to an accumulation of circulating lymphocytes.

Another interesting aspect is the involvement of ATP in the secretion of cytokines, such as IFN- γ and IL-2, by lymphocytes. These cytokines are important mediators of the immune response, as in the recognition of foreign antigens [8]. B-CLL is a pathology that produces a failure in the immune response [17, 29], therefore, the alteration in NTPDase activity in B-CLL may be involved in this process. Nevertheless, more studies are needed to elucidate this subject.

In conclusion, our study demonstrated that the hydrolysis of ATP and ADP is modified in lymphocytes from patients at different stages of B-CLL. The results show that the high NTPDase1 activity is does not by the outcome in the lymphocytes number but, by the presence of more enzymes in the surface of leukemic cells or still by its increased activity. Furthermore, investigation of the utilization of CD39 as a marker for the prognosis of B-CLL has shown a promising future may be still too premature to propose its application.

5-ACKNOWLEDGEMENT

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

6- REFERENCES

1. Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature, *Drug Dev Res* 2001;52: 44– 56.
2. Araújo MC, Rocha JBT, Morsch A, Zanin R, Bauchspiess R, Morsch VM, Schetinger MRC. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:421-426.
3. Koziak K, Sévigny J, Robson SC, Siegel JB, Kacsmarek E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost* 1999;82:1538-1544.
4. Leal DBR, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CAM, Silva JEP, Morsch VM, Schetinger MRC. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase;ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in humans lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1721:9-11.
5. Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22: 364-373.
6. Zimmermann H. Nucleotides and CD39: Principal modulatory players in haemostasis and thrombosis. *Nat Med* 1999;5:987-988.
7. Dombrowski KE, Ke Y, Brewer K, Kapp JA. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev* 1998;161:111-118.
8. Langston HP, Ke Y, Dombrowski KE, Gewirtz AT, Kapp JA. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 2003;170:2962-2970.

9. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362:299-309.
10. Steinberg TH, Silverstein SC. Extracellular ATP⁴ promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J Biol Chem* 1987;262:3118-3122.
11. Peng L, Bradley CJ, Wiley JS. P2Z purinoceptor, a special receptor for apoptosis induced by ATP in human leukemic lymphocytes. *Clin Med J* 1999;112:356-362.
12. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001;97:587-600.
13. Adinolfi E, Pizzirani C, Idzko M, Panther E, Norgauer J, Di Virgilio F and Ferrari D. P₂X₇ receptor: Death or life?. *Purinergic Signal* 2005;1:219-227.
14. Filippini A, Taffs RE, Agui T, Sitkovsky MV. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from cytolytic effects of extracellular ATP. *J Biol Chem* 1990;265:334-340.
15. Gale RP, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Keating M, Montserrat E, Rai K. Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1994;8:1610-1614.
16. Caligaris-Cappio F. Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2000;4:5-21.
17. Kokhaei P, Palma M, Mellstedt H & Choudhury A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* 2005;16:113-123.

18. Leal DBR, Streher CA, Bertoncheli CM, Carli LFD, Leal CAM, Silva JEP, Morsch VM, Schetinger MRC. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746:129-134.
19. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* .1968;97:77–89.
20. Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Deerfield Beach 1983.
21. Chan K, Delfert K, Junguer KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375-380.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:218-254.
23. Zhang XJ, Zheng GG, Ma XT, Yang YH, Li G, Rao Q, Nie K, Wu KF. Expression of P2X7 in human hematopoietic cells line and leukemia patients. *Leukemia Res* 2004;28:1313-1322.
24. Markwardt F, Lohn M, Bohm T, Klapperstuck M. Purinoceptor-operated cations channels in human B lymphocytes. *J Physiol* 1997;498:143-151.
25. Adinolfi E, Melchiorri L, Falzoni S, Chiozzi P, Morelli A, Tieghi A, Cuneo A, Castoldi G, Di Virgilio F and Baricordi O R. P₂X₇ receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:706-708.

26. Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, Robson SC. CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med* 2000;6:591-603.
27. Nie K, Zheng GG, Zhang XG, Lin YM, Wang L, Li G, Song YH, Wu KF. CD39-associated high ATPase activity contributes to the loss of P2X7-mediated calcium response in LCL cells. *Leukemia Res* 2005;29:1325-1333.
28. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999;17:399-408.
29. Scrivener S, Goddar RV, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44:383-389.
30. Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Gil J. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytes leukaemia cells. *Br J Haematol* 1998;100:142-146.

Table 1 - Characteristics of the patients with B-CLL

Patient	Age/Sex	Stage (Binet)	CD19 cells (%)	CD5 cells (%)	Light Chain κ/λ
01	67/M	A	92	ND	λ 86
02	46/M	A	93	97	λ 93
03	58/F	A	62	10	ND
04	73/M	A	71	91	κ 62
05	75/F	A	24	24	ND
06	72/M	A	91	97	λ 89
07	71/M	A	93	95	κ 85
08	76/F	A	ND	ND	ND
09	72/F	A	67	92	λ 63
10	60/M	A	84	82	ND
11	72/M	B	95	87	κ 92
12	75/M	B	93	98	λ 92
13	56/M	B	87	96	λ 75
14	62/M	B	87	90	κ 74
15	69/F	B	95	ND	ND
16	61/M	C	ND	ND	ND
17	76/F	C	93	54	κ 92
18	76/M	C	82	79	ND
19	56/M	C	ND	ND	ND
20	74/M	C	98	72	ND
21	68/F	C	87	96	κ 80
22	69/M	C	85	87	λ 76
23	62/M	C	96	99	κ 96

ND: not determined, κ: *kappa*, λ: *lambda*.

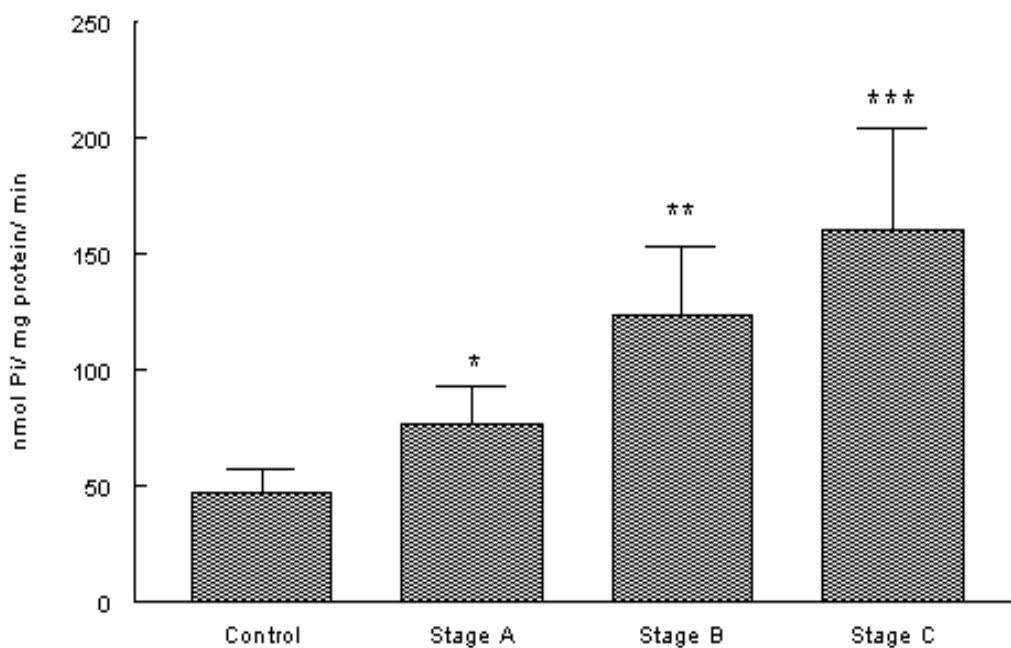
Table 2 – Percentage of viable lymphocytes.

	TRYPAN BLUE		LDH*	
	% after separation	% after incubation	% after separation	% after incubation
Control group	95.90±0.89	96.25±0.95	3.38±1.58	4.20±1.92
Stage A	97.50±2.11	95.02±2.04	3.00±2.00	4.75±2.25
Stage B	96.40±1.67	94.66±1.52	4.00±0.99	4.75±2.05
Stage C	96.87±1.35	94.57±1.51	3.58±1.39	3.75±1.70

*100% of (LDH) activity were obtained after lysis with Triton X-100 (1%).

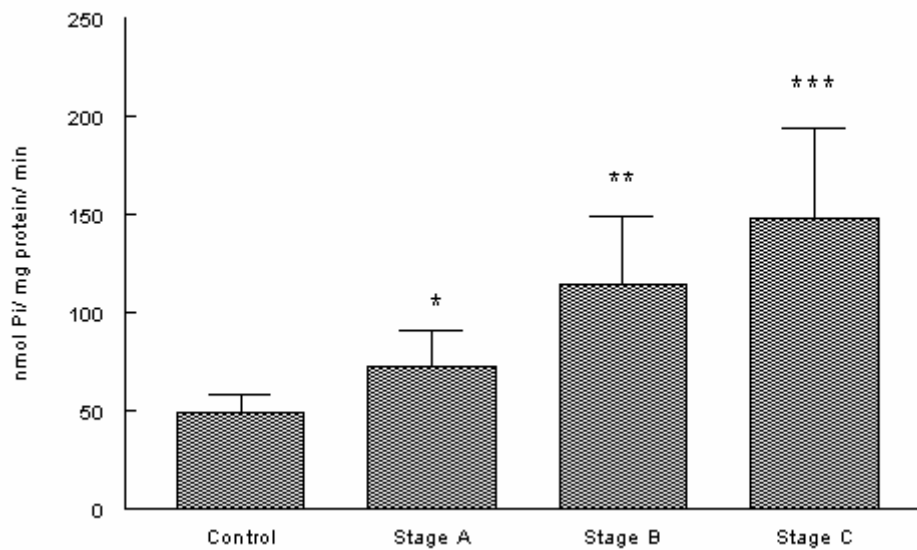
FIGURES:

1a.



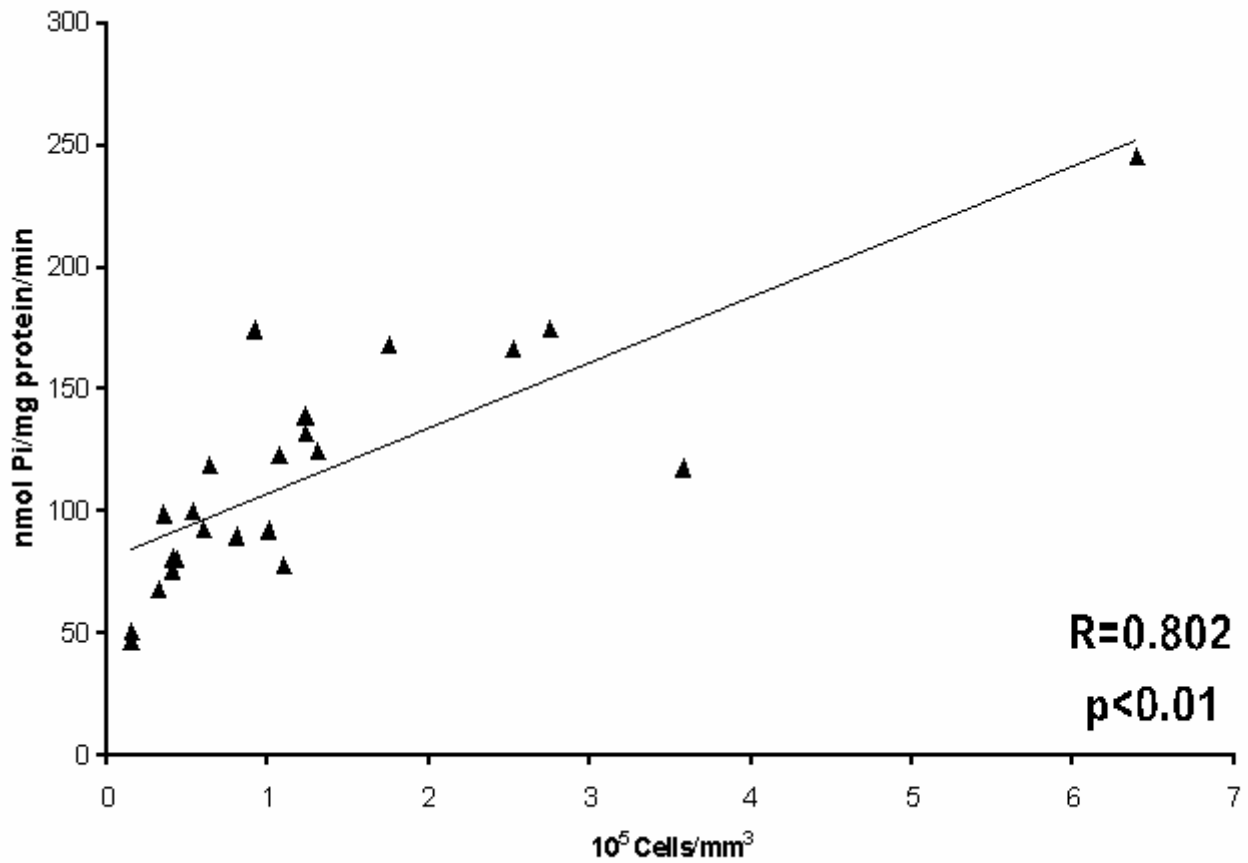
NTPDase1 activity on ATP hydrolysis in peripheral lymphocytes from B-CLL patients. The patients were divided in 3 groups according with Binet staging system in stage A (N=10), stage B (N=05), Stage C (N=8) and one control group (N=10). (*, **, ***) indicates a significant difference at $p < 0.05$ from columns.

1b.



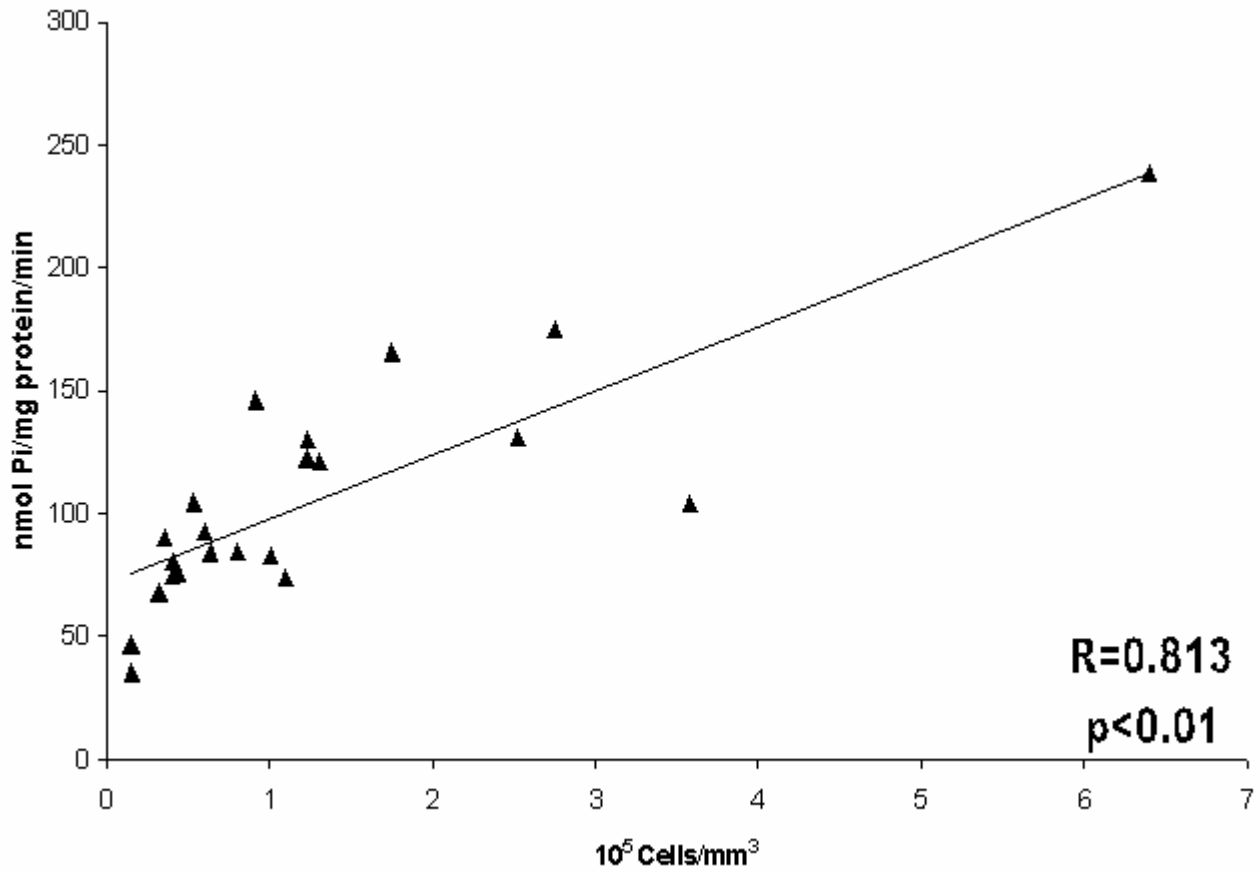
NTPDase1 activity on ADP hydrolysis in peripheral lymphocytes from B-CLL patients. The patients were divided in 3 groups according with Binet staging system in stage A (N=10), stage B (N=05), stage C (N=8) and one control group (N=10). (*, **, ***) indicates a significant difference at $p < 0.05$ from columns.

2a.



Pearson's correlation between ATP hydrolysis and white blood cell count of the patients with B-CLL.

2b.



Pearson's correlation between ADP hydrolysis and white blood cell count of the patients with B-CLL.

V . DISCUSSÃO

Os nucleotídeos ATP e ADP são componentes normais do meio extracelular que exercem uma variedade de efeitos fisiológicos sobre células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. O ATP e o ADP não ultrapassam a membrana celular sendo assim realizam suas ações biológicas através de proteínas transmembrana localizadas na superfície celular. Há uma variedade de proteínas sobre a superfície celular que são capazes de interagirem com ATP e outros nucleotídeos, entre eles podemos destacar os receptores purinérgicos (P2) e enzimas hidrolíticas que são referidas como ectonucleotidases.

No presente trabalho foi analisada a atividade da enzima NTPDase1 em linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica- B. Nossos resultados indicam que a hidrólise de ATP e ADP está alterada nos linfócitos destes pacientes.

As alterações observadas estão relacionadas com o estágio da doença. A hidrólise de ATP nos linfócitos de pacientes foi aumentando de maneira proporcional ao avanço da doença, com a maior hidrólise no estágio C em relação aos estágios A, B e grupo controle. A hidrólise de ADP foi similar à hidrólise de ATP.

As ações tóxicas do ATP são mediadas principalmente por receptores citotóxicos conhecidos receptores P2X7, que por sua vez quando ativados induzem, na célula, a formação de grandes poros permeáveis a uma infinidade de substâncias. As células tumorais da LLC-B apresentam uma expressão

aumentada deste receptor em pacientes que se encontram em estágios mais avançado da doença. O aumento da expressão de receptores P2X₇ torna esses linfócitos mais susceptíveis a ação citotóxica do ATP (Adnolfi et al., 2002). Goepfert et al. (2000) demonstraram que, em culturas de endotélio, o aumento da atividade da NTPDase diminui a morte celular causada por receptores purinérgicos (P2X₇) em resposta a altas concentrações de ATP extracelular.

Com o avanço da doença é normal que outras complicações ocorram tais como o aumento nos níveis de LDH e de linfócitos T citotóxicos (linfocitose de CD8) séricos (Caligaris et al., 1999). Os CD8⁺ podem ainda sofrer repetidas ativações por antígenos da LLC-B, já que esses linfócitos estão envolvidos no combate às células cancerosas. Então, ambos os processos podem liberar ATP para o meio extracelular e dessa forma contribuir para elevação dos seus níveis plasmáticos.

Nossos resultados demonstraram um forte aumento na atividade da enzima NTPDase1, principalmente em pacientes que apresentavam um quadro mais avançado de LLC-B. Neste contexto, podemos sugerir que o aumento na atividade da enzima pode levar a uma diminuição nos níveis de ATP o suficiente para evitar a morte celular pela ativação dos receptores P2X₇ e portanto, contribuindo para a resistência das células leucêmicas frente as ação líticas do ATP.

Pacientes em estágios iniciais apresentam uma contagem estável de linfócitos e sem manifestações clínicas de doença ativa. Pacientes com manifestações clínicas de doença ativa geralmente possuem um aumento proporcional na contagem de linfócitos (Byrd et al., 2004). Assim, nossos resultados encontraram uma forte correlação entre a atividade enzimática da NTPDase1 e o número de glóbulos brancos do sangue, o qual corrobora nossa hipótese de que a alta atividade da enzima pode contribuir para a diminuição na morte de células leucêmicas-B favorecendo o acúmulo de linfócitos periféricos.

Um outro aspecto a ser considerado é a necessidade de ATP para a secreção de INT- γ e IL-2 importantes linfocinas que estão diretamente envolvidas na ativação da resposta imune a antígenos estranhos como os da LLC-B. Portanto, o aumento na atividade da NTPDase1 pode estar interferindo nesse processo, porém para uma maior compreensão do papel desempenhado por esta enzima mais estudos a respeito dessa relação são necessários.

Por fim, nossos estudos demonstraram que a hidrólise de ATP e ADP está modificada em linfócitos de pacientes com LLC-B em seus diferentes estágios. Nossos resultados sugerem que a alta atividade da NTPDase1 pode representar um importante papel na resistência de células leucêmicas-B às ações líticas do ATP. Além disso, investigações sobre a utilização de CD39 com um marcador para o prognóstico de LLC-B têm um futuro promissor, mas é ainda muito prematuro propor sua aplicação.

VI . CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente estudo nos permitem concluir que:

1. Os linfócitos mantiveram-se intactos durante os ensaios realizados;
2. Houve alteração na atividade da enzima NTPDase1 em linfócitos periféricos de pacientes com leucemia linfocítica crônica-B;
3. A atividade da enzima NTPDase1 está alterada nos linfócitos periféricos de pacientes com leucemia linfocítica crônica-B em relação ao estágio da doença segundo a classificação de Binet;
4. Verifica-se uma forte correlação positiva entre a atividade da enzima NTPDase1 e a contagem de glóbulos brancos.

VII . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADINOLFI, E.; MELCHIORRI, L.; FALZONI, S.; CHIOZZI, P.; MORRELLI A.; TIEGHI, A.; CUNEO, A.; CASTOLDI, G.; DI VIRGÍLIO, F. AND BARICORDI O. R. P₂X₇ receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. **Blood**. 99: 706-708, 2002.

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

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

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

BINET, J.L.; AUQUIER, A.; DIGHIRO G. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. **Cancer**. 48: 198-206, 1981.

BIRCK, A.; BROCKMAN, M.J.; GEADEK, E.M.; ROBERTSON, H.D.; DROSOPOULOS, J.H.F.; MARCUS, A.J.; SZETO, H.H. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 140: 166-175, 2002.

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

BYRD, C.J.; STILGENBAUER, S. and FLINN, I. W. Chronic lymphocytic leukemia. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**. 163-183, 2004

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

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

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, M.J.; MORELLI, A .; TORBOLI, M.; BOLIGNESI, G.; BARICORDI, R. Nucleotide Receptors: An emerging Family of Regulatory Molecules in Blood Cells. **Blood**. 97: 587-600, 2001.

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

ENYJYOJI, K.; SÉVIGNY, J.; LIN, Y.; FRENETTE, P.S.; CRISTIE, P..D.; ESCH, A .M.; IMAI, M., EDELBERG, ,J.M.; RAYBURN, H.; LECH, M.; BEELER, D.L.; CSIZMADIA, E.; WAGNER, D..D.; SIMON, C. Target disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase result in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**. 5: 1010-1017, 1999.

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

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

GOEPFERT, C.; IMAI, M.; BROUARD, S.; CSIZMADIA, E.; KACZMAREK, E.; ROBSON, S.C. CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. **Molecular Medicine** . 6:591-603, 2000.

IKEHARA S.; PAHWA R.N.; LUNZER D.G.; GOOD R.A.; MODAK M.J.; Adenosine 5' triphosphate (ATP) mediated stimulation and suppression of DNA synthesis in lymphoid cells. Characterization of ATP responsive cells in mouse lymphoid organs. **Journal of Immunology**. 167;1934-1938, 1981.

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

KITTEL, A .; GANIDO, M.; VARGA, G. Localization of NTPDase 1/ CD39 in normal and transformed human pancreas. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 50: 549-555, 2002.

KOKHAEI, P.; PALMA, M.; MELLSTEDT, H. & CHOUDHURY A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. **Annals of Oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**. 16:113-123, 2005.

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

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

LEAL, D.B.R.; STREHER C.A.; NEU T.N.; BITTRNCOURT F.P.; LEAL C.A.M.; SILVA, J.E.P.; MORSCH V.M.; SCHETINGER M.R.C. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in humans lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta** 1721: 9-11, 2005.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microciologia médica e imunologia**. 4^a ed. Porto Alegre, ARTMED, 1998.

LORENZI, T. **Manual de Hematologia**. 3ed. Rio de Janeiro, MEDSI, 2003.

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

LUNKES, I.G.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORCH, A.; MORCH, M.V.; MAZZANTTI, M.C.; SCHETINGER, M.C.R. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, 109, 189-194, 2003.

MALMSJO, M.; EDVINSSON, L.; ERLINGUE, D. P2x receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. **European Journal of Pharmacology**. 390: 173-180, 2000.

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

PINSKY, D.J.K.; BROEKMAN, M.J.; PESCHON, J.; STOCKING, K.L.; FUJITA, T.; RAMASAMY, R.; CONNOLLY, E.S.; HUANG, J.; KISS, S.; ZHANG, Y.; CHOUDHRI, T.F.; MCTAGGRT, R.A.; LIAO, H.; DROSOUPOULOS, J.H.F.; PRICE, V.L.; MARCUS, A.J.; MALISZEWSKI, C.R. Elucidation of thromboregulatory role of Cd39/ectoapyrase in ischemic brain. **The journal of Clinical Investigation**. 109: 1031-1040, 2002.

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

RAI, K.R.; SAWITSKY, A.; CRONKITE, E.P. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**. 46: 219-234, 1975.

RALEVIC, V.; BURNSTOK G. Tri Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**. 50:413-492, 1998.

RAPAPORT E. Mechanisms of anticancer activities of adenine nucleotides in tumor-bearing hosts. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 603; 142-150, 1990.

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

ROBSON, R. & ROSENBERG D. Targeted disruption of CD 39/ ATP diphosphohydrolases results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**. 5: 1010-1017, 1999.

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

SCRIVENER, S.; GODDAR, R.V; KAMINSKI E.R; PRENTICE, A.G. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Leukemia & Lymphoma**. 44: 383-389, 2003.

SOSLAY, G. & YOUNGPRAPAKORN, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1355: 131-140, 1997.

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

SURPRENANT, A.; RASSENDREN, F.; KAWASHIMA, E. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). **Science**. 272: 735-738, 1996.

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

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

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

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 362: 299-309, 2000.

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

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e práticas**. 1^oed. São Paulo, ATHENEU, 2004.

ZWIEBEL, J.A.; CHESON B.D. Chroni lymphocytic leukemia: staging an prognostic factors. **Seminars in Oncology**. 25: 42-59, 1998.

YAGI, K.; SHIMBO, M.; SHIMBA, S.; MIURA, Y. Purifiation and characterization of adenosine diphosphotase from human umbilical vessel. **Chemica Pharmarology Bulletin**. 40: 2143-2146, 1992.

VIII . ANEXO

PERMISSÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1- TÍTULO:

ESTUDOS DA ATIVIDADE DA ENZIMA NTPDase EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA

2- OBJETIVO:

Verificar a atividade da enzima NTPDase em linfócitos de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica. O estudo será desenvolvido no laboratório de Hemato-Oncologia do HUSM e no laboratório de Enzimologia Toxicológica da UFSM com adesão voluntária, de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica em tratamento no HUSM.

3- PROCEDIMENTOS E RISCO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO:

O(A) Senhor(a) será submetido(a) a uma punção venosa. O seu material biológico, sangue, será separado e depois destinado para análise. Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação ao(a) Senhor(a). O paciente que se submeter à punção venosa, poderá em caso de acidente de coleta, desenvolver flebite, hematoma local e petéquias. Neste caso será atendido e medicado neste serviço.

4- ESTOCAGEM DE AMOSTRAS DO SANGUE:

Seu sangue, será estocado em uma geladeira no laboratório de Hemato-Oncologia para futuros testes por um período de um mês, após serão descartadas.

5- PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua participação neste estudo é livre e voluntária, não havendo nenhuma forma de compensação financeira e também nenhum prejuízo ou comprometimento dos cuidados médicos ao(a) Senhor(a).

6- CONFIDENCIALIDADE:

Sua identidade permanecerá em sigilo. Os registros do prontuário também serão confidenciais e sob responsabilidade do HUSM, conforme legislação vigente.

7- ESCLARECIMENTO:

Caso haja dúvida quanto a sua participação, favor entrar em contato com: Maria Rosa Schetinger pelo telefone de número: 32208665

8- IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

NOME

IDENTIDADE

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador