

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

Lara Vargas Becker

**PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO NO LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO: UM ESTUDO CLÍNICO E DE REVISÃO**

Santa Maria, RS
2018

Lara Vargas Becker

**PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO:
UM ESTUDO CLÍNICO E DE REVISÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Enzimologia Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof. (Dra) Maria Rosa Chitolina Schetinger
Co-orientadora: Prof. (Dra) Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS
2018

Becker, Lara Vargas

Papel do Sistema Purinérgico no Lúpus Eritematoso
Sistêmico: um estudo clínico e de revisão / Lara Vargas
Becker.- 2018.

97 p.; 30 cm

Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Coorientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2018

1. Lúpus Eritematoso sistêmico 2. ATP 3. Adenosina
4. E-NTPDase 5. ADA I. Schetinger, Maria Rosa Chitolina
II. Leal, Daniela Bitencourt Rosa III. Título.

Lara Vargas Becker

**PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO NO LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO: UM ESTUDO CLÍNICO E DE REVISÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Enzimologia Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 18 de dezembro de 2018:

**Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra. (UFSM)
(Presidente/orientador)**



Marina Prigol, Dra. (UNIPAMPA)



Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)



Roselia Maria Spanevello, Dra. (UFPeI)



Virgínia Cielo Rech, Dra. (UFN)

Santa Maria, RS
2018

Dedico este trabalho aos meus pais,
meus maiores apoiadores e incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Vânia e Alfonso, por me apoiarem e incentivarem sempre e por não medirem esforços para que eu conquistasse meu objetivo!

Às minhas irmãs, Larissa e Mariana, por todo carinho, amizade e por estarem SEMPRE ao meu lado, eu as amo muito! Ao meu sobrinho Mateus, por toda alegria que me proporciona, me fazendo voltar à infância.

À minha orientadora Maria Rosa Chitolina Schetinger e a minha co-orientadora Daniela Bitencourt Rosa Leal, pela orientação, compreensão e por todo aprendizado nestes anos de caminhada.

À minha amiga de infância Larissa Alves, pelo apoio, companheirismo e por ser um exemplo de dedicação e determinação.

Às minhas grandes amigas Ana, Carine, Karine e Viviane pela amizade, pelo incentivo e pelo apoio.

Aos colegas do laboratório 4229, Tais, Alessandra, Viviane, Fernanda, Patrícia, Lívia, Jean, Matheus, Mauren, Maura, Pedro, Enzo e Cláudio, pela amizade durante o período de convívio e pela colaboração para realização deste trabalho.

O meu agradecimento especial as colegas e amigas, Renata Saccol e Daniela Passos pela imensa colaboração neste trabalho, o qual não seria possível sem a ajuda das duas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pelo auxílio e apoio prestados.

Aos médicos de Reumatologia do HUSM, Yaser Mustafa, Daniel Zanchet e Márcia Scalcon pela atenção e disponibilidade.

E não posso deixar de agradecer, aos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e os controles que fizeram parte deste estudo.

A todos aqueles que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho, agradeço imensamente!!

“ O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher. ”

Cora Coralina

RESUMO

PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: UM ESTUDO CLÍNICO E DE REVISÃO

AUTORA: Lara Vargas Becker
ORIENTADORA: Maria Rosa Chitolina Schetinger
CO-ORIENTADORA: Daniela Bitencourt Rosa Leal

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune multifatorial causada por perturbações do sistema imune, caracterizada pela quebra da autotolerância imune, ativação de linfócitos T autorreativos e hiperatividade de linfócitos B. Os nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina, como o ATP e a adenosina, são componentes chave nos processos inflamatório e imune, inclusive modulando as funções dos linfócitos. Seus níveis extracelulares são regulados por ectoenzimas como a E-NTPDase que hidrolisa ATP/ADP até AMP; a enzima E-5'-nucleotidase que degrada AMP até adenosina e a E-adenosina desaminase (E-ADA) que converte a adenosina a inosina. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade e expressão da E-NTPDase, a expressão da E-5'-nucleotidase e a atividade da E-ADA em linfócitos de pacientes com LES, bem como a atividade da ADA e a concentração de nucleotídeos e nucleosídeo no soro desses pacientes. Também tivemos como objetivo escrever um manuscrito de revisão sobre o tema após verificarmos lacunas na literatura em relação a sinalização purinérgica e LES. Foram selecionados 35 pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) com diagnóstico de LES, o qual foi baseado em critérios de classificação do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) e 30 controles, dos quais amostras de sangue foram coletadas para a realização das análises. Os resultados mostraram um aumento da concentração de ATP no soro, possivelmente resultado do processo inflamatório, e uma redução dos níveis de adenosina nos pacientes com LES. Foi observada uma maior atividade (31%) e expressão (37%) da E-NTPDase em linfócitos de pacientes com LES. A atividade da E-ADA também encontrou-se aumentada, aproximadamente 42% nos linfócitos desses pacientes. Já a atividade da ADA no soro foi reduzida em 57%, em relação a expressão da E-5'-nucleotidase em linfócitos dos pacientes com LES não foram observadas diferenças. Analisamos também a atividade da E-NTPDase e ADA em dois grupos de pacientes, remissão e exacerbação, as quais não tiveram alterações possivelmente devido à presença constante de autoanticorpos e persistentes anormalidades mesmo durante a fase de remissão. O aumento evidenciado na atividade e expressão da E-NTPDase poderia representar um mecanismo para auxiliar no controle da inflamação, já que esta enzima exerce efeitos anti-inflamatórios através da remoção de ATP. Porém a atividade da E-ADA aumentada, nos linfócitos, poderia favorecer a resposta Th1 e limitar os efeitos anti-inflamatórios da adenosina. Por outro lado, a ADA no soro revelou-se diminuída o que poderia ser devido a prejudicada função dos macrófagos, apresentada por estes pacientes, já que a maior parte da ADA no soro tem como fonte essas células. Diante disto, concluímos que a E-NTPDase, a ADA e a via purinérgica possuem importante função na modulação da resposta imune e inflamatória nos pacientes com LES.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. ATP. Adenosina. E-NTPDase. ADA. E-5'-nucleotidase.

ABSTRACT

PURINERGIC SYSTEM ROLE IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: A CLINICAL AND REVIEW STUDY

Author: Lara Vargas Becker
ADVISOR: Maria Rosa Chitolina Schetinger
CO-ADVISOR: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a multifactorial inflammatory autoimmune disease caused by an immune dysfunction characterized by a breakdown of immune self-tolerance, activation of autoreactive T lymphocytes and B lymphocyte hyperactivity. The nucleotides and nucleoside adenine, such as ATP and adenosine, are key components in inflammatory and immune processes, including the modulation of lymphocyte functions. Their extracellular levels are regulated by ectoenzymes such as E-NTPDase which hydrolyzes ATP / ADP to AMP; E-5'-nucleotidase that degrades AMP to adenosine and E-adenosine deaminase (E-ADA) that converts adenosine to inosine. In this work, we determined the activity and expression of E-NTPDase, E-5'-nucleotidase expression, and E-ADA activity in lymphocytes, as well as ADA activity and nucleotide and nucleoside concentration in the serum of SLE patients. We also aimed to fill in some gaps we observed in the literature by writing a review article regarding purinergic signaling and SLE. Thirty-five patients from the University Hospital of Santa Maria (HUSM) with a diagnosis of SLE were selected, based on the Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) classification criteria and 30 controls, from which blood samples were collected for the analyzes. The results showed an increase in the serum ATP concentration, possibly as a result of inflammation, and a decrease in adenosine levels in SLE patients. Increased activity (31%) and expression (37%) of E-NTPDase were observed in lymphocytes of SLE patients. The activity of E-ADA was also increased by approximately 42% in the lymphocytes of these patients. The serum ADA activity was reduced by 57%. Regarding the expression of E-5'-nucleotidase in lymphocytes of patients with SLE, no differences were observed. The increase observed in the activity and expression of E-NTPDase could represent a mechanism to help in the control of inflammation, since this enzyme exerts anti-inflammatory effects through the removal of ATP. However, increased E-ADA activity in lymphocytes could favor a Th1 response and limit the anti-inflammatory effects of adenosine. On the other hand, serum ADA has been shown to be decreased due to the impaired macrophage function present in these patients since most of the serum ADA comes from these cells. When we checked a gap in the literature regarding purinergic signaling and SLE, we decided to write a review on the topic to elucidate the effects of ATP and E-NTPDase on SLE and contribute to the understanding of SLE in this context. In view of this, we conclude that the NTPDase, ADA and the purinergic pathway play an important role in modulating the immune and inflammatory response in SLE patients.

Key words: Systemic lupus erythematosus. ATP. Adenosine. NTPDase. ADA. 5'-nucleotidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – <i>Clearance</i> normal e defeituosa de células apoptóticas.....	19
Figura 2 – Patogênese do lúpus eritematoso sistêmico.....	20
Figura 3 – Desequilíbrio na razão Th17/Treg.....	25
Figura 4 - Desenho esquemático da cascata de sinalização purinérgica.....	28
Figura 5 – Modelo anti-inflamatório mediado por linfócito B através de CD73/adenosina.....	37

ARTIGO

Figura 1 – E-NTPDase activity in lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) patients and the control group. NTPDase activity [hydrolysis of ATP (C) and ADP (D)] in lymphocytes of SLE patients during two different phases of the disease.....	43
Figura 2 – Expression of CD39 (A) and CD73 (B) in lymphocytes from SLE and control subjects. (C) Expression of CD39 in lymphocytes of SLE patients in remission and relapse.....	43
Figura 3 – CD39 expression was analyzed in gated CD39 ⁺ CD45 ⁺ cells. Control (A) and SLE subjects (B).....	44
Figura 4 – Pearson's correlation analysis between % of CD 39 positive cells and E-NTPDase activity (ATP (A) and ADP (B) hydrolysis).....	45
Figura 5 –Ecto-adenosine deamination in lymphocytes of control group and SLE (A). (B) E-ADA activity in lymphocytes of SLE patients during two different phases of the disease. (C) ADA activity in serum of control group and patients with SLE. (D) ADA activity in serum of SLE patients during two different phases of the disease.....	45

MANUSCRITO

Figura 1 – Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE).....	67
Figura 2 – Activation of the inflammasome via P2X7 receptors.....	68

Figura 3 – Signaling of ATP in some immune cells involved in SLE.....	69
---	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 – Sistema de Classificação SLICC para LES.....	22
---	----

ARTIGO

Tabela 1 – General characteristics and pharmacological treatments in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and Controls.....	42
---	----

Tabela 2 – General characteristics and pharmacological treatments in patients SLE remission and SLE relapse.....	42
--	----

Tabela 3 – Purine level measurement.....	45
--	----

MANUSCRITO

Tabela 1 – Differences between apoptosis and necrosis.....	71
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR – região conservada da apirase
ADA – adenosina desaminase
ADP – adenosina difosfato
AMP – adenosina monofosfato
APC – célula apresentadora de antígeno
AR – artrite reumatoide
ATP – adenosina trifosfato
BCR – receptor de célula B
CNT – transportador de nucleosídeo concentrativo
DAMP – padrão associado ao dano
DSS – sulfato sódico dextrana
EM – esclerose múltipla
ENT – transportador de nucleosídeo equilibrativo
E-NTPDase – ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
FAN+ – fator antinuclear positivo
GPI – glicosil fosfatil inositol
HAI – hepatite autoimune
IC – imunocomplexo
IFN γ – interferon γ
IL-10 – interleucina 10
IL-17 – interleucina 17
IL-18 – interleucina 18
IL-1 β – interleucina 1 β
IL-2 – interleucina 2
IL-23 – interleucina 23
IL-6 – interleucina 6
LES – lúpus eritematoso sistêmico
NET – armadilha extracelular de neutrófilos
NKT – célula natural Killer T
SCID – imunodeficiência combinada grave
TCR – receptor de célula T
TGF β - fator de crescimento β
TNF α – fator de necrose tumoral α
VNUT – transportador vesicular de nucleotídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 OBJETIVOS.....	15
1.1.1 Objetivo geral	15
1.1.2 Objetivos específicos.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	16
2.2 LINFÓCITOS.....	23
2.3 NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS	26
2.3.1 Receptores purinérgicos	29
2.4 ECTOENZIMAS	31
2.4.1 Ecto-NTPDase	31
2.4.2 Ecto-5'-nucleotidase.....	33
2.4.3 Adenosina desaminase.....	34
2.5 E-NTPDASE, ECTO-5'-NUCLEOTIDASE E ADA ASSOCIADAS A IMUNIDADE	35
3 ARTIGO E MANUSCRITO	39
4 DISCUSSÃO.....	72
5 CONCLUSÕES	76
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	77
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	78
ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO	82
6 REFERÊNCIAS	83

APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, os objetivos e a revisão bibliográfica. A seguir, os resultados são apresentados na forma de um artigo e um manuscrito, os quais foram escritos seguindo-se as normas dos periódicos aos quais foram submetidos. Os itens discussão e conclusão, dispostos após o artigo e o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao artigo e manuscrito. As referências bibliográficas apresentadas no final da tese referem-se às citações que aparecem nos itens introdução, revisão bibliográfica e discussão.

1 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune e inflamatória que afeta predominantemente mulheres. A etiologia exata de LES ainda não é totalmente conhecida, porém sabe-se que fatores ambientais, hormonais e genéticos estão envolvidos na patogênese da doença (DIAS; ISENBERG, 2014). O LES é caracterizado pela quebra irreversível da autotolerância imunológica, onde há desregulação de múltiplos aspectos do sistema imune, levando à ativação de linfócitos T autorreativos e à hiperatividade de linfócitos B (HUTLOFF et al., 2004). A quebra da tolerância imunológica pode resultar de defeitos na depuração de células apoptóticas e apresentação anormal de autoantígenos por células apresentadoras de antígenos (APCs) aos linfócitos T, que após sua ativação auxiliam os linfócitos B na produção de autoanticorpos; a ligação de autoanticorpos aos autoantígenos forma os imunocomplexos (ICs), que se depositam nos órgãos e tecidos causando inflamação e dano (WU et al., 2016).

No LES os linfócitos B e T exibem múltiplas anormalidades, que podem refletir defeitos primários, determinados geneticamente, ou mais comumente efeitos secundários do ambiente inflamatório desregulado que está presente na doença (PENG, 2009). Anormalidades na transdução de sinais intracelulares em linfócitos T gera expressão anormal de citocinas (CRISPÍN et al., 2007). Linfócitos Treg de pacientes com LES apresentam decréscimo da atividade supressora e inadequado número e fenótipo (LIN et al., 2007; CHAVELE and EHRENSTEIN, 2011). Nesses pacientes existe ainda um desequilíbrio na razão Th17/Treg, favorecendo linfócitos Th17 (ALUNNO et al., 2012). Os linfócitos B de pacientes com LES produzem uma variedade de autoanticorpos (CRISPÍN et al., 2010), além disso, essas células apresentam distribuição anormal de suas populações; o que pode ser resultado de defeitos em *checkpoints* da tolerância (JACOBI et al., 2009).

Os nucleotídeos, como o ATP, e o nucleosídeo adenosina podem ser liberados para o espaço extracelular durante inflamação e desempenham várias funções, inclusive na resposta imune (JUNGER, 2011). O ATP extracelular pode funcionar como uma molécula de sinalização durante a inflamação e a resposta imune (DI VIRGILIO, 2005), modulando esses processos através de seus efeitos em uma ampla variedade de células imunes e não imunes, incluindo os linfócitos (BOURS et al., 2006). A adenosina tem um papel já bem estabelecido na imunidade

(HASKÓ and CRONSTEIN, 2004; SITKOVSKY et al., 2004), contribuindo para a engenharia da inflamação e da resposta imune, favorecendo um sinal supressivo e de proteção dos tecidos (SITKOVSKY and OHTA, 2005). O ATP e a adenosina exercem seus efeitos através da ligação com receptores purinérgicos específicos do tipo P1 e P2 (VITIELLO et al., 2012; MORANDI et al., 2018). Os receptores P1 são subdivididos em 4 tipos, A1, A2A, A2B e A3 e são capazes de se ligar à adenosina com diferentes afinidades (BOURS et al., 2006). Os receptores P2 são subdivididos em duas subfamílias P2X e P2Y; receptores do tipo P2X são canais iônicos dependente de ligantes e são reconhecidos 7 subtipos (P2X1-P2X7) (NORTH, 2016), receptores P2Y são acoplados à proteína G e existem 8 subtipos descritos (P2Y1,2,4,6,11-14) (ABBRACCHIO et al., 2006).

Uma vez no espaço extracelular os nucleotídeos são rapidamente degradados por ectonucleotidases, como a E-NTPDase que degrada ATP/ADP até AMP e a E-5'-nucleotidase que converte AMP até adenosina (YEGUTKIN, 2008). Em adição, a enzima adenosina desaminase (ADA) possui papel chave no metabolismo das purinas, catalisando a irreversível desaminação da adenosina em inosina (VAN DER WEYDEN and KELLEY, 1976). A enzima E-NTPDase tem efeitos anti-inflamatórios através da remoção de ATP extracelular, os quais podem ser ampliados ainda mais pela geração de adenosina (THIEL; CALDWELL; SITKOVSKY, 2003); que pode ser gerada pela E-NTPDase juntamente com a E-5'-nucleotidase (YEGUTKIN, 2008). A ADA representa um crítico checkpoint na regulação dos níveis de adenosina extracelular, desempenhando um papel central na modulação das respostas purinérgicas em vários eventos fisiopatológicos (ANTONIOLI et al., 2012).

Existem muitas lacunas na literatura em relação a sinalização purinérgica e a imunopatogênese do LES. Assim, a proposta desta tese foi avaliar as enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-adenosina desaminase em linfócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, já que estas enzimas estão relacionadas com as respostas inflamatórias e imunes. Bem como compilar os achados dos últimos anos sobre ATP, E-NTPDase e LES em um manuscrito de revisão; colaborando assim para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessa patologia.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do sistema purinérgico no Lúpus Eritematoso Sistêmico em um estudo clínico, com pacientes diagnosticados com esta doença provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), e em um estudo de revisão.

1.1.2 Objetivos específicos

- Quantificar os níveis de nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.
- Verificar a atividade e expressão da enzima E-NTPDase em linfócitos periféricos de pacientes com LES.
- Verificar a expressão da enzima E-5'-nucleotidase em linfócitos periféricos de pacientes com LES.
- Determinar a atividade da enzima E-ADA em linfócitos periféricos de pacientes com LES.
- Determinar a atividade da enzima ADA no soro de pacientes com LES;
- Verificar in vitro a influência de fármacos comumente utilizados no tratamento de LES na atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA em linfócitos de voluntários saudáveis.
- Escrever um manuscrito focando no envolvimento do ATP na modulação do processo inflamatório e resposta imune, via receptores P2, bem como o papel da NTPDase correlacionando com o LES.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma complexa doença autoimune inflamatória, caracterizada pela produção de autoanticorpos dirigidos principalmente contra antígenos nucleares, apresenta uma heterogeneidade de manifestações clínicas onde diferentes órgãos e sistemas podem ser afetados. A doença possui curso imprevisível, com períodos de exacerbação e de remissão (YEOH; DIAS; ISENBERG, 2018). O LES pode levar a incapacidade física e sofrimento psicológico, sendo considerado uma ameaça à vida do paciente (ARAÚJO; TRAVERSO-YÉPEZ, 2007).

A incidência global do LES varia de 0,3 a 23,7 a cada 100.000 habitantes/ano (PONS-ESTEL; UGARTE-GIL; ALARCÓN, 2017), no Brasil a incidência é de 8,7 casos a cada 100.000 habitantes/ano (VILAR; SATO, 2002) enquanto que a taxa de prevalência mundial varia em torno de 6,5 a 178 a cada 100.000 habitantes (PONS-ESTEL; UGARTE-GIL; ALARCÓN, 2017). LES é mais frequente em descendentes de africanos, hispânicos, chineses e asiáticos; em geral estes pacientes apresentam maior número de manifestações hematológicas, neurológicas e renais (YEOH; DIAS; ISENBERG, 2018). A incidência também é maior em mulheres do que em homens em uma razão de 8-15:1, porém o início da doença é similar em homens e mulheres com pico na idade reprodutiva, variando entre os 17-32 anos (PONS-ESTEL; UGARTE-GIL; ALARCÓN, 2017). A taxa de mortalidade em pacientes com LES é 2,6-3 vezes maior que na população em geral, provavelmente relacionada às altas taxas de infecções, doença cardiovascular e doença renal (LEE et al., 2016).

A etiologia exata de LES ainda permanece desconhecida (MUÑOZ et al., 2010a), porém sabe-se que fatores ambientais, genéticos e hormonais estão relacionados com a indução e a manutenção da doença (DIAS; ISENBERG, 2014). Estudos apontam alguns genes associados ao LES localizados no cromossomo 1 como PTPN22 (KYOGOKU et al., 2004) e C1Q (SESTAK et al., 2007) além do intervalo de ligação 1q23 que codifica os receptores Fcγ (receptores para IgG) que contribuem para uma incompleta *clearance* de imunocomplexos (ICs) (KARASSA; TRIKALINOS; IOANNIDIS, 2004). Diversos fatores ambientais têm sido descritos

como tendo papel no LES, incluindo exposição à luz ultravioleta, alguns tipos de medicações (por exemplo, penicilina), uso de álcool e infecção causada pelo vírus Epstein-Barr (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

Além disso, o desequilíbrio hormonal também pode modular a incidência da doença, mulheres com LES apresentam valores menores de testosterona e progesterona quando comparadas com controles, enquanto estradiol e prolactina estão aumentados nessas pacientes (COOPER et al., 2002). Já em homens com LES os níveis de testosterona e estradiol estão normais enquanto que a prolactina está aumentada (COOPER et al., 2002). A prolactina possui efeito estimulatório no sistema imune, interferindo especificamente na indução da tolerância de linfócitos B, aumentando a resposta proliferativa a antígenos e aumentando a produção de citocinas e autoanticorpos (SHELLY; BOAZ; ORBACH, 2012). O estradiol em geral é considerado imunoestimulatório, e influencia o desenvolvimento e várias funções dos linfócitos T; em particular nos linfócitos CD4T, incluindo ativação, secreção de citocinas e funções regulatórias (MOULTON, 2018).

A patofisiologia do LES é complexa e multifatorial, a iniciação e progressão da autoimunidade incluem os seguintes fatores: quebra da tolerância imune e geração de linfócitos B e T efetores específicos de autoantígenos e a subsequente produção de autoanticorpos; defeitos na morte celular e/ou na *clearance* de material apoptótico e continuada geração de autoantígenos; inflamação tecidual e deficiências na regulação imune combinada com mecanismos que propagam a cronicidade da doença (ZHARKOVA et al., 2017).

A tolerância imune é a capacidade que o sistema imune tem de identificar e executar respostas para eliminar antígenos não próprios e prevenir respostas prejudiciais contra autoantígenos (JERNE, 2004). A tolerância central elimina linfócitos B e T autoreativos, o mecanismo principal é a seleção negativa; antes de se tornarem imunocompetentes esses linfócitos com alta afinidade sofrem apoptose. Já a tolerância periférica inibe a resposta imune contra tecidos do próprio organismo através de mecanismos como anergia, deleção e supressão imune por células T reguladoras (ZHANG; LU, 2018). LES caracteriza-se por um defeito no sistema imune que resulta na perda da tolerância para autoantígenos, hiperatividade e hiperresponsividade de linfócitos T e B (DIAS; ISENBERG, 2014) e aumentada expressão de autoanticorpos (ALARCON-RIQUELME, 2007); os quais incluem anti-dsDNA, anti-SSA (Ro), anti-SSB (La), anti-sm e anti-RNPs que são cruciais no

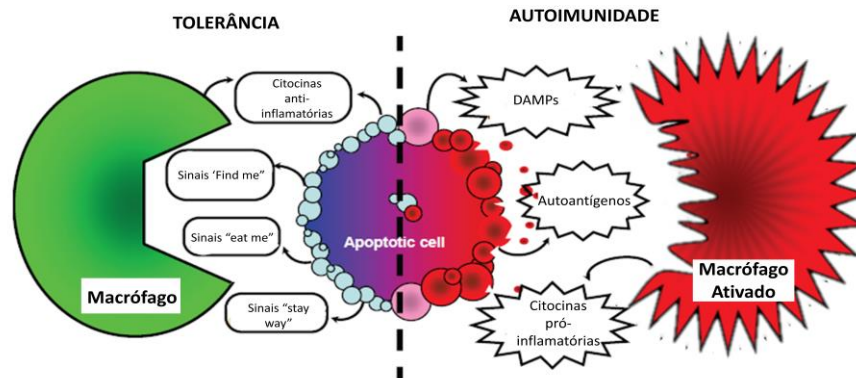
desenvolvimento da doença (OLSEN; KARP, 2014). Os anticorpos antinucleares são característicos de lúpus e estão presentes em mais de 95% dos pacientes (MOK; LAU, 2003).

A inflamação e o dano aos órgãos no LES são causados pela deposição de imunocomplexos (ICs), os quais são formados pela união de autoantígenos e autoanticorpos (WU et al., 2016). A desregulada apoptose e o defeito na *clearance* de material apoptótico, que são característicos de LES, contribuem para a geração de autoantígenos (PERNIOK et al., 1998) e conseqüentemente a formação de ICs que se depositam nos órgãos e tecidos e levam à ativação do sistema complemento que atrai células imunes promovendo inflamação local (PODOLSKA et al., 2015). A apoptose é um processo altamente controlado e necessário para a manutenção da homeostasia e prevenção de malignidades em diversas condições fisiológicas como, por exemplo, nas células imunes após a resolução de uma infecção e em células onde ocorre dano ao DNA (HENSON; HUME, 2006). Em condições normais as células apoptóticas expressam sinais “*find me*” para atrair macrófagos; sinais “*eat me*” para iniciar a fagocitose e sinais “*stay away*” para prevenir a migração de neutrófilos, a inflamação e a resposta imune.

Por sua vez os macrófagos, após a ingestão de células apoptóticas, secretam citocinas “*tolerate me*”, incluindo fator de crescimento β (TGF β) e interleucina 10 (IL-10) as quais criam um ambiente anti-inflamatório (WU et al., 2016). Porém em LES existe um defeito na capacidade fagocítica dos macrófagos (TAS et al., 2006) e uma ineficiente *clearance* gera acúmulo de células apoptóticas que podem sofrer necrose secundária e liberar sinais que provocam uma resposta inflamatória crônica e que pode levar a quebra da tolerância imune (CHURCH; COOK; MCDERMOTT, 2008) (figura 1).

A necrose secundária é caracterizada pela desintegração das células que foram inicialmente apoptóticas, por aumento no volume celular, ruptura da membrana celular e liberação de padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs) no espaço extracelular (GREEN et al., 2009) como autoantígenos, HMGB1, proteases, ATP e ácido úrico (MUÑOZ et al., 2010b).

Figura 1. *Clearance* normal e defeituosa de células apoptóticas

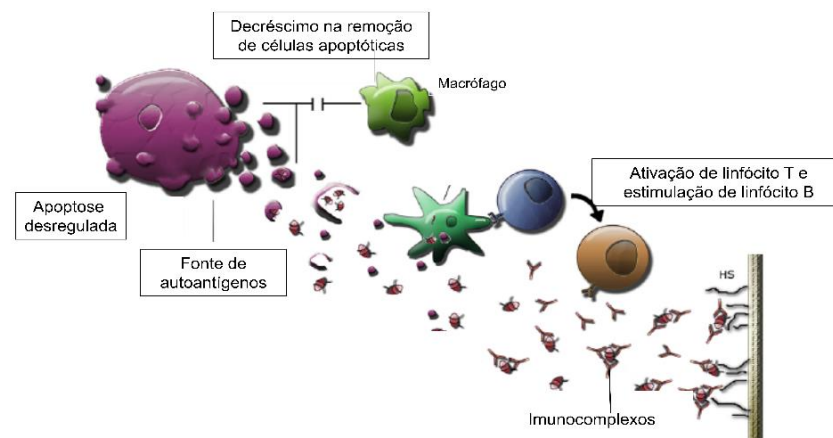


Clearance normal de células apoptóticas (à esquerda) envolve sequência de sinais e tem importante papel na indução da tolerância. *Clearance* defeituosa de células apoptóticas (à direita), envolve estímulos multi-inflamatórios, quebra da tolerância e dirige a autoimunidade (Adaptado de SHAO AND COHEN, 2011).

Os DAMPs podem ativar a via NF- κ B e o inflamassomo para produzir citocinas pró-inflamatórias e promover a sobrevivência de linfócitos autorreativos (CHURCH; COOK; MCDERMOTT, 2008). Além disso, os DAMPs podem ativar as células dendríticas (DCs) (GALLUCCI; LOLKEMA; MATZINGER, 1999) e dependendo do ambiente estas células maduras polarizam células T *naive* em Th1, Th17 ou Treg através da secreção de distintos padrões de citocinas; ou Th2 através da indução de proteínas de superfície (WALSH; MILLS, 2013). Em ambientes pró-inflamatórios há a migração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos (PODOLSKA et al., 2015). Os neutrófilos de pacientes com LES apresentam várias anormalidades em seu fenótipo e em sua função (COURTNEY et al., 1999). Neutrófilos ativados liberam armadilhas extracelulares (NETs), as quais passam por um mecanismo de morte celular chamado NETosis (BOSCH, 2011). As NETs podem limitar a inflamação através da degradação de quimiocinas e citocinas, entretanto as NETs também podem se tornar uma fonte de autoantígenos (SCHAUER et al., 2014). Os pacientes com LES produzem anticorpos contra NETs (SHAO; COHEN, 2011) e sua prejudicada degradação está correlacionado com a nefrite lúpica (HAKKIM et al., 2010).

No LES o acúmulo de DAMPs nos sítios de inflamação resulta na ativação de DCs e subsequentemente a liberação de citocinas, as quais preparam uma apresentação inadequada de autoantígenos aos linfócitos T e acarretam na desregulada autorreatividade dos linfócitos T e B (COUTANT; MIOSSEC, 2016). Os linfócitos T são centrais na patogênese do LES (TSOKOS et al., 2016), pois representam um ponto chave para a autorreatividade dos linfócitos B e ajudam estes a produzir autoanticorpos contra autoantígenos (SINAI et al., 2014). Subsequentemente autoanticorpos estão envolvidos na formação de IC após a ligação com autoantígenos; a deposição de IC nos órgãos e tecidos resulta na infiltração de células imunes e dano tecidual o que pode induzir mais apoptose agindo como um ciclo vicioso e acelerando a progressão da doença (WU et al., 2016) (figura 2).

Figura 2. Patogênese do LES



(Adaptado de MUNOZ et al. 2008).

No LES existe uma deficiência na regulação imune, células que normalmente suprimem a ativação de linfócitos B como linfócitos TCD8⁺ e células NK apresentam defeito na sua atividade supressiva (LINKER-ISRAELI; QUISMORIO; HORWITZ, 1990). O estudo de Filaci et al. (2001) mostrou uma prejudicada função de linfócitos TCD8⁺ em pacientes com LES ativo (FILACI et al., 2001). A supressão prejudicada de linfócitos B pode ser um dos fatores que levam a perpetuação da doença (MOK; LAU, 2003).

Do ponto de vista clínico LES é uma doença imprevisível alternando períodos de exacerbação e remissão (DIAS; ISENBERG, 2014). Durante a remissão os pacientes apresentam poucos ou nenhum sintoma clínico, normalização de resultados laboratoriais e mínima manutenção da terapia. Já durante os períodos de exacerbação (recidiva) há aumento na atividade da doença e intensificação da terapia (MEDINA-QUIÑONES et al., 2016). Os sintomas mais comuns da doença incluem artralgia, artrite, erupções cutâneas, alopecia, úlceras orais, serosites. Além do envolvimento renal com o desenvolvimento de nefrite lúpica, uma das manifestações mais importantes de LES que causa morbidade e mortalidade (FORTUNA; BRENNAN, 2013). O LES pode acometer diversos órgãos e sistemas, nas formas “suaves” as articulações e a pele são as mais afetadas; já nas formas mais “graves” os rins e o coração são os mais acometidos, podendo o dano ser até mesmo fatal (DIAS; ISENBERG, 2014).

Como o LES pode afetar diferentes órgãos e tecidos e possui uma abundância de anormalidades clínicas e imunológicas (FORTUNA; BRENNAN, 2013), critérios de classificação são ferramentas fundamentais para garantir uma definição/diagnóstico da doença. Os primeiros critérios foram publicados em 1971 pelo *American College of Rheumatology* (ACR), sendo revisado em 1982 e em 1997. Em 2012 o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) (tabela 1) publicou e validou critérios mais sensíveis que os do ACR e com menor especificidade (PETRI et al., 2012). De acordo com o SLICC o diagnóstico da doença é confirmado quando o paciente apresenta pelo menos 4 critérios, incluindo pelo menos 1 critério clínico e 1 critério imunológico, e a presença de autoanticorpos FAN⁺ (fator antinuclear positivo) ou anti-dsDNA (PETRI et al., 2012).

A terapêutica do LES é complexa e depende dos órgãos e sistemas afetados e da severidade da doença (DIAS; ISENBERG, 2014). O tratamento medicamentoso é individualizado para cada paciente (VILAR; SATO, 2002). De modo geral, as medicações podem ser agrupadas em dois grupos: 1) corticoides (prednisona), antimaláricos (hidroxicloroquina) e imunossupressores (azatioprina, metotrexato); 2) agentes biológicos (rituximabe, belimumabe) (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

Tabela 1. Sistema de Classificação SLICC para LES

Critérios SLICC
<u>Critérios Clínicos</u>
Lúpus cutâneo agudo
Lúpus cutâneo crônico
Úlceras orais
Alopecia não cicatricial
Sinovite de duas ou mais articulações
Serosite
Renal
Neurológico
Anemia hemolítica
Leucopenia
Trombocitopenia
<u>Critérios Imunológicos</u>
Fator antinuclear positivo (FAN ⁺)
Anticorpo Anti-dsDNA positivo
Anticorpo Anti-Sm positivo
Positividade de anticorpos antifosfolipídeos
Complemento reduzido
Coombs direto positivo

(Adaptado de PETRI et al., 2012)

Os corticoides suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias e inibem o recrutamento de leucócitos (FELTEN et al., 2018). A hidroxicloroquina é capaz de aumentar o pH lisossomal em células apresentadoras de antígenos, o que interfere na fagocitose e causa ruptura na apresentação de autoantígenos. Essa medicação também altera as respostas dos linfócitos T, inibindo diversos tipos de citocinas (DURCAN; PETRI, 2016). A azatioprina é um derivado do 6-mercaptopurina que age como um agente antimetabólito imunossupressor, afetando a síntese e o metabolismo de nucleotídeos de purina. O metotrexato inibe a enzima diidrofolato redutase, a qual tem um importante papel na síntese de nucleotídeos de purina, por essa via induz apoptose de células inflamatórias. O rituximabe é um anticorpo monoclonal contra a proteína CD20. A CD20 é amplamente expressa nos linfócitos B e o rituximabe induz a apoptose das células CD20+. Outro agente biológico, o belimumabe é um anticorpo totalmente humanizado contra o estimulador de

linfócitos B (BLyS), que é um fator essencial para a sobrevivência e desenvolvimento de linfócitos B. O belimumabe leva a diminuição de linfócitos B naive, linfócitos B ativados e linfócitos B CD20+ e também causa redução dos níveis de Anti-dsDNA (FELTEN et al., 2018).

2.2 LINFÓCITOS

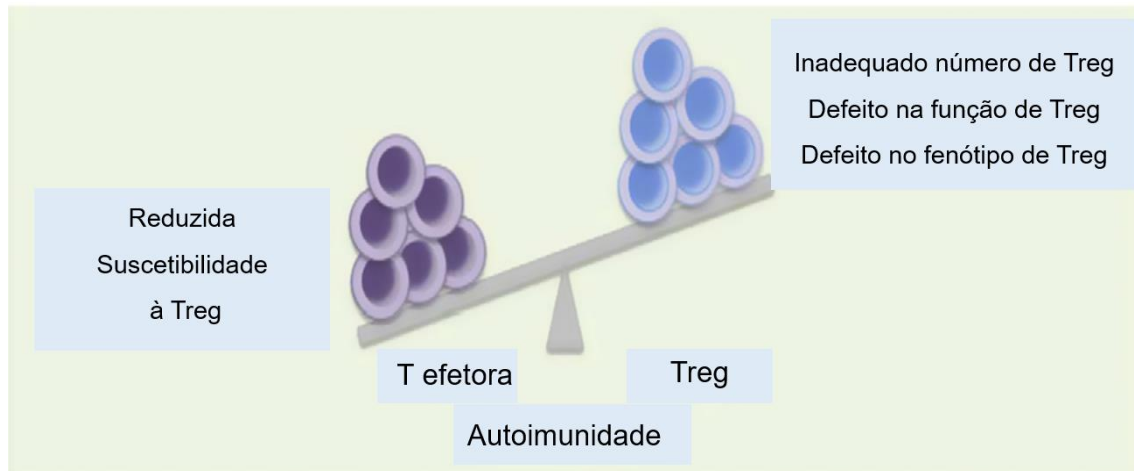
Os linfócitos T são componentes importantes da tolerância imunológica (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Diversas anormalidades nessas células são encontradas em pacientes com LES, o que evidencia sua participação na doença. Os linfócitos T são capazes de regular a função de linfócitos B, e como consequência a produção de autoanticorpos é dependente de linfócitos T (TSOKOS; BALOW, 1984).

Normalmente linfócitos T e B são removidos através de apoptose durante e após a conclusão da resposta imune. Porém, linfócitos T de pacientes com lúpus exibem uma gama de aberrações que abrangem a proliferação, morte celular e função efetora (PENG, 2009). Os pacientes com LES possuem aumentada apoptose espontânea e defeito na morte celular induzida por ativação em linfócitos T. Esse aumento da apoptose espontânea está ligado à linfopenia crônica e a liberação de autoantígenos nucleares; enquanto que o defeito na morte celular induzida por ativação está relacionado com a persistência de células autorreativas (PERL et al., 2004) e quebra da tolerância imune (HOFFMAN, 2004). Os linfócitos T de pacientes com LES também apresentam anormalidades na transdução de sinal intracelular, como alteração no complexo formado pelo TCR (receptor de células T) e a proteína CD3 (complexo TCR/CD3), o que acarreta um aumento dos eventos de sinalização, gerando exagerada transdução e consequente expressão anormal de citocinas; um exemplo é o defeito na produção de interleucina 2 (IL-2) apresentado por pacientes com LES. Essas alterações justificam a elevada capacidade dos linfócitos T de estimular linfócitos B a produzir autoanticorpos (CRISPÍN et al., 2007). A alteração exibida no complexo TCR/CD3 de pacientes com lúpus gera uma sinalização precoce e aumentada, manifestada pelo aumento do fluxo de cálcio intracitoplasmático e fosforilação da proteína tirosina citosólica (CRISPÍN et al., 2010).

Após a estimulação, linfócitos T *naive* proliferam e se diferenciam de acordo com as citocinas do meio, nos diferentes subtipos: Th1, Th2, Th17 ou Treg. Linfócitos Treg são caracterizados pela presença de CD4, CD25 e FOXP3 e contribuem para a homeostasia imune e manutenção da tolerância periférica (CVETANOVICH; HAFLE, 2010). Essas células desempenham um papel crítico na prevenção de doenças autoimunes através da supressão de linfócitos T autorreativos (COSMI et al., 2003). A resposta de supressão imune pelos linfócitos Treg se dá através de quatro mecanismos, os quais incluem: modulação da maturação e função da célula apresentadora de antígeno (APC); sinalização co-inibitória; ruptura da via metabólica e secreção de citocinas anti-inflamatórias e fatores citotóxicos (LIU; ALMO; ZANG, 2016). Estudos relatam decréscimo na habilidade supressiva de linfócitos Treg (LIN et al., 2007) (ALVARADO-SÁNCHEZ et al., 2006) e inadequado fenótipo e número dessas células nos pacientes com LES (CHAVELE; EHRENSTEIN, 2011).

Os linfócitos Th17 são identificados pela sua capacidade de produzir interleucina 17 (IL-17) (PARK et al., 2005); a qual apresenta um amplo espectro de ações incluindo a capacidade para induzir a produção de moléculas inflamatórias e moléculas que causam danos aos tecidos (ONISHI; GAFFEN, 2010). A IL-17A é capaz de estimular a produção de citocinas e quimiocinas de várias células e promover a proliferação, maturação e recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (ONISHI; GAFFEN, 2010). Dados suportam o papel da IL-17 e linfócitos Th17 na patogênese do LES, pois pacientes com a doença possuem aumentada concentração de IL-17 no soro e plasma e infiltração de linfócitos Th17 em órgãos alvos como rins (WONG et al., 2000; WONG et al., 2008). Apesar dos linfócitos Th17 possuírem um importante papel na patogênese da doença, linfócitos Th1 e outros linfócitos efetores estão envolvidos na perpetuação da resposta autoimune (SHAH et al., 2010). O desenvolvimento do LES pode ser resultado de um desequilíbrio no sistema imune efetor e linfócitos Treg (figura 3); nos pacientes com lúpus existe um desequilíbrio na razão Th17/Treg, favorecendo os linfócitos Th17 (ALUNNO et al., 2012).

Figura 3. Desequilíbrio na razão Th17/Treg



(Adaptado de CHAVELE; EHRENSTEIN, 2011)

Os linfócitos B agem como APCs e fornecem sinais co-estimulatórios necessários para a ativação, diferenciação e expansão de linfócitos T. Além disso os linfócitos B também secretam ou respondem a citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina- 6 (IL-6) e interferon α (IFN- α) (BROWNING, 2006). A tolerância central elimina os linfócitos B imaturos autorreativos através da edição do receptor (BCR) (GAY et al., 1993), sendo que a falha nesse processo resulta em linfócitos B autorreativos (CAMBIER et al., 2007). Os linfócitos B que passam pelo *checkpoint* da tolerância central migram para o baço e se desenvolvem em linfócitos B maduros. Nesse estágio essas células são reguladas por *checkpoints* periféricos como deleção, anergia e exclusão folicular (SHLOMCHIK, 2008). Os pacientes com SLE apresentam distribuição anormal de população de linfócitos B, o que indica defeitos nos *checkpoints* de tolerância (JACOBI et al., 2009). O estudo de Yurasov et al. (2006) mostrou aumento no número de linfócitos B maduros autorreativos em pacientes com LES (YURASOV et al., 2006). Os linfócitos B participam da desregulação imune no LES através da apresentação de autoantígenos aos linfócitos T; ajudando a regular a resposta inflamatória através da secreção de citocinas e quimiocinas; regulando outras células imunes e servindo de precursores de células secretoras de autoanticorpos (AHMED; ANOLIK, 2010). Sabe-se que os linfócitos B de pacientes com LES produzem uma variedade de autoanticorpos contra constituintes celulares, mais comumente contra antígenos intranucleares (CRISPÍN et al., 2010). Os autoanticorpos contribuem para o LES através da formação de IC e por interferências em funções intracelulares (KOSCEC

et al., 1997), sendo que os ICs ativam o complemento e dirigem a inflamação (HUNG et al., 2015). Os linfócitos B e T têm sido amplamente implicados na patogênese do LES, iniciando e propagando a doença (PENG, 2009).

2.3 NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS

A adenosina trifosfato (ATP) e outros nucleotídeos, como adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP), e o nucleosídeo adenosina são encontrados em todos os sistemas animais, onde produzem efeitos através de mecanismos intra e extracelulares (YEGUTKIN, 2008). ATP, ADP, AMP e adenosina são liberados nos sítios de inflamação; ATP está envolvido principalmente no desenvolvimento da inflamação, em contraste a adenosina exerce ações anti-inflamatórias (BURNSTOCK, 2006).

O ATP intracelular é utilizado primariamente em processos que requerem energia como transporte ativo, biossíntese e motilidade celular; já o ATP extracelular é considerado uma potente molécula sinalizadora (YEGUTKIN, 2008). O ATP extracelular é classificado como um importante modulador imune (VITIELLO et al., 2012), capaz de controlar a inflamação e a resposta imune (DI VIRGILIO, 2005). Esse nucleotídeo pode ser rapidamente liberado de maneira passiva, junto com outros componentes celulares após estresse mecânico, dano ou morte celular (GALLUCCI; MATZINGER, 2001); em adição, células intactas, incluindo células imunes também são capazes de liberar ATP em condições fisiológicas normais (JUNGER, 2011) (figura 4). A liberação de ATP de maneira específica/ativa ocorre através de exocitose vesicular ou de hemicanais (DOSCH et al., 2018). A liberação através de exocitose vesicular ocorre com a fusão da vesícula à membrana, mecanismo que é dependente do transportador de nucleotídeo vesicular (VNUT) que utiliza o gradiente de prótons gerado pela V-ATPase para acumular o ATP citosólico dentro da vesícula secretora; após esse armazenamento uma família de proteínas chamada SNARE medeia a fusão com a membrana e a liberação do ATP no espaço extracelular, mecanismo este que é dependente da concentração de cálcio intracelular (DOSCH et al., 2018).

Em adição à exocitose vesicular, células inflamatórias liberam nucleotídeos no espaço extracelular através de hemicanais (JUNGER, 2011); que podem ser do tipo

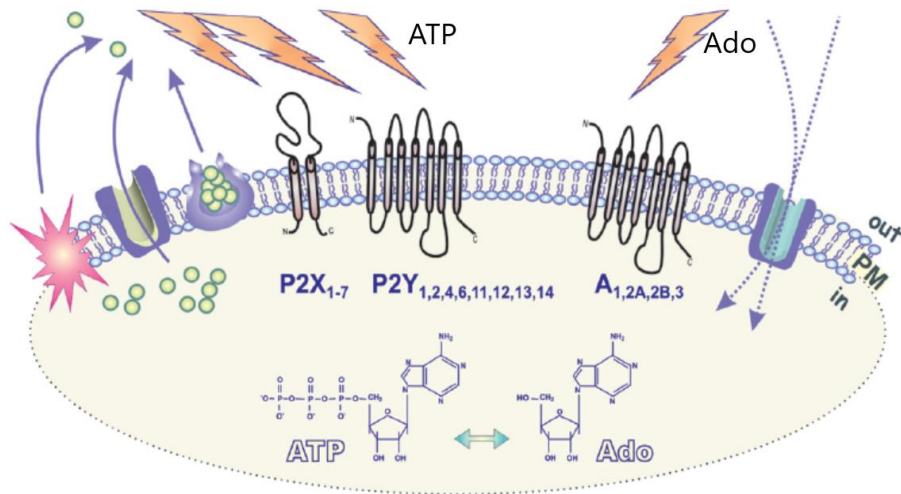
conexinas os quais são capazes de formar junções gap e hemicanais; ou panexinas que formam somente hemicanais (SOSINSKY et al., 2011). Sob condições de homeostasia esses canais permanecem predominantemente fechados (DOURADO; WONG; HACKOS, 2014). O gatilho de abertura de ambos, conexinas e panexinas, é regulado por mudanças na voltagem da membrana (RETAMAL et al., 2007), concentração de cálcio intra e extracelular (LOCOVEI; WANG; DAHL, 2006), tensão mecânica ou modificações pós-translacionais (WANG et al., 2013).

As conexinas contribuem para a inflamação através da regulação de moléculas de adesão de leucócitos no endotélio (SCHECKENBACH et al., 2011); aumentados níveis de ATP extracelular e sua sinalização através de receptores mobilizam a sinalização de cálcio intracelular, que é propagada através de conexinas, resultando assim no aumento da expressão de moléculas de adesão para leucócitos (SCHECKENBACH et al., 2011). Os canais de Panexina 1 (Panx 1) liberam ATP no espaço extracelular quando ativados; essa ativação acontece através de vários mecanismos, dentre eles a clivagem da porção C-terminal da Panx 1 mediada por caspase (SANDILOS et al., 2012). Esse tipo de ativação resulta em irreversível abertura do canal e conseqüentemente grandes quantidades de ATP extracelular são liberadas; essa ativação pode ser acoplada a ativação de receptores purinérgicos nos casos onde há o acionamento de inflamassomo (TIMÓTEO et al., 2014).

Esses mecanismos de liberação de ATP permitem a estimulação de células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais para sintonizar as repostas autócrinas/ parácrinas durante inflamação aguda e crônica (DOSCH et al., 2018). As células imunes reconhecem esse ATP liberado como um sinal de perigo que provoca uma variedade de respostas inflamatórias (DI VIRGILIO, 2005). O ATP pertence ao grupo de moléculas chamadas padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), liberados em consequência de dano celular durante o curso da infecção ou inflamação. ATP é capaz de promover inflamação através dos seguintes mecanismos: ativação de inflamassomo mediada por receptor P2X7 com conseqüente liberação de interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18) (DI VIRGILIO, 2007); estimulação de funções dos linfócitos T efetores, através da ativação de receptores (YIP et al., 2009); diminuição seletiva de linfócitos Treg imunomoduladores, os quais são sensíveis à morte celular dependente de P2X7

(ASWAD; KAWAMURA; DENNERT, 2005) e aumento da atividade dos neutrófilos, a qual é induzida pelo receptor P2X7 (SUH et al., 2001).

Figura 4. Desenho esquemático da cascata de sinalização purinérgica.



(Adaptado de YEGUTKIN, 2014)

A adenosina, um nucleosídeo com funções pleiotrópicas, é formada dentro das células ou na sua superfície, na maioria das vezes através da quebra de nucleotídeos de adenina, portanto está presente dentro e fora das células e participa de múltiplos processos biológicos (FREDHOLM, 2007). Em condições fisiológicas a adenosina encontra-se em concentrações nanomolares, porém seus níveis podem subir razoavelmente em condições de estresse e dano tecidual (FREDHOLM, 2007). A adenosina pode sofrer três processos: conversão à inosina pela enzima adenosina desaminase, reconversão à AMP por adenosina quinase e o transporte através de transportadores específicos como transportador de nucleosídeo concentrativo (CNT) e o transportador de nucleosídeo equilibrativo (ENT) (YEGUTKIN, 2008). Existem 4 isoformas de ENTs (ENT1-CNT4) (BALDWIN et al., 2004) e 3 de CNTs (CNT1-CNT3) (GRAY; OWEN; GIACOMINI, 2004). Os ENTs estão envolvidos na ativação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos (KING et al., 2006). A expressão desses transportadores de nucleosídeos em diferentes tecidos sugere que eles podem recarregar o sistema de sinalização purinérgica através da reciclagem de adenosina (JUNGER, 2011).

2.3.1 Receptores purinérgicos

O ATP extracelular exerce seus efeitos através da sua ligação com receptores purinérgicos, uma vez que este nucleotídeo encontra-se no compartimento extracelular ele é reconhecido por receptores do tipo P2 (Figura 4) que são expressos na membrana plasmática de virtualmente todos os tipos de células (VITIELLO et al., 2012) incluindo linfócitos B e T (JIN et al., 1998).

A ativação desses receptores gera diversos tipos de resposta, a qual vai depender da concentração do nucleotídeo, do tipo de célula e dos receptores expressos. Os receptores P2 são subdivididos em duas subfamílias: P2X, que respondem somente a ligação do ATP, e receptores P2Y que respondem tanto ao ATP quanto ADP (VITIELLO et al., 2012). Os receptores do tipo P2X são canais iônicos dependente de ligantes, sua abertura determina o influxo de Ca^{2+} e Na^{+} bem como o efluxo de K^{+} . Até o momento foram reconhecidos 7 subtipos (P2X1-P2X7), os quais são expressos em linfócitos, células natural killer, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (NORTH, 2016). Já os receptores do tipo P2Y são acoplados à proteína G, cuja ativação desencadeia a geração de inositol 1,4,5-trifosfato e a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares; existem 8 subtipos descritos (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-P2Y14) (ABBRACCHIO et al., 2006).

Os receptores P2X tem um papel central na inflamação e imunidade, particularmente o receptor P2X7 que desencadeia a ativação do inflamassomo NLRP3, o principal complexo intracelular envolvido na transdução de sinais de perigo e iniciação da inflamação (LÓPEZ-CASTEJÓN; PELEGRÍN, 2012). Evidências demonstram que o inflamassomo NLRP3 tem importante papel no desenvolvimento e progressão de LES (SESTER et al., 2015)

A elevada concentração de ATP acarreta na ativação de receptores P2X7 que induz o efluxo de K^{+} e subsequente o decréscimo de K^{+} intracelular, o qual é crucial para a ativação de NLRP3. Uma vez ativado o inflamassomo NLRP3 induz o recrutamento de uma proteína que ativa a caspase 1 que por sua vez catalisa a maturação da IL-1 β e IL-18 (DI VIRGILIO, 2007). IL-1 β , juntamente com IL-6 e IL-23, direciona a diferenciação de linfócitos Th17 (YANG; CHIANG, 2015). Pacientes com LES apresentam níveis aumentados de IL-1 β no soro o que está correlacionado com a atividade da doença (CIGNI et al., 2014). Já a IL-18 aumenta a produção de NETs (KAHLENBERG et al., 2013) e de interferon- γ (IFN- γ) pelos linfócitos TCD4+, além

de estimular a quimiotaxia de leucócitos e a destruição da cartilagem (VOLIN; KOCH, 2011). Elevada liberação de ATP também gera aumento da proliferação e ativação de linfócitos T através da ligação com receptores P2X7 (YU et al., 2010); além disso, antagonistas desses receptores promovem conversão de linfócitos TCD4+ em linfócitos Treg, já sua ativação por ATP inibe o potencial supressivo dos linfócitos Treg; confirmando o importante papel dos receptores P2X em linfócitos, em especial o receptor P2X7 (SCHENK et al., 2011).

A inibição do receptor P2X7, em modelo de nefrite lúpica, reduz o desenvolvimento de anticorpos anti-dsDNA, assim como diminui a deposição de IC e a inflamação renal (TAYLOR et al., 2009). A desregulada expressão e/ou atividade do receptor P2X7 em pacientes com LES podem alimentar o mecanismo pró-inflamatório nesses pacientes (DI VIRGILIO; GIULIANI, 2016).

Já a adenosina pode agir em 4 tipos de receptores P1 (figura 4), acoplados a proteína G, chamados A1, A2A, A2B e A3 que se diferenciam quanto a função e distribuição tecidual (MORANDI et al., 2018). A ativação dos receptores A1 e A3 acarreta a liberação de íons de cálcio provenientes do espaço intracelular; já os receptores A2A e A2B ativam a adenilato ciclase ou a fosfolipase C (ANTONIOLI et al., 2013a). Os receptores A1, A2A e A3 são ativados por adenosina em concentrações basais, já o receptor A2B requer altas concentrações de adenosina para sua ativação (FREDHOLM, 2007). Em geral a ativação dos receptores A2A e A2B gera uma acumulação de cAMP intracelular, enquanto que a ligação da adenosina nos receptores A1 e A3 diminui a concentração de cAMP intracelular (FREDHOLM, 2007).

Após a interação com os receptores, a adenosina pode desencadear diferentes respostas celulares, com o objetivo de restaurar a homeostasia tecidual (ANTONIOLI et al., 2013a). A adenosina pode limitar a resposta imune e inflamatória para evitar danos nos tecidos, agindo como uma molécula imunossupressora capaz de inibir a função de diferentes células do sistema imune, incluindo linfócitos T e B (HOSKIN et al., 2008).

Os receptores A2A variam sua expressão nos subconjuntos de linfócitos T e podem regular a produção de citocinas em linfócitos T ativados (KOSHIBA et al., 1999). Esses receptores quando ativados inibem a proliferação de linfócitos T contribuindo para a manutenção do número normal de linfócitos *T naive* (CSÓKA et al., 2008), por outro lado sua ativação aumenta a formação de linfócitos Treg

(OHTA; SITKOVSKY, 2014). A adenosina inibe as respostas TCD8+ através da redução do influxo de Ca^{2+} , da produção de citocina (IL-2, IFN γ e TNF) e da citotoxicidade (RASKOVALOVA et al., 2006). A sinalização através de receptores A2A tem sido descrita como sendo capaz de inibir respostas autoimunes (OHTA et al., 2012). Em um modelo de lúpus a ativação de receptores A2A protegeu os rins através da supressão da infiltração de linfócitos T e por favorecer a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 (GARCIA et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

2.4 ECTOENZIMAS

O sistema imune é equipado com um conjunto diversificado de efetores celulares e não celulares que estão em contínua comunicação para proteger o organismo contra danos. ATP e adenosina constituem uma intrínseca parte da rede imunológica, possuindo importância na sinalização imune e inflamatória, a ação dessas moléculas durante a resposta imune e inflamatória vai depender da sua concentração extracelular, da expressão e ativação dos receptores purinérgicos e das ectoenzimas (BOURS et al., 2006).

As ectoenzimas são expressas por células imunes e não imunes e estão envolvidas na cascata purinérgica, controlando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares (BOURS et al., 2006). As ectoenzimas incluem a família da nucleosídeo trifosfato/difosfohidrolase (E-NTPDases; EC 3.6.1.5), a Ecto- 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) e a Ecto-Adenosina Desaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4) (YEGUTKIN, 2008).

2.4.1 Ecto-NTPDase

Os membros dessa família de proteínas são nucleotidases, ou seja, hidrolisam nucleotídeos extracelulares tri e/ou difosfatados (ATP/ADP) na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} com taxas de pH entre 7 e 8; o produto final dessa hidrólise é o AMP (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Oito diferentes membros dessa família já foram identificados e diferenciam-se de acordo com a localização celular e as propriedades funcionais. As E-NTPDase 1, 2, 3 e 8 são enzimas expressas na superfície das células e hidrolisam ambos nucleotídeos tri e difosfatados, as

NTPDases 4 e 7 tem localização inteiramente intracelular, já as NTPDases 5 e 6 exibem localização intracelular, porém podem ser secretadas (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). A marca característica de todas as NTPDases são 5 sequências de domínios altamente conservados, conhecidos como “regiões conservadas da apirase” (ACR1-5) (HANDA; GUIDOTTI, 1996), as quais estão envolvidas no ciclo catalítico (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

A E-NTPDase 1, é a mais investigada, conhecida como CD39 está firmemente ancorada à membrana via dois domínios transmembrana, os quais são importantes para a manutenção da atividade catalítica e especificidade com o substrato (GRINTHAL; GUIDOTTI, 2006). A atividade e expressão da CD39 sofre alterações dinâmicas de acordo com o contexto patofisiológico na qual está inserida, essas alterações podem modular o curso de diversas doenças como por exemplo as doenças autoimunes (DEAGLIO; ROBSON, 2011). A CD39 possui um papel anti-inflamatório, porque ela hidrolisa ATP/ADP a AMP, reduzindo o ATP pró-inflamatório em favor do aumento de ADP ou AMP que são precursores de adenosina anti-inflamatória; a quebra de ATP pela CD39 representa um importante mecanismo imunorregulatório (MANDAPATHIL et al., 2010).

A CD39 foi primariamente descrita como um marcador de ativação de linfócitos B, mas ela também está expressa em células natural killer, monócitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e subconjuntos de linfócitos T (DEAGLIO; ROBSON, 2011). E-NTPDase 1 é amplamente expressa na superfície de linfócitos Tregs e o aumento da atividade metabolizadora de ATP parece ser crítico para a atividade imunossupressora desses linfócitos (ERNST; GARRISON; THOMPSON, 2010). O aumento da atividade da CD39 permite a entrada de linfócitos Treg dentro de regiões inflamadas, onde reduz os níveis de ATP, diminuindo assim a morte de linfócitos Treg mediada por receptores P2 (ANTONIOLI et al., 2013b). Estudos mostram que os linfócitos Treg CD39+ conseguem suprimir a produção de IL-17 (FLETCHER et al., 2009a) e que a expressão da CD39 previne a conversão em linfócitos Th17 (DWYER et al., 2010).

Perda ou baixos níveis de CD39 em linfócitos Th17 tem sido descrito no contexto de algumas condições autoimunes, como doença autoimune do fígado, onde o defeito na CD39 e a prejudicada produção de adenosina favorece a persistência de linfócitos Th17 em um estado inflamatório (LIBERAL et al., 2016). Foi sugerido que CD39 contribui para a resposta de maturação da afinidade do

anticorpo e facilita a diferenciação do centro terminal de linfócitos B (DWYER et al., 2007).

Ao degradar ATP a CD39 assegura a produção de adenosina, aumenta a ação supressora de linfócitos Treg e impede a conversão dessas células em linfócitos Th17, suprimindo a produção de IL-17 (FLETCHER et al., 2009a); auxiliando na manutenção de uma razão Treg/Th17 equilibrada (KNIGHT et al., 2018). Ou seja, CD39 possui dois efeitos anti-inflamatórios: remoção de ATP pró-inflamatório e amplificação da geração de adenosina (BORSELLINO et al., 2007).

2.4.2 Ecto-5'-nucleotidase

Já foram isolados e caracterizados sete membros da 5'-nucleotidase, 5 são localizadas no citosol, 1 na matriz mitocondrial e 1 acoplado à membrana, esses membros diferem entre si através de propriedades moleculares e cinéticas, bem como pela sua especificidade pelo substrato (YEGUTKIN, 2008). A enzima E-5'-nucleotidase que está ancorada à superfície celular via glicosil fosfatidil inositol (GPI) possui seu domínio catalítico voltado para o meio extracelular e catalisa a hidrólise de AMP a adenosina e fosfato inorgânico (Pi). A E-5'-nucleotidase, também chamada de CD73, é expressa em uma variedade de tecidos, e de forma abundante em rins, fígado, pulmões, coração e cérebro (ZIMMERMANN, 1992), também encontra-se em monócitos, células natural killer e em subpopulações de linfócitos T e B (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). A CD73 é um clássico marcador da maturação de linfócitos, a qual é envolvido na sinalização intracelular, na proliferação e ativação de linfócitos (AIRAS, 1998).

A produção de adenosina extracelular a partir de AMP é considerada a maior função da CD73, a qual age como um ponto de controle na provisão extracelular dessa molécula (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). A CD73 é co-expressa com a CD39 em linfócitos Treg, e compreende um importante constituinte da maquinaria supressora via conversão de AMP, derivado da hidrólise de ATP/ADP, no mediador anti-inflamatório adenosina e subsequente inibindo a proliferação de linfócito T e secreção de citocinas (DEAGLIO et al., 2007).

As enzimas CD39 e CD73 são vistos como “interruptores imunológicos” que deslocam a atividade das células imunes pró-inflamatórias, impulsionadas pelo ATP,

em direção a um estado anti-inflamatório mediado pela adenosina (ANTONIOLI et al., 2013b).

2.4.3 Adenosina desaminase

A adenosina desaminase (ADA) catalisa a desaminação da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxinosina respectivamente. Esta enzima possui uma ampla distribuição nos tecidos humanos, como intestino, timo, baço e outros tecidos linfoides e não linfoides (VAN DER WEYDEN; KELLEY, 1976). Existem pelo menos 2 formas moleculares identificadas, ADA1 e ADA2 (UNGERER et al., 1992); a ADA1 é presente em praticamente todos os tecidos e é necessária para uma eficiente resposta imune (UNGERER et al., 1992), apresenta similar afinidade para ambos os substratos (adenosina e 2'-deoxiadenosina) (GAKIS, 1996). Já a ADA2 é a enzima predominante no soro (ZAVIALOV; ENGSTRÖM, 2005) e acredita-se que sua fonte seja o sistema monócito/macrófago (GAKIS, 1996).

O papel primário da ADA1 é eliminar derivados tóxicos intracelulares e proteger as células do apoptose; a ausência de ADA1 resulta na imunodeficiência combinada grave (SCID) (ZAVIALOV et al., 2010), a qual está associada ao decréscimo do número de linfócitos B e T circulantes devido ao acúmulo de produtos tóxicos derivados da adenosina (KALJAS et al., 2017). A ADA 2 é necessária para a diferenciação e homeostase de células imunes (KALJAS et al., 2017). A ADA pode interagir com proteínas ancoradas à superfície da célula, agindo como uma ectoenzima; dois tipos de proteínas de ancoragem foram identificadas, a dipeptidil-peptidase IV (CD26) e os subtipos de receptores para adenosina A1 e A2B (ANTONIOLI et al., 2012). Recente estudo determinou que a ADA1 se liga à linfócitos T e células natural Killer T (NKT), ou seja, células que expressam CD26; em contraste a ADA2 se liga a células que não expressam CD26 como neutrófilos, monócitos, linfócitos B e CD39⁺Treg (KALJAS et al., 2017).

A ADA1 ligada a CD26 na superfície do linfócito T efetor protege essa célula da adenosina extracelular, na ausência de ADA1 a adenosina reduz a proliferação de linfócitos T e a liberação de citocinas devido a ativação de receptores A2A (LINDEN; CEKIC, 2012). Durante a inflamação os níveis plasmáticos de ADA estão aumentados devido ao aumento dos níveis de adenosina, essa enzima também tem impacto na função dos linfócitos Treg, inibindo a ativação mediada por adenosina

nessas células (KALJAS et al., 2017). A ADA também possui um importante papel no sistema imunológico de uma forma não enzimática. Um sinal é gerado quando a ADA ligada a superfície das células dendríticas se liga a CD26 na superfície de linfócitos T, independente da atividade enzimática (PACHECO et al., 2005), aumentando a geração de linfócito T efetor (MARTINEZ-NAVIO et al., 2011).

2.5 E-NTPDASE, ECTO-5'-NUCLEOTIDASE E ADA ASSOCIADAS A IMUNIDADE

O sistema imune é fortemente regulado e integrado a uma rede celular com a função de preservar e restaurar a homeostasia (CRIMEEN-IRWIN et al., 2005). Porém, inapropriada ativação desse sistema pode acarretar em inaceitáveis níveis de dano tecidual e desenvolvimento de condições patofisiológicas, como doenças autoimunes (SITKOVSKY; OHTA, 2005). O sistema purinérgico é envolvido em muitas funções das células imunes, como por exemplo, interação entre células, secreção de citocinas e quimiocinas, remoção de patógenos intracelulares e geração de espécies reativas de oxigênio (JUNGER, 2011). Esse sistema é composto por nucleotídeos extracelulares, receptores e seu último componente as enzimas. As enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA regulam a resposta imune e inflamatória (ANTONIOLI et al., 2013b).

O ATP extracelular funciona como um sinal de perigo, ativando a resposta pró-inflamatória, a enzima CD39 remove esse nucleotídeo exibindo imediata influência imunomodulatória. Foi demonstrado que a CD39 é a principal ecto-nucleotidase expressa em macrófagos, e esta enzima pode modular a resposta celular, como a apoptose e liberação de IL-1 β e IL-18, através ativação do receptor P2X7 (LÉVESQUE et al., 2010). A capacidade da CD39 de modular a liberação de IL-1 acaba impactando também na ativação do inflamassomo (DEAGLIO; ROBSON, 2011). A E-NTPDase é essencial para resposta imune benéfica durante inflamação e infecção (MORANDINI; SAVIO; COUTINHO-SILVA, 2014).

A CD39 encontra-se alterada em doenças como esclerose múltipla (EM) (SPANVELLO et al., 2010), artrite reumatoide (AR) (JAQUES et al., 2013) e hepatite autoimune (HAI) (GRANT et al., 2014). No estudo de Spanevello *et al.* (2010) a atividade e expressão da CD39 em linfócitos de pacientes com EM está aumentada, sugerindo a participação dessa enzima na modulação da resposta

imune e inflamatória dessa doença (SPANVELLO et al., 2010). Já no trabalho de Fletcher *et al.* (2009) os pacientes com EM apresentam redução de linfócitos CD39⁺Treg o que acarretaria em descontrole da produção de IL-17, já que a CD39 diminui os níveis dessa citocina através da remoção de ATP (FLETCHER et al., 2009b).

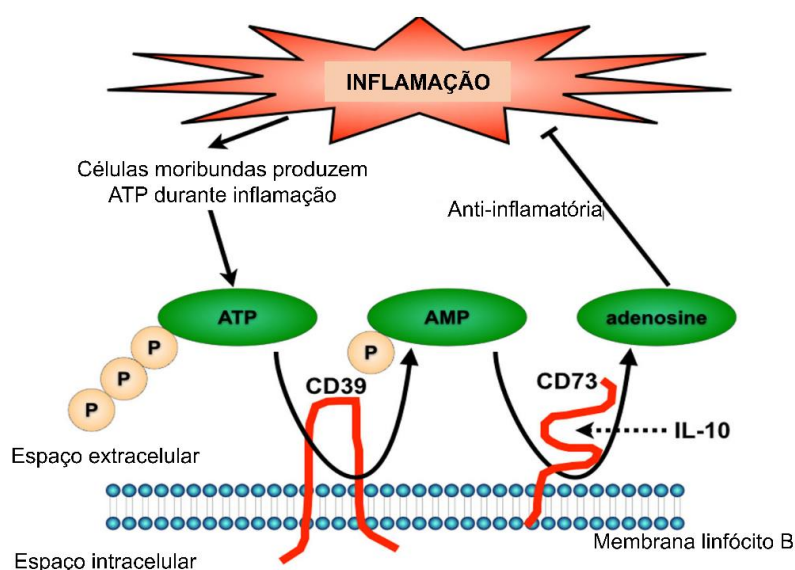
Em pacientes com HAI os linfócitos CD39⁺Tregs também estão diminuídos e disfuncionais; falhando na capacidade de limitar eficientemente a produção de IL-17, citocina pró-inflamatória que encontra-se elevada no soro de pacientes com HAI (GRANT et al., 2014). Os pacientes com AR apresentam aumento da atividade da CD39 em linfócitos periféricos, evidenciando um mecanismo para diminuir os níveis de ATP pró-inflamatório e aumentar os níveis de adenosina (JAQUES et al., 2013). Em pacientes com diabetes tipo 1 foi encontrado defeito na função supressora de Treg, devido à baixa expressão de CD39 nessas células (JIN et al., 2018).

Loza *et al.* (2011) analisaram os linfócitos CD39⁺Treg de pacientes com LES e revelaram que existe um defeito funcional nessas células. Este defeito teria um impacto funcional na regulação das células T e poderia representar um potencial biomarcador para LES (LOZA et al., 2011). Num estudo com modelo murino de lúpus, ratos nocaute para CD39 tiveram expansão do subconjunto de linfócitos Th17 (KNIGHT et al., 2018).

A enzima 5'-nucleotidase é classicamente um marcador de maturação de linfócitos, a qual está envolvida na sinalização intracelular, proliferação e ativação dessas células (AIRAS, 1998). Estudos também sugerem que esta enzima modula as funções de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (AIRAS, 1998) (ELTZSCHIG et al., 2004) (ZANIN et al., 2012). A importância da CD73 em gerar um ambiente rico em adenosina durante inflamação e infecção tem sido demonstrada (DEAGLIO; ROBSON, 2011; ANTONIOLI et al., 2013b; HASKÓ; PACHER, 2012).

Kaku *et al.* (2014) identificaram uma população de linfócitos B que expressam CD73, bem como CD39. Em um modelo de colite induzida por sulfato sódico de dextrana (DSS) os linfócitos CD73⁺B produzem adenosina na presença de substrato enquanto que os linfócitos CD73⁻B não, a transferência de linfócitos CD73⁺B melhorou a gravidade da colite sugerindo que linfócito B CD73/CD39/adenosina pode modular a colite induzida por DSS, os resultados também indicaram que a IL-10 é um regulador positivo da expressão da CD73 em linfócitos B (figura 5) (KAKU et al., 2014).

Figura 5. Modelo anti-inflamatório mediado por linfócito B através de CD73/adenosina.



(Adaptado de KAKU *et al.*, 2014)

Em um trabalho de artrite induzida por colágeno (CIA) os ratos deficientes de CD73 foram mais suscetíveis a CIA do que os ratos do tipo selvagem; deficiência de CD73 resultou em aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias nas articulações, aumentando a resposta Th1 e a destruição das articulações (CHROBAK *et al.*, 2015). O estudo de Blume *et al.* (2012) demonstrou que a falta crônica de CD73 acarreta em nefrite e glomerulonefrite autoimunes, com subsequente lesão renal (BLUME *et al.*, 2012).

Stolk *et al.* (1999) avaliaram a atividade da 5'-nucleotidase em linfócitos de pacientes com LES, a qual estava reduzida em relação aos controles o que pode acarretar no acúmulo de nucleotídeos de purina e redução da produção de adenosina, fatores estes que podem desempenhar papel na inflamação e cronicidade da doença (STOLK *et al.*, 1999). No trabalho de Dong-mei *et al.* (2010) foi avaliada a expressão da CD73 em linfócitos Treg de pacientes com LES, a qual estava reduzida reforçando que esta enzima poderia participar da patogênese da doença (DONG-MEI *et al.*, 2010).

A ADA é uma enzima chave no metabolismo das purinas (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004), e possui crítico papel na função, maturação e manutenção das respostas imunes (HASKÓ; CRONSTEIN, 2013). Regulação positiva da ADA pode favorecer a resposta imune Th1 através da evasão da sinalização supressora da

adenosina; em contraste a regulação negativa dessa enzima pode ser associada com uma resposta do tipo Th2 anti-inflamatória (BOURS et al., 2006).

Em pacientes com EM a atividade da adenosina desaminase em linfócitos T encontra-se diminuída em relação ao controle, sugerindo que esse baixo nível de atividade dessa enzima poderia ser relacionado com as persistentes anormalidades na função dos linfócitos T no curso clínico da EM (VIVEKANANDHAN et al., 2005). O trabalho de Polachini *et al.* (2014) encontrou aumento na atividade da ADA no soro de pacientes com EM, sugerindo que esta enzima é importante no status inflamatório observada nessa patologia (POLACHINI et al., 2014).

Vinapamula *et al.* (2015) analisaram a atividade da ADA no soro de pacientes com AR e concluíram que o aumento da atividade dessa enzima, nesses pacientes, poderia ser considerado um marcador de inflamação (VINAPAMULA et al., 2015). Já Zamani *et al.* (2012) determinaram a relação entre a atividade da ADA no soro e a atividade da doença e concluíram que essa enzima poderia ajudar a prever a atividade da doença em AR (ZAMANI; JAMALI; JAMALI, 2012).

Saghiri *et al.* (2010) avaliaram a atividade da ADA total e suas isoenzimas no soro de pacientes com LES, os resultados mostraram que a ADA total está aumentada em comparação aos controles, este aumento está correlacionado principalmente com a ADA2 (SAGHIRI et al., 2012). Taysi *et al.* (2002) também encontraram o mesmo resultado, aumento da ADA total em soro de pacientes com LES proveniente do aumento da ADA 2; o que poderia ser correlacionado com o status clínico da doença (TAYSI et al., 2002).

3 ARTIGO E MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de um artigo e um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se compondo o próprio artigo e junto com o manuscrito de revisão representam a íntegra deste estudo.

O artigo intitulado “Activity and expression of E-NTPDase is altered in peripheral lymphocytes of systemic lupus erythemathosus patients” foi publicado na revista **Clinica Chimica Acta**, e abrange os objetivos específicos de avaliação da atividade e expressão da E-NTPDase, determinação da expressão da E-5'-nucleotidase e determinação da atividade da E-ADA em linfócitos de pacientes com LES; bem como a quantificação de nucleotídeo e nucleosídeo e a atividade da ADA no soro desses pacientes.

O manuscrito intitulado “ATP signaling and NTPDase in Systemic Lupus Erythemathosus (SLE) ” o qual está submetido para a revista **Immunobiology** tem como objetivo elucidar os efeitos do ATP na modulação do processo inflamatório e resposta imune via receptores P2, bem como o papel da NTPDase na imunopatogênese do LES.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca

Activity and expression of E-NTPDase is altered in peripheral lymphocytes of systemic lupus erythematosus patients



Lara Vargas Becker^{a,*}, Renata da Silva Pereira Saccol^b, Vera Maria Morsch^a, Daniela B.R. Leal^b, Emerson André Casali^c, Nina Gabriela Müller Lopes^c, Valesca Veiga Cardoso^{c,d}, Maria Rosa C. Schetinger^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Laboratório de Estudos Sobre as Alterações Celulares e Teciduais, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

^d Laboratório de Toxicologia e Mutagênese, Centro de Pesquisa, Centro Universitário Metodista IPA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Systemic lupus erythematosus
E-NTPDase
E-ADA
E-5'-nucleotidase
Lymphocytes

ABSTRACT

Background: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory autoimmune disease, where there is irreversible breakdown of immunological self-tolerance. Extracellular adenosine triphosphate (ATP) and adenosine are signaling molecules that play an important part in the immune response. During inflammation and the immune response, a group of enzymes control these molecules, including ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), E-5'-nucleotidase, and ecto-adenosine deaminase (E-ADA). We determined the activity and expression of E-NTPDase, the expression of E-5'-nucleotidase, the activity of E-ADA in lymphocytes and serum of SLE patients.

Methods: This study involved 35 patients with SLE and 30 healthy subjects as a control group. E-NTPDase activity and expression were increased in lymphocytes from SLE patients (31% and 37% for activity and expression, respectively) compared with the control group.

Results: An approximately 42% increase in E-ADA activity in lymphocytes was observed in SLE patients compared with the control group, in serum the ADA activity was decreased by 57% in SLE patients. Expression of E-5'-nucleotidase was not changed in SLE patients.

Conclusions: E-NTPDase and E-ADA perform key functions in the modulation of the immune and inflammatory response in SLE.

1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic multisystem autoimmune disease; its course is unpredictable and progresses to acute flares (relapses) and periods of remission. The pathogenesis of SLE is characterized by impaired immune tolerance and autoantibody production [1]. Autoantibodies contribute to SLE through the formation of immune complexes and by interference with intracellular functions [2]. It is accepted that tissue injury results from the production of autoantibodies that combine with self-antigens to form immune complexes that drive inflammation and cellular damage [3]. B lymphocytes participate in the immune deregulation of SLE through the production of

divers autoantibodies against soluble and cellular constituents, most commonly against intranuclear antigens [4]. T lymphocytes regulate B lymphocyte function and the production of pathogenic autoantibodies. T and B lymphocyte abnormalities have been described in SLE and their interaction are important in disease progression [1].

Purinergic signaling is involved in regulation of the inflammatory and immune responses. Under conditions of stress or injury, extracellular nucleotides such as ATP work as endogenous signaling molecules and parenchymal or immune cells release large amounts of ATP together with other nucleotides [5]. The role of ATP in the immune system is complex; however, it is known that in high concentrations, ATP is involved in the pro-inflammatory response via stimulation of

* Corresponding authors at: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 18, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail addresses: laravbecker@gmail.com (L.V. Becker), mariachitolina@gmail.com (M.R.C. Schetinger).

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.032>

Received 13 June 2018; Received in revised form 26 September 2018; Accepted 24 October 2018

Available online 25 October 2018

0009-8981/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

lymphocyte proliferation and the release of pro-inflammatory cytokines [6]. Adenosine safeguards the maintenance of tissue integrity, facilitating Th2 pathways and inhibiting Th1 cell function [7].

The effects of nucleotides and their nucleoside derivative, adenosine, are mediated via a series of purinergic receptors which are expressed on immune cells surfaces, the P1 and P2 receptors, which are activated by adenosine and ATP, respectively, and intermediate the immunomodulatory effects of purines [8].

Extracellular adenine nucleotides and the nucleoside adenosine are controlled during inflammation and the immune response by a group of ectoenzymes expressed in immune cells [5]. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases; EC 3.6.1.5) are a group of enzymes capable of hydrolyzing nucleotide tri- and/or diphosphates to adenosine monophosphate (AMP). Eight subtypes of E-NTPDase are known, and E-NTPDase-1, which is known as CD39, plays a critical role in modulating the effect of ATP in inflammation. E-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), also known as CD73, hydrolyzes AMP to adenosine and is involved in immunomodulation and inflammatory processes [9]. Ecto-adenosine deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), which irreversibly catalyzes the deamination of adenosine and 2'-deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine, is considered a key enzyme in the purine metabolism [10].

Given that SLE is an inflammatory and autoimmune disorder and that the purinergic system modulates the immune system and regulates pro- and anti-inflammatory events, this study determined the activity and expression of E-NTPDase, the expression of E-5'-nucleotidase, the activity of E-ADA in lymphocytes as well as the activity of ADA in serum of SLE patients.

2. Patients and methods

2.1. Chemicals

The reagents ATP, ADP, AMP, adenosine, Trizma base, sodium azide, and Coomassie Brilliant Blue G was bought from Sigma Chemical Co. The other reagents used in this experiment were of the highest purity.

2.2. Patients and samples

The population consisted of 35 SLE patients (SLE group), selected from the University Hospital of Santa Maria (HUSM), and 30 healthy subjects as a control group. The diagnosis of SLE was based on the Systemic Lupus Collaborating Clinics classification criteria (SLICC) [11]. For some statistical analysis, the SLE group was subdivided into remission (patients with resolution of clinical symptoms, normalization of laboratory results, and minimal maintenance of therapy) and relapse (patients with an increase in disease activity, requiring intensification of therapy). Subjects with hypertension, diabetes mellitus, alcoholism, cigarette smoking, and other autoimmune diseases were excluded from the work. Blood samples were collected in vacutainer tubes with EDTA as anticoagulant (for lymphocyte analyzes) and tubes without anticoagulant (for serum analysis). Ten milliliters of blood was collected from each subject and used for peripheral lymphocyte separation and other analyses. The same process was carried out for the control group. The study was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria, Brazil. All subjects provided written informed consent to participate in the study.

2.3. Isolation of lymphocytes-rich mononuclear cells from human blood and protein determination

Lymphocytes-rich peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from peripheral human blood by centrifugation on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [12]. The whole blood was diluted with 0.9% NaCl solution and added over 3 ml of

Ficoll-histopaque and then centrifuged at 1800 rpm for 30 min at room temperature. After centrifugation, the cells were gently collected from the interface formed above the Ficoll-Hypaque into another conical tube. Ten ml of 0.9% NaCl solution were then added to the samples and centrifuged for a further 10 min at 1500 rpm. Then the supernatant was discarded and 5 ml of hemolytic buffer EDTA-ammonium chloride was added to the pellet and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. Again the supernatant was discarded and then 0.9% NaCl solution added and centrifuged at 1200 rpm for 10 min. After removal of the supernatant, 1 ml of 0.9% NaCl solution was added and centrifuged for another 5 min at 1000 rpm. The pellet was homogenized with 0.9% NaCl solution to the required concentration of cells. The percentage of lymphocytes was > 93% as previously determined [13]. It was used serum albumin as standard to the measurement of proteins by the Coomassie Blue method [14].

2.4. E-NTPDase activity determination

After lymphocytes isolation, E-NTPDase activity was determined as previously described [16] with a reaction medium composed of 0.5 mmol/l CaCl₂, 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 60 mmol/l glucose and 50 mmol/l Tris- HCl buffer at pH 8.0 until reaching a volume of 200 µl. Twenty µl of the PBMCs were resuspended in a solution of 0.9% of NaCl and added to the reaction (2–4 µg of protein) and pre-incubated at 37 °C for 10 min, and incubation continued for 70 min. Substrate ATP or ADP at a final concentration of 2.0 mmol/l was added to start the reaction and 200 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to stop the reaction. The produced inorganic phosphate (Pi) was measured by a method previously described [17] using malachite green and KH₂PO₄ (as standard). The enzyme preparation was only added to the controls after the addition of TCA for correction of non-enzymatic nucleotide hydrolysis. Samples were taken in triplicate with enzyme activity reported in nmol of Pi released/min/mg protein.

2.5. E-ADA activity determination

The analysis of ADA activity, both in serum and lymphocytes, was performed using Guisti et al. method [18], which is based on measurement of the formation of ammonia released when ADA deaminates adenosine. The reaction used 25 µl of lymphocyte suspension or 50 µl of serum, was mixed to 21 mmol/l of adenosine, pH 6.5, and incubated at 37 °C for 1 h. Phenol, 106.2 mmol/l and 167.8 nmol/l sodium nitroprussiate and hypochlorite solution was added to stop the reaction. For the standard was used ammonium sulfate of 75 µmol/l. All samples were run in triplicate and ADA activity was shown in nmol NH₃/min/mg protein for lymphocytes and U/l for serum.

2.6. CD39 and CD73 expression on lymphocytes

E-NTPDase (CD39) and E-5'-Nucleotidase (CD73) expressions were assessed by flow cytometry. The cells were then incubated with anti-CD39, anti-CD73 and anti-CD45 and were analyzed by flow cytometry using the BD Accuri C6 flow cytometer. The antibodies used were: CD45 (Fluorophore- PerCP; Ab-clone- MEM-28; Company- Exbio), CD73 (Fluorophore- FITC; Ab-clone- AD2; Company- BD Pharmingen), CD39 (Fluorophore- PE; Ab-clone- TU66; Company- BD Pharmingen). Percentage of positive cells represented the results.

2.7. Analysis of purine levels in serum

The quantification of serum purine levels was performed by high pressure liquid chromatography (HPLC). The serum proteins were denaturated by 0.6 mol/l perchloric acid. All samples were then centrifuged (16,000 x g for 10 min at 4 °C), supernatants were neutralized with 4.0N KOH, after a second centrifugation was performed (16,000 x g for 30 min at 4 °C). The supernatants were collected and centrifuged

once more (16,000 x g for 30 min at 4 °C). Aliquots of 20 µl were introduced to a reversed-phase HPLC (LC-20AT model, Shimadzu) using a C₁₈ column (Ultra C18, 25 cm × 4.6 mm × 5 µm, Restek) at 260 nm with a mobile phase containing 60 mmol/l KH₂PO₄, 5 mmol/l tetrabutylammonium chloride in 30% methanol according to Voelter et al. [15]. The peaks were identified by their retention times and quantification by comparison with standards. Results are expressed as nmol compound/ml serum.

2.8. *In vitro* effects of drugs used in the treatment of patients with SLE on activity of enzymes E-NTPDase and E-ADA

The *in vitro* effects of prednisone, methotrexate, hydroxychloroquine and azathioprine on E-NTPDase and E-ADA activities were evaluated. Isolated lymphocytes from 3 healthy donors per treatment were incubated (for 80 min for NTPDase activity and 90 min for E-ADA activity) with different concentrations of these drugs in the medium reaction. The concentrations of drugs used *in vitro* represent the mean plasma values of the medication [16].

2.9. Statistical analysis

Normality of data was evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test. The data were analyzed using unpaired Student's *t*-test or Mann-Whitney test (when data were not normally distributed) for comparisons between 2 groups and 1-way analysis of variance (for comparisons among three or more groups) followed by Dunnett's multiple comparisons test. The results were given as mean ± standard error of the mean (mean ± SEM) or median ± interquartile range and values of *P* < 0.05 were considered significant. Pearson's test correlation analysis was used to evaluate the correlation.

3. Results

3.1. General characteristics of the patients

The samples consisted of 35 SLE patients of both sexes (2 men, 33 women; 38.88 ± 12.64 y) and the group control consisted of 30 healthy subjects (4 men, 26 women; 27.34 ± 5.90 y). Table 1 shows the general characteristics and pharmacological treatments in patients

Table 1
General characteristics and pharmacological treatments in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and Controls.

	SLE Patients (n = 35)	Controls (n = 30)
Age (y) ^a	38.88 ± 12.64	27.34 ± 5.90
Gender (Female/male)	33/2	26/4
Current Therapy		
PRED	1(2.85%)	-
PRED+MTX	2(5.71%)	-
PRED+HCQ	8(22.85%)	-
PRED+AZA	1(2.85%)	-
PRED+AZA + HCQ	7(20%)	-
PRED+HCQ + MTX	7(20%)	-
HCQ	3(8.57%)	-
HCQ + MTX	3(8.57%)	-
HCQ + AZA	1(2.85%)	-
MTX	1(2.85%)	-
NONE	1 (2.85%)	30(100%)
Phase ^b		
Remission	20	-
Relapse	15	-
ANA + ^b	34(97.14%)	-

^a Continuous variables are presents as means ± SD, PRED- Prednisone, MTX- Methotrexate, HCQ- Hydroxychloroquine, AZA- Azathioprine, NONE- no treatment.

^b Number SLE patients recruited.

Table 2

General characteristics and pharmacological treatments in patients SLE remission and SLE relapse.

	SLE Remission n = 20	SLE Relapse n = 20
Age (y) ^a	40 ± 13.43	37.4 ± 1.13
Gender (Female/male) ^b	19/1	14/1
Current Therapy ^b		
PRED	-	1
PRED+MTX	1	1
PRED+HCQ	4	4
PRED+AZA	-	1
PRED+AZA + HCQ	3	4
PRED+HCQ + MTX	6	1
HCQ	3	-
HCQ + MTX	1	2
HCQ + AZA	1	-
MTX	-	1
NONE	1	-
Immunological Criteria		
Anti-dsDNA ^b		
Positive	2	5
Negative	5	2
No data	13	8
Anti-sm ^b		
Positive	1	6
Negative	7	2
No data	12	7

PRED- Prednisone, MTX- Methotrexate, HCQ- Hydroxychloroquine, AZA- Azathioprine, NONE- no treatment.

^a Continuous variables are presents as means ± SD.

^b Number SLE patients recruited.

with SLE and controls. The characteristics of the 2 groups of patients SLE in remission and relapse are shown in Table 2.

3.2. E-NTPDase activity

The results obtained for ATP and ADP hydrolysis are shown in Fig. 1, demonstrating that E-NTPDase activity in lymphocytes was altered in patients with SLE. ATP hydrolysis was increased in the SLE patient group compared with the control group (40.30 ± 3.25 vs. 30.85 ± 2.4 nmol Pi released/min/mg of protein, respectively) (*P* < 0.05) (Fig. 1A). The same behavior was observed with ADP hydrolysis (42.94 ± 4.56 and 30.90 ± 1.95 nmol Pi released/min/mg of protein for patients and controls, respectively) (*P* < 0.05) (Fig. 1B).

Fig. 1C–D shows ATP and ADP hydrolysis in lymphocytes of SLE patients in remission and in relapse, respectively. Significant differences in the E-NTPDase activity (with ATP as a substrate) were not observed in the SLE remission group compared with the relapse group (41.31 ± 4.06 vs. 38.95 ± 5.47 nmol Pi released/min/mg of protein, respectively) (Fig. 1C). In addition, results obtained for lymphocyte E-NTPDase activity with ADP as a substrate are shown in Fig. 1D, where ADP hydrolysis did not differ in the SLE remission group (44.20 ± 6.32 nmol Pi released/min/mg of protein) compared with the SLE relapse group (41.26 ± 6.75 nmol Pi released/min/mg of protein).

3.3. CD39 and CD73 expression in lymphocytes

NTPDase1/CD39 expression was increased in SLE patients (15.20 ± 1.38% of CD39⁺ lymphocytes) compared with the control group (11.09 ± 0.79% of CD39⁺ lymphocytes) (Figs. 2A and 3; *P* < 0.05). Significant differences in CD73 expression were not found in the SLE group (38.44 ± 3.91% of CD73⁺ lymphocytes) compared with the control group (37.31 ± 2.58% of CD73⁺ lymphocytes) (Fig. 2B).

Fig. 2C shows NTPDase/CD39 expression in lymphocytes of patients

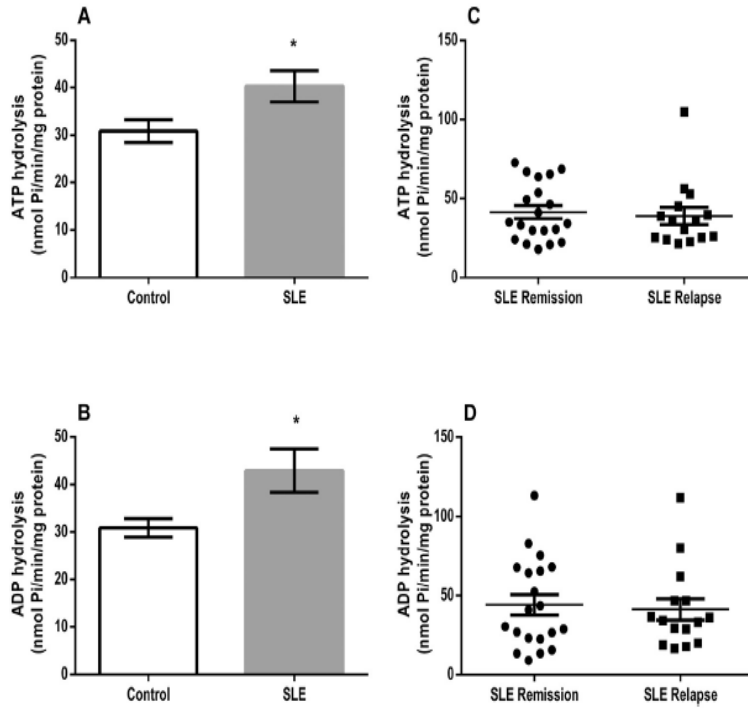


Fig. 1. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) activity [hydrolysis of ATP (A) and ADP (B)] in lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) patients and the control group. * $P < 0.05$, $n = 30-35$. E-NTPDase activity [hydrolysis of ATP (C) and ADP (D)] in lymphocytes of SLE patients during 2 different phases of the disease (remission and relapse). $n = 15-20$. Specific enzyme activities were reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Variables were expressed as mean \pm SEM. (A, B, C and D) Student's t -test for independent samples was used for the analyses.

with SLE in remission and in relapse. Significant differences in CD39 expression were not found in the SLE remission group ($12.7 \pm 0.94\%$ of $CD39^+$ lymphocytes) compared with the SLE relapse group ($16.45 \pm 1.86\%$ of $CD39^+$ lymphocytes). Fig. 4A-B shows a statistically positive correlation between CD39 expression and the E-NTPDase activity (both ATP e ADP hydrolysis), $P < 0.01$.

3.4. E-ADA activity lymphocytes

Fig. 5A shows the E-ADA activity in lymphocytes of SLE patients. Adenosine deamination was higher in SLE patients compared with the control group (36.80 ± 4.15 vs. 25.98 ± 2.73 nmol NH_3 /min/mg protein, respectively, $P < 0.05$). Statistically significant differences in E-ADA activity were not found in the SLE remission group compared

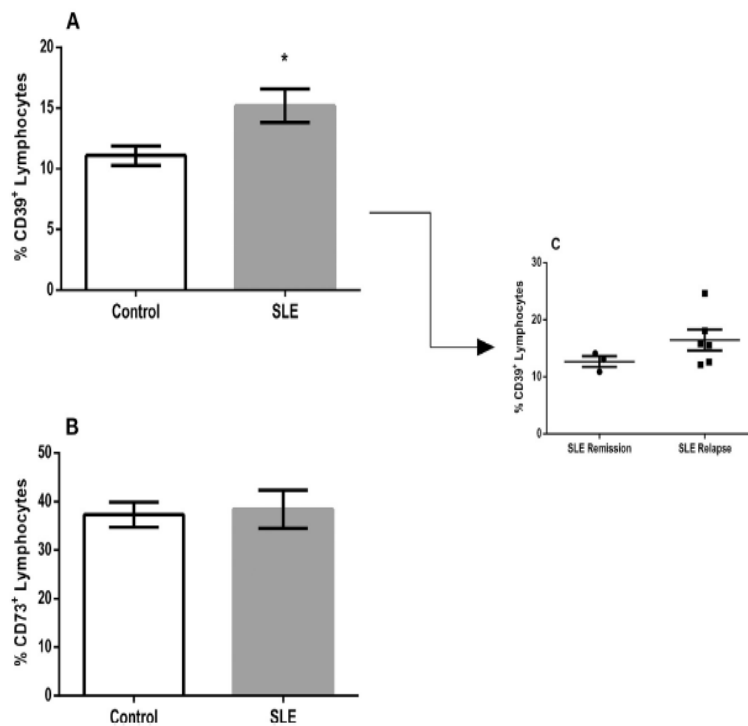


Fig. 2. Expression of CD39 (A) and CD73 (B) in lymphocytes from SLE and control subjects. * $P < 0.05$, $n = 9$. (C) Expression of CD39 in lymphocytes of SLE patients in remission and relapse. $n = 3-6$. Expression was reported as a percentage of lymphocytes expressing the surface marker (CD39 or CD73). Variables were expressed as mean \pm SEM. Student's t -test for independent samples was used for all analyses.

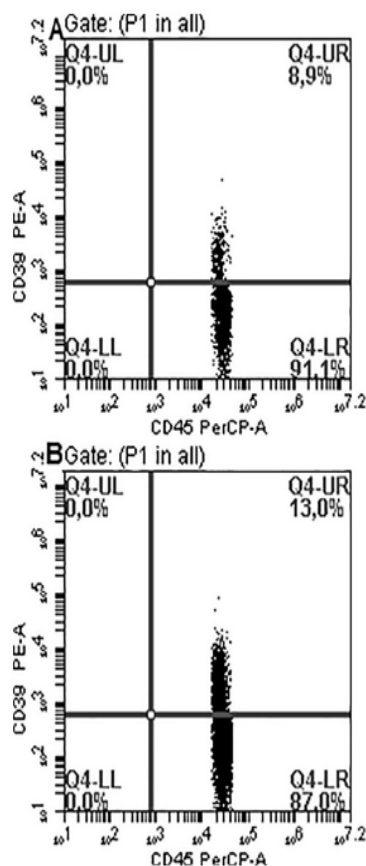


Fig. 3. CD39 expression was analyzed in gated CD39⁺ CD45⁺ cells. The percentage of CD39⁺ cells in the CD45⁺ cell population is indicated for healthy control (A) and SLE subjects (B). Cells were analyzed by flow cytometry.

with the SLE relapse group (37.91 ± 4.68 vs. 37.27 ± 8.33 nmol NH₃/min/mg protein, respectively) (Fig. 5B).

3.5. ADA activity serum

Adenosine deamination in serum was reduced in SLE patients compared with the control group (54.77 ± 25.04 vs. 103.9 ± 58.18 U/l, respectively, $P < 0.001$) (Fig. 5C). Statistically significant differences in ADA activity were not found in the SLE remission group compared with the SLE relapse group in serum (55.29 ± 20.1 vs. 52.55 ± 38.93 U/l, respectively) (Fig. 5D).

3.6. Purine levels measurement

The purine levels in the serum are shown in the Table 3. The concentration of ATP was increased in SLE patients compared with the control (2.35 ± 0.42 vs. 1.15 ± 0.25 nmol/ml, respectively, $P < 0.05$). ADP levels are also increased in the SLE group in relation to the control group (0.45 ± 0.22 vs. 0.00 ± 0.00 nmol/ml, respectively, $P < 0.05$). The concentration of the adenosine in serum was lower in the SLE group compared to the control (0.77 ± 0.22 vs. 2.39 ± 0.69 nmol/ml, respectively, $P < 0.05$). Significant differences in inosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid were not found in the SLE group when compared with the control group.

3.7. Effects of drugs used in the treatment of SLE on E-NTPDase and E-ADA activities

The drugs were tested combined in the same way as the patients used, and each medication was tested in three different concentrations, which were: methotrexate (0, 0.0001, 0.001, and 0.01 mM), prednisone (0, 0.0002, 0.002, and 0.02 mM), hydroxychloroquine (0, 0.000014, 0.00014, and 0.0014 mM), and azathioprine (0, 0.0003, 0.003, and 0.03 mM). The results demonstrate that E-NTPDase and E-ADA activities were not altered by the presence of the medications at the above concentrations (data not shown).

4. Discussion

SLE is characterized by hyperactive and hyperresponsive B and T lymphocytes, which initiate and propagate the disease. Both types of immune cells act together to produce pathogenic autoantibodies. The disease is more frequent in women and most commonly described in the third and fourth decades of life [17], which is consistent with our results in terms of gender and age.

Autoantibodies form immune complexes that drive organ inflammation. The elevation in serum antinuclear antibody (ANA) levels is crucial in the process of SLE development and can be identified months to years preceding the onset of the disease [18]. According to the literature, 97.14% of patients with SLE present as ANA-positive [19].

Extracellular ATP is an important immune modulator that can be promptly released with other cellular components following stress or injury. In the immune system, ATP functions as an indicator of tissue destruction [20]. Extracellular ATP acts on inflammatory responses by binding to purinergic P2 receptors, which are expressed by almost all cell types, including cells of the immune system [21]. ATP levels can be regulated during inflammatory and immune responses by ectoenzymes [5].

In this context, we evaluated the role in lymphocytes of the enzymes E-NTPDase and E-ADA of SLE patients to improve our understanding of this disease. The results of this work showed that the E-NTPDase activity (using both ATP and ADP as substrates) and expression were increased in lymphocytes from patients with SLE and found a positive correlation between the activity of NTPDase (ATP and ADP hydrolysis) and the expression of CD39. Several studies have shown that E-NTPDase plays a role in the immune response and alterations in its activity have been reported in some diseases of autoimmune origin such as multiple sclerosis [22], diabetes [23], and rheumatoid arthritis (RA) [24].

The anti-inflammatory effects of E-NTPDase occur through 2 different mechanisms: either by removing the proinflammatory ATP or concomitantly generating immunosuppressive adenosine. Jaques et al. [24] demonstrated that E-NTPDase activity (using both ATP and ADP as substrates) was increased in lymphocytes from patients with RA, consistent with our results.

CD39 (E-NTPDase) expression is upregulated in activated T lymphocytes, indicating that it plays an important role in immune modulation and participates in the inflammatory response. This also suggests that CD39 could help reduce the immune response [25]. Based on our results, we suggest that there is an increase in ATP in the extracellular medium (Table 3), and the increased E-NTPDase activity and expression represent a compensatory mechanism to help control inflammation in SLE patients, attenuating the inflammatory effects and restoring balance. In the study of Moncrieffe et al. [26], the expression of CD39 was increased in inflammatory synovial T cells in human juvenile idiopathic arthritis, indicating an immunomodulatory mechanism dependent on ATP hydrolysis. Similarly, Herrath et al. [27] found that CD39 expression was increased in both CD4⁺ T cell and FOXP3⁺ regulatory T (Treg) cells in patients with RA, indicating that inflammation influenced CD39 expression. However, Loza et al. [28]

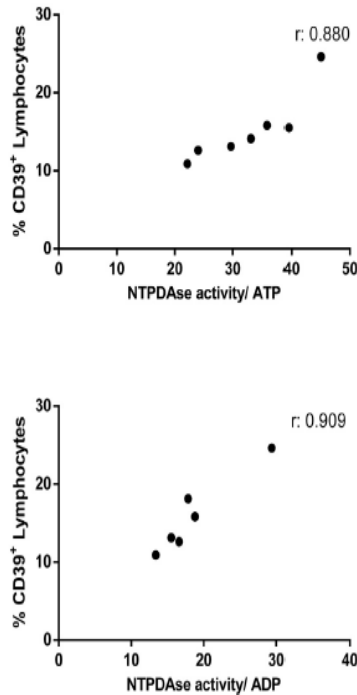


Fig. 4. Pearson's correlation analysis between % of CD 39 positive cells and E-NTPDase activity (ATP (A) and ADP (B) hydrolysis). $P < 0.05$.

showed decreased CD39 expression in Treg cells from SLE patients, demonstrating a defect restricted to this subset of cells. In relation to the nucleotide dosage, our results showed that the SLE group had an increase in the ATP level in relation to the control group, which may be due to the increase of the ATP release by the cells during inflammation. Although serum ADA is decreased, the reduced level of adenosine could be due to increased E-ADA activity in lymphocytes seen in this work. In

Table 3

Purine level measurement.

	Controls (nmol/ml)	SLE Patients (nmol/ml)
ATP	1.15 ± 0.25	2.35 ± 0.42*
ADP	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.22*
AMP	12.77 ± 1.3	9.45 ± 0.61
Adenosine	2.39 ± 0.69	0.77 ± 0.22*
Inosine	1.19 ± 0.46	0.74 ± 0.47
Hypoxanthine	8.36 ± 0.77	6.94 ± 1.10
Xanthine	4.34 ± 0.48	3.75 ± 0.62
Uric acid	109.5 ± 14.96	78.27 ± 14.15

Results are expressed as mean ± SEM, n = 4–10. Student's *t*-test for independent samples was used for all analyses, * $P < 0.05$.

addition, levels of AMP, inosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid did not show differences between the SLE and control groups.

We also evaluated E-NTPDase activity and expression in SLE patients during 2 phases of the disease: remission and relapse. In the current study, no significant differences were detected between the different subgroups of SLE in terms of E-NTPDase activity and expression. While there is still a lack of consensus on the criteria for defining SLE remission [29], a widely used definition is that patients in remission present resolution of clinical symptoms, normalization of laboratory results, and minimal maintenance of therapy. Yurasov et al. [30] concluded that patients in remission still exhibited increased numbers of autoantibodies and persistent abnormalities in tolerance, demonstrating that this imbalance is, in part, independent of the stage of disease. Therefore, both groups still exhibit autoantibodies and defects in tolerance which may explain the lack of differences between SLE in remission and in relapse.

We did not evaluate the activity of E-5'-nucleotidase in this study because the sensitivity of the colorimetric method used does not allow determination of enzyme activity. However, we evaluated the expression of CD73 in SLE patients and surprisingly, statistically significant differences were not found between SLE patients and the control group. In a study conducted by Dong-mei et al. [31], 5'-nucleotidase expression was decreased in Treg cells in SLE patients; however, subsets of lymphocytes were not separated in the current study. Stolk et al. [32]

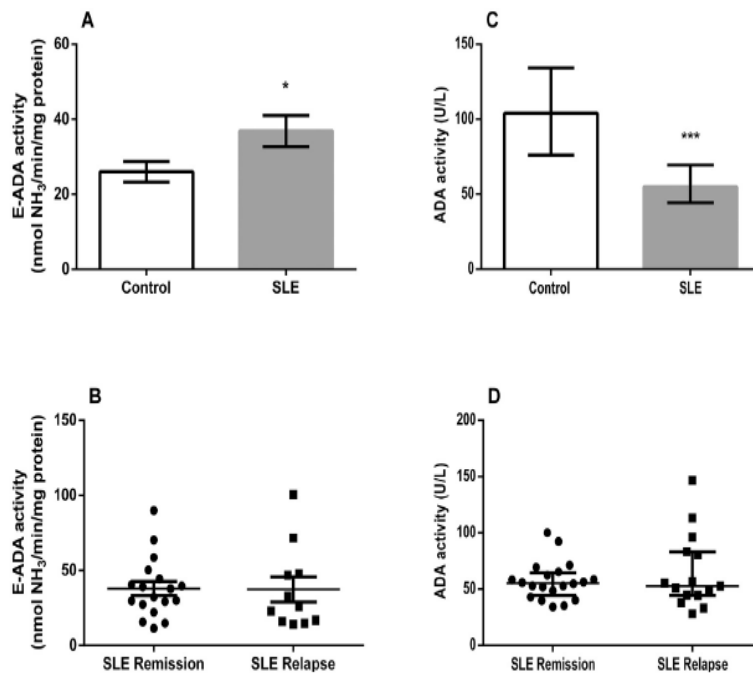


Fig. 5. Ecto-adenosine deamination in lymphocytes of control group and patients with SLE (A). * $P < 0.05$, n = 28–30 (SLE). (B) E-ADA activity in lymphocytes of SLE patients during 2 different phases of the disease (remission and relapse). n = 11–18. Variables were expressed as mean ± SEM. Student's *t*-test for independent samples. (C) ADA activity in serum of control group and patients with SLE. *** $P < 0.001$, n = 30–35. (D) ADA activity in serum of SLE patients during 2 different phases of the disease (remission and relapse). n = 15–20. Variables were expressed as median ± interquartile range, Mann-Whitney test. Enzyme activities were reported as nmol NH₂/min/mg of protein in lymphocytes and U/L in serum.

demonstrated that the 5'-nucleotidase activity of lymphocytes was decreased in SLE patients, suggesting that purine metabolism in SLE might be disturbed.

Adenosine represents a powerful mechanism that orchestrates the inflammatory responses and ensures protection against tissue damage [33]. Upon its release, adenosine acts as a natural brake on immune cell function, limiting the inflammatory response, via activation of adenosine receptors (P1) [10]. Adenosine plays a central role in modulation of the lymphocyte response, decreasing interleukin (IL)-2, IL-4, and interferon- γ secretion through A_{2A} receptor activation [34], which contributes to the resolution of inflammation by facilitating Th2 pathways and inhibiting Th1 cell function [7]. The extracellular concentration of adenosine may be regulated by E-ADA, which converts adenosine to inosine [35]. In this context, E-ADA represents an important checkpoint to downregulate extracellular adenosine levels and serves to attenuate its immunosuppressive signaling [36]. The present study demonstrated that E-ADA activity was higher in lymphocytes from SLE patients. Alterations in E-ADA activity in lymphocytes of patients with multiple sclerosis [22], RA [24], and sickle cell anemia [37] have been previously demonstrated.

Hitoglou et al. [38] showed increased E-ADA activity in lymphocytes from SLE patients in the active phase, showing that E-ADA can be used as another biochemical approach for the pathophysiology evaluation of the disease. Downregulation of E-ADA may be associated with a greater anti-inflammatory Th2-like response, as upregulation may favor the Th1 immune response [39]. The ratios of Th1/Th2 cytokines are elevated in SLE [40]. Based on our results, we suggest that increased E-ADA activity may contribute to the inflammatory state present in SLE patients. We evaluated E-ADA activity in SLE patients during 2 different phases of the disease: remission and relapse. No significant differences were detected between the different subgroups of SLE.

ADA has a wide distribution in human tissues which could indicate its involvement in different diseases, many immune imbalances can be associated with altered ADA activity in the serum [41]. So in the present study we determined ADA activity in serum in SLE patients and control group. The results found revealed a decreased ADA activity in serum from SLE patients. Our data contrast with the results of the work Stancikova et al. [42] and Saghiri et al. [41] who found that ADA activity was higher in serum from SLE patients. The principal isoenzyme in serum is ADA-2, and the major source this isoenzyme are macrophages [43], which are able to release the enzyme into the surrounding environment [44]. Macrophages from patients with SLE show a defective phagocytic activity [45], we could suggest that reduced serum ADA activity in SLE patients would be altered due to defects in macrophages activity since these are the major source of serum ADA.

To exclude the effect of drugs commonly in the treatment of SLE, we investigated the influence of methotrexate, hydroxychloroquine, prednisone, and azathioprine in nucleotide hydrolysis and E-ADA activity *in vitro*. Our results (data not shown) did not show any significant alteration in E-NTPDase (hydrolysis of ATP and ADP) and E-ADA activities when methotrexate, hydroxychloroquine, prednisone, and azathioprine were used. We suggest that the observed increase in nucleotide hydrolysis was not caused by the drugs used to treat SLE.

5. Conclusion

We demonstrated that E-NTPDase activity and expression are altered in lymphocytes from SLE patients, suggesting a compensatory mechanism to help control inflammation. Likewise, E-ADA activity is altered in lymphocytes, suggesting that this enzyme may favor the Th1 immune response in SLE patients. Although increased NTPDase activity helps to control inflammation, this is not sufficient for its complete balance, since the increased ADA activity limits the anti-inflammatory effects of adenosine. Therefore, E-NTPDase and E-ADA have important functions in the modulation of the immune and inflammatory responses

in SLE.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha (IFFAR).

References

- [1] G.C. Tsokos, M.S. Lo, P.C. Reis, K.E. Sullivan, New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus, *Nat. Rev. Rheumatol.* 12 (2016) 716–730.
- [2] M. Koscec, E. Koren, M. Wolfson-Reichlin, R.D. Fugate, E. Trieu, L.N. Targoff, M. Reichlin, Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture, *J. Immunol.* 159 (1997) 2033–2041.
- [3] A. Marshak-Rothstein, L.R. Rifkin, Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 419–441.
- [4] S. Yurasov, H. Wardemann, J. Hammersen, M. Tsuiji, E. Meffre, V. Pascual, M.C. Nussenzweig, Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 703–711.
- [5] M.J.L. Bours, E.L.R. Swennen, F. Di Virgilio, B.N. Cronstein, P.C. Dagnelie, Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 358–404.
- [6] L. Vitiello, S. Gorini, G. Rosano, A. La Sala, Immunoregulation through extracellular nucleotides, *Blood* 120 (2012) 511–518.
- [7] A.A. Erdmann, Z.G. Gao, U. Jung, J. Foley, T. Borenstein, K.A. Jacobson, D.H. Fowler, Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion *in vitro* and IL-2-driven expansion *in vivo*, *Blood* 105 (2005) 4707–4714.
- [8] G. Burnstock, J.M. Boeynaems, Purinergic signalling and immune cells, *Purinergic Signal* 10 (2014) 529–564.
- [9] G.G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1783 (2008) 673–694.
- [10] L. Antonioli, R. Colucci, C. La Motta, M. Tuccori, O. Awad, F. Da Settimo, C. Blandizzi, M. Fornai, Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders, *Curr. Drug Targets* 13 (2012) 842–862.
- [11] M. Petri, A.M. Orbai, G.S. Alarcón, C. Gordon, J. Merrill, P. Fortin, I. Bruce, D. Isenberg, D.J. Wallace, O. Nived, G. Sturfelt, R. Ramsey-Goldman, S. Bae, J. Hanly, J. Sanchez-Guerrero, A. Clarke, C. Aranow, S. Manzi, M.B. Urowitz, D. Gladman, K. Kalunian, M. Costner, V. Werth, A. Zoma, S. Bernatsky, G.R. Irastorza, M. Khamashta, S. Jacobsen, J. Buyon, P. Maddison, M.A. Dooley, R. Van Vollenhoven, E. Ginzler, T. Stoll, C. Peschken, J. Jorizzo, J. Callen, S. Lim, B. Fessler, M. Inanc, D. Kamen, A. Rahman, K. Steinsson, A. Franks, I. Sigler, S. Hameed, H. Fang, N. Pham, R. Brey, M. Weisman, G. McGwin, L. Magder, Derivation and validation of systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 2677–2686.
- [12] 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.* (1968) 77–89.
- [13] J. Jaques, S. Jaques, J. Felipe, P. Rezer, J. Betsch, J. Gutierrez, A. Valle, I. Luiza, G. Farias, S. Cristina, C. De Mello, M. Rosa, C. Schetinger, V. Maria, D. Bitencourt, R. Leal, A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate di-phosphohydrolase activity, *Anal. Biochem.* 410 (2011) 34–39.
- [14] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [15] W. Voelter, K. Zech, P. Arnold, G. Ludwig, Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography, *J. Chromatogr.* 199 (1980) 345–354.
- [16] L.L. Brunton, B.A. Chabner, B.C. Knollmann, *As Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman*, 12th ed., Porto Alegre, 2012.
- [17] S.S. Dias, D.A. Isenberg, *Advances in systemic lupus erythematosus*, Medicine (Baltimore) 42 (2014) 126–133.
- [18] R.W. Hoffman, T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus, *Clin. Immunol.* 113 (2004) 4–13.
- [19] M. de Fátima Lobato da Cunha, Sauma, Nicole Acácia Cabral, L.F. Nunes, Lopes, Estudo Retrospectivo das Manifestações Clínicas e Laboratoriais de 104 Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), *Rev. Bras. Reumatol.* 44 (2004) 192–197.
- [20] A. la Sala, D. Ferrari, F. Di Virgilio, M. Idzko, J. Norgauer, G. Girolomoni, Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides, *J. Leukoc. Biol.* 73 (2003) 339–343.
- [21] C. Cekic, J. Linden, Purinergic regulation of the immune system, *Nat. Rev.*

- Immunol. 16 (2016) 177–192.
- [22] R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, R. Schmatz, G. Thomé, M. Bagatini, M. Correa, C. Rosa, N. Stefanello, L. Potrich, 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.
- [23] R. Schmatz, M. Rosa, C. Schetinger, R. Maria, C. Melazzo, N. Stefanello, P. Acosta, J. Gutierrez, M. De Carvalho, E. Giroto, M. Beatriz, V. Maria, Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats, *Life Sci.* 84 (2009) 345–350.
- [24] J.A. Jaques, L.V. Becker, C. Gonçalves, A.M. Leal, T. Montagner, D. Bertoldo, K.D.V. Pinheiro, V.M. Morsch, M. Rosa, C. Schetinger, D. Bitencourt, R. Leal, Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis, *Cell Biochem. Funct.* 31 (2013) 395–399.
- [25] E.D. Pulte, M.J. Broekman, K.E. Olson, J.H.F. Drosopoulos, R. Jorge, CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes, *Thromb. Res.* 121 (2007) 309–317.
- [26] H. Moncrieffe, K. Nistala, Y. Kamhieh, J. Evans, A. Eddaoudi, S. Eaton, L.R. Wedderburn, High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population, *J. Immunol.* 185 (2010) 134–143.
- [27] J. Herrath, K. Chemin, I. Albrecht, A.I. Catrina, V. Malmström, Surface expression of CD39 identifies an enriched Treg-cell subset in the rheumatic joint, which does not suppress IL-17A secretion, *Eur. J. Immunol.* 44 (2014) 2979–2989.
- [28] M.J. Loza, A.S. Anderson, K.S. O'Rourke, J. Wood, I.U. Khan, T-cell specific defect in expression of the NTPDase CD39 as a biomarker for lupus, *Cell. Immunol.* 271 (2011) 110–117.
- [29] C.V. Medina-Quifiones, L. Ramos-Merino, P. Ruiz-Sada, D. Isenberg, Analysis of complete remission in systemic lupus erythematosus patients over a 32-year period, *Arthritis Care Res.* 68 (2016) 981–987.
- [30] S. Yurasov, T. Tiller, M. Tsuji, K. Velinzon, V. Pascual, H. Wardemann, M.C. Nussenzeig, Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 2255–2261.
- [31] L. Dong-Mei, L. Xiangpei, Z. Jianghuai, H. Rong, X. Bei, C. Wei, Z. Feng, The expression of CD73 in CD4+ regulatory T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus, *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 49 (2010) 772–775.
- [32] J.N. Stolk, D.G. de Koning, A.H. Pennings, R.A. De Abreu, L.B. van de Putte, A.M. Boerbooms, Reduced purine 5'-nucleotidase activity in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus: results of a pilot study, *Ann. Rheum. Dis.* 58 (1999) 122–125.
- [33] L. Antonioli, B. Csóka, M. Fornai, R. Colucci, E. Kókai, C. Blandizzi, G. Haskó, Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov. Today* 19 (2014) 1051–1068.
- [34] S. Gessi, K. Varani, S. Merighi, E. Fogli, V. Sacchetto, A. Benini, E. Leung, S. MacLennan, P.A. Borea, Adenosine and lymphocyte regulation, *Purinergic Signal* 3 (2007) 109–116.
- [35] R. Franco, V. Casado, F. Ciruela, C. Saura, J. Mallol, E.I. Canela, C. Lluís, Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme, *Prog. Neurobiol.* 52 (1997) 283–294.
- [36] T. Hashikawa, S.W. Hooker, J.G. Maj, C.J. Knott-Craig, M. Takedachi, S. Murakami, L.F. Thompson, O. Medical, O. City, M.S. Cancer, O. City, O. Medical, O. City, Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase, *FASEB J.* 18 (2003) 131–133.
- [37] L.G. Castilhos, P.H. Doleski, T.M.D. Bertoldo, D.F. Passos, C.D.M. Bertoncheli, J.F.P. Rezer, J.B. Schlemmer, D.B.R. Leal, Sickle cell anemia induces changes in peripheral lymphocytes E-NTPDase/E-ADA activities and cytokines secretion in patients under treatment, *Biomed. Pharmacother.* 73 (2015) 102–108.
- [38] S. Hitoglou, D. Hatzistilianou, M. Gougoustamou, F. Athanassiadou, A. Kotsis, D. Catriu, Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus, *Clin. Rheumatol.* 20 (2001) 411–416.
- [39] Y. Yoneyama, S. Suzuki, R. Sawa, T. Araki, Plasma adenosine concentrations increase in women with hyperemesis gravidarum, *Clin. Chim. Acta* 352 (2005) 75–79.
- [40] C.K. Wong, C.Y. Ho, E.K. Li, C.W.K. Lam, Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus, *Lupus* 9 (2000) 589–593.
- [41] R. Saghri, N. Ghashghai, S. Movaseghi, P. Poursharifi, S. Jalilfar, M.A. Bidhendi, L. Ghazizadeh, M. Ebrahimi-Rad, Serum adenosine deaminase activity in patients with systemic lupus erythematosus: a study based on ADA1 and ADA2 isoenzymes pattern, *Rheumatol. Int.* 32 (2012) 1633–1638.
- [42] M. Stancíková, J. Lucák, R. Istok, G. Cristalli, J. Rovensky, Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Rheumatol.* 16 (1998) 583–586.
- [43] S. Taysi, M.F. Polat, R.A. Sari, E. Bakan, Serum adenosine deaminase and cytidine deaminase activities in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Chem. Lab. Med.* 40 (2002) 493–495.
- [44] B.A. Conlon, W.R. Law, Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses, *Clin. Exp. Immunol.* 138 (2004) 14–20.
- [45] T. Kuroiwa, E.G. Lee, Cellular interactions in the pathogenesis of lupus nephritis: the role of T cells and macrophages in the amplification of the inflammatory process in the kidney, *Lupus* 7 (1998) 597–603.

ATP signaling and NTPDase in Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

Lara Vargas Becker^a, Daniela Passos^a, Daniela Bitencourt Rosa Leal^b, Vera Maria Morsh^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a

^a *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

^b *Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

* Corresponding author:

Maria Rosa Chitolina Schetinger

Lara Vargas Becker

Fax: (55) 32208978

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 18, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

e-mail: mariachitolina@gmail.com

laravbecker@gmail.com

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune and inflammatory disease with periods of exacerbation and remission. SLE is characterized by the irreversible breakdown of immunological self-tolerance, where there is deregulation of multiple aspects of the immune system. SLE immune dysfunction is characterized by activation of autoreactive T lymphocytes, and hyperactivity of B lymphocytes with consequent production of several autoantibodies. ATP is a purinergic mediator released into the extracellular space in response to cell and tissue damage which operates as a danger signal to modulate immune and inflammatory responses. ATP binds to P2 receptors and its levels are regulated by NTPDase (CD39). SLE patients exhibit increased levels of ATP which binds to P2X receptors resulting in the activation of inflammasome and consequent release of IL-1 β and IL-18, cytokines associated with disease pathogenesis. CD39 is upregulated in SLE representing an important immunoregulatory mechanism by controlling inflammation and favoring the production of adenosine. The aim of this review is to clarify the effects of ATP in the modulation of the inflammatory process and immune responses via P2 receptors as well as the role of NTPDase in the immunopathogenesis of SLE.

Keywords: Systemic lupus erythematosus; ATP; NTPDase; autoimmune; inflammation

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystem inflammatory autoimmune disease (Dias and Isenberg, 2014) (Tsokos et al., 2016) characterized by loss of immunological tolerance and production of autoantibodies (Tsokos et al., 2016). Breakdown of immune tolerance may result from the accumulation of apoptotic cells, which under normal conditions are rapidly cleared. Defects in the clearance of apoptotic cells and subsequent accumulation of these cells induce inflammation and immune responses (Wu et al., 2016). In patients with SLE, the immune system is widely compromised, but the causes of disease and autoimmunity remain unknown (Tsokos et al., 2016). Nevertheless, it is known that genetic, hormonal and environmental factors are involved in the etiology of the disease (Dias and Isenberg, 2014).

The immune dysfunction characteristic of SLE is complex and involves both the innate and the adaptive immune responses which are regulated by a multiplicity of pathways. A key pathway involved in the immunopathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases is the purinergic system (Idzko et al., 2014)(Deaglio and Robson, 2011)(Di Virgilio and Giuliani, 2016), which regulates a wide variety of cellular processes in immune cells, such as cytokine secretion, cell-cell interaction, generation of reactive oxygen species (ROS) and intracellular pathogen removal (Junger, 2011). Adenine nucleotides, name ATP (adenosine triphosphate), ADP (adenosine diphosphate) and AMP (adenosine monophosphate) and nucleoside the derivative adenosine represent the primary components of the purinergic system. These molecules interact with specific purinergic receptors and are regulated by purinergic enzymes, that comprise the final regulatory component of the purinergic system (Bours et al., 2006).

A group of enzymes responsible for regulating the levels of adenine nucleotides and adenosine on the surface of the cell are called ectoenzymes. Purinergic enzymes include the E-NTPDases (Nucleoside Triphosphate Diphosphorylase), the family of E-NPPs (Nucleotide pyrophosphatases / phosphodiesterases), E-5'-nucleotidase and E-Adenosine Deaminase (E-ADA) (Yegutkin, 2008). These enzymes form an enzymatic chain that begins with E-NTPDase (CD39) and E-NPP, which hydrolyze ATP and ADP to AMP. Next, AMP is hydrolyzed by the enzyme E-5'-nucleotidase (CD73) to adenosine, which is ultimately converted to inosine by E-ADA (Bours et al., 2006).

ATP is released from damaged tissues and dying cells, generating inflammatory responses (Di Virgilio, 2005). Extracellular ATP exerts inflammatory effects through the activation of purinergic P2 receptors (Yegutkin, 2008). Two P2 receptor subfamilies have been described: P2X and P2Y. P2X receptors are membrane cation channels whose opening causes Ca^{2+} and Na^{+} influx as well as K^{+} efflux; while P2Y receptors are G-protein-coupled (Cekic and Linden, 2016). ATP is metabolized to adenosine, a molecule with anti-inflammatory properties, by ectonucleotidases. E-NTPDase belongs to the family of ectonucleotidases, hydrolyzes ATP to AMP and regulates nucleotide signaling in the immune system (Vitiello et al., 2012).

In this review, we focus on ATP and its involvement in the modulation of the inflammatory process and immune responses via P2 receptors. We also discuss the role of enzyme E-NTPDase which is responsible for ATP hydrolysis, limiting its interaction with the receptors and favoring the downstream generation of adenosine. In this review, we assess the interplay between ATP signaling and SLE disease and the involvement of this nucleotide and E-NTPDase in the immunopathogenesis of this autoimmune disease.

Immunopathogenesis of SLE

SLE is characterized by aberrant innate and adaptative immune responses, where there is a break of tolerance, defects in clearance of apoptotic cells, generation of self-antigens and auto-antibodies, leading to inflammation, dysfunction, and tissue failure (Zharkova et al., 2017). Cells undergoing apoptosis secrete anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and TGF- β , and expose engulfment signals called “find me”, “eat me” and “stay away” signals to macrophages (Navratil and Ahearn, 2001).

The release of “find me” signals, which include ATP, lysophosphatidylcholine (LPC), fractalkine (CX3CL1) and sphingosine 1-phosphate (SIP), attract phagocytes that engulf apoptotic cells. Early apoptotic cells also express “eat me” signals, like phosphatidylserine (PS), to promote its recognition by phagocytes. In addition, dying cells release factors to prevent neutrophil migration, inflammation and immune response which are known as “stay away” signals (Podolska et al., 2015). Apoptotic cells prevent the release of its intracellular material by maintaining membrane integrity, whereas necrotic cells lose membrane integrity, releasing cellular contents and inducing immune and inflammatory responses (Herrmann et al., 2000).

Early apoptotic cell clearance by macrophages is impaired in SLE, leading to their accumulation and secondary necrosis, a late post-apoptotic phase. The undigested apoptotic material can be taken up by dendritic cells (DCs), which activate T helper 1 cells (Th1) and T helper 2 (Th2) cells. Autoreactive B cells, with help from T cells, produce autoantibodies which combine with self-antigens to form immune complexes (IC) (Wu et al., 2016). IC are deposited in tissues causing activation of the complement system and immune cell infiltration, promoting acute and chronic inflammation and consequent tissue damage (Podolska et al., 2015) (Figure 1). The presence of apoptotic debris reacting with autoantibodies leads to the production of IC, which may induce further apoptosis, creating a vicious cycle generating more autoantibodies and inflammation (Sarmiento et al., 2007).

ATP regulates immune responses

Extracellular ATP is an important regulator of inflammatory and immune responses and can be rapidly released by regulated exocytosis, upon stress, cell damage, or death (Di Virgilio et al., 2009). The release of ATP by necrotic cells is non-specific, whereas specific release includes vesicular exocytosis and release mediated by channels via connexin or pannexin (Dosch et al., 2018). The release of ATP through exocytosis occurs with the fusion of the vesicle to the plasma membrane, this mechanism is dependent vesicular nucleotide transporter (VNUT) (Sawada et al., 2008).

The release of ATP by inflammatory cells occurs in a controlled manner via connexin or pannexin hemichannels (Junger, 2011), pannexin proteins form hemichannels whereas connexin proteins can form hemichannels and gap junctions (Sosinsky et al., 2011), under homeostatic conditions these channels remain predominantly closed (Dourado et al., 2014). Increased levels of ATP and its binding to purinergic receptors mobilize intracellular calcium signaling through the connexin gap junction in the endothelium and result in increased expression of adhesion molecules for leukocytes contributing to inflammation (Scheckenbach et al., 2011). Opening and activation of pannexin-1 (Panx1) channels can occur through various mechanisms, such as mechanical stress (Kienitz et al., 2011), histamine stimulation (Pinheiro et al., 2013), increased intracellular calcium (Locovei et al., 2006), and caspase-mediated cleavage of the portion of Panx1 (Sandilos et al., 2012). The latter mechanism results in irreversible channel opening and release of large amounts of ATP (Timóteo et al., 2014). During the activation of the inflammasome, the opening of Panx-1 can be

coupled to the activation of purinergic receptors, such as P2X7 (Adamson and Leitinger, 2014) and P2Y6 (Timóteo et al., 2014).

The maintenance of homeostasis depends on the removal of the apoptotic cells by professional phagocytes in a silent and anti-inflammatory way (Ravichandran and Lorenz, 2007). During the late stages of apoptosis, the membrane integrity is lost and the cellular contents are released, contributing to the loss of immune tolerance (Muñoz et al., 2010). There are several differences between apoptosis and necrosis (Table 1), one of them is the amount of ATP released. During apoptosis, the amount of nucleotide released is regulated and lower than the amount seen during a damage-induced loss of membrane integrity (Chekeni and Ravichandran, 2011). ATP released from necrotic cells is recognized by inflammatory cells generating a proinflammatory microenvironment through the secretion of proinflammatory cytokines and recruitment of neutrophils (Dosch et al., 2018).

However, ATP may elicit either a proinflammatory or an anti-inflammatory response, depending on which P2 receptor subtype is activated. High concentrations of ATP activate P2X7 receptors, consequently opening the cation-specific channel, and allowing K⁺ efflux and Na⁺ and Ca²⁺ influx. P2X7 drives the activation of the NLRP3 inflammasome triggering mechanisms that support inflammation, and continuous stimulation of this receptor induces apoptosis (Morandini et al., 2014).

DAMPs (danger-associated molecular patterns) are a group of endogenous and heterogeneous molecules that can be released into the extracellular environment as a result of cellular damage, inflammation, secondary necrosis and necrosis (Pisetsky, 2011). ATP acts as a DAMP in response to cellular damage (Vitiello et al., 2012) and promotes inflammation through four distinct mechanisms: 1) inflammasome activation in a P2X7-dependent manner with consequent release of IL-1 β and IL-18 (Di Virgilio, 2007); 2) T cell activation via P2X1, P2X4 and P2X7 receptors (through its role in calcium influx) (Woehrle et al., 2010); 3) inhibition of the suppressive activity and viability of regulatory T (Treg) cells through the activation of P2X7 receptors (Cekic and Linden, 2016); 4) increasing of neutrophil activity via P2X7 receptor (Vitiello et al., 2012).

The P2Y11 receptor has inhibitory effects on different immune cells since its activation stimulates adenylate cyclase which causes the intracellular Ca²⁺ to rise as well as a raising in the cAMP concentration, a known immune cell negative regulator. ATP-induced P2Y11 activation inhibits T-cell proliferation and cytokine production (Vitiello et al., 2012).

ATP regulates various immune responses depending on its extracellular concentration and the receptor it interacts with. It may serve as a danger signal and drives inflammation if released in high concentrations. In low concentrations, ATP can suppress the secretion of inflammatory cytokines, consequently leading to an anti-inflammatory state (Di Virgilio et al., 2009).

ATP and the pathogenesis of SLE

Impaired or failed clearance of cells in the early phases of apoptosis is a characteristic of the etiology of SLE (Chen et al., 2014). In early apoptosis, ATP acts as a "find me" signal to attract phagocytes, promoting phagocytic clearance (Chekeni et al., 2010). The release of caspase-dependent ATP during apoptosis and consequent binding to P2Y2 receptors promotes the migration of monocytes to the sites where apoptosis occurred (Seye et al., 2003). In patients with SLE, there is a decreased phagocytic activity, which may affect the clearance of dying cells (Mahajan et al., 2016). Elliot et al. (Elliott et al., 2009) observed that a disturbance in the "find me" signaling, at the level of ATP or receptor (P2Y), impairs the clearance of apoptotic material, confirmed the relationship between "find me" signals (ATP) and clearance of dying cells. Nucleotides play a role in regulating the phagocytic activity, however, the mechanisms involved are still unknown.

Failure in apoptotic cell clearance may lead to autoimmunity and chronic inflammation, and nucleotides, through their participation in the modulation of phagocytic ability, may have a role in such conditions (Elliott et al., 2009). The efficient clearance of apoptotic cells is important for the maintenance of auto tolerance by preventing the accumulation of apoptotic cells and subsequent progression to secondary necrosis (Wu et al., 2016). Studies show that loss of tolerance and chronic inflammation associated with autoimmunity may be due to continued exposure to DAMP released after cell or tissue damage. An increase in the number of DAMPs has been associated with several autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), systemic sclerosis (SSc) and SLE (Álvarez and Vasquez, 2017). In a recently published study from our research group, we found that SLE patients showed increased serum levels of ATP (Becker et al., 2019).

The ATP-P2X7-driven efflux of potassium results in NLRP3 activation and the release of IL-1 β and IL-18 pro-inflammatory cytokines (Babelova et al., 2009) (Figure 2). IL-1 β , together with IL-6 and IL-23, direct the differentiation of T helper 17 cells (Th17) (Yang and Chiang, 2015). SLE patients have increased serum IL-1 β levels which correlate with disease activity (Cigni et al., 2014). Increased levels of IL-18 were also observed in SLE and are correlate with the severity of the disease and the

presence of lupus nephritis (Kahlenberg et al., 2011) (Hu et al., 2010). IL-18 enhances CD4+ T cell interferon- γ production, as it stimulates leukocyte chemotaxis and cartilage destruction (Volin and Koch, 2011). Although further studies clarifying the role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases are necessary, inhibition this inflammasome may be a promising therapeutic target for SLE (Shen et al., 2018)(Deuteraiou et al., 2018)(Kahlenberg and Kaplan, 2014).

P2X7, via NLRP3 activation, is a key feature in the maturation and release of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18. This receptor has three subunits to which three molecules of ATP bind and, when it is stimulated by low concentrations of ATP, causes the opening of cation-selective channels, whereas high concentrations of ATP drive the formation of a large non-selective pore (Khakh and Alan North, 2006). Activation of P2X7 stimulates the assembly of the NLRP3 inflammasome, leading to an increase of IL-1 β release and polarization towards a Th17 immune response, contributing to lupus nephritis. Upregulated expression or activity of P2X7 in SLE may serve as fuel for the pro-inflammatory state (Di Virgilio and Giuliani, 2016). In contrast, the use of antagonists of P2X7 has been shown to limit the tissue damage associated with autoimmune diseases (Arulkumaran et al., 2011). The study Zhao et al. (Zhao et al., 2013) showed that inhibition of P2X7 reduces the development of anti-dsDNA antibodies, immune complex deposition and renal inflammation in a model of lupus nephritis. Genetic deletion of P2X7 also confers protection against antibody-mediated glomerulonephritis (Taylor et al., 2009).

ATP signaling in the subsets of immune cells involved in SLE

Monocytes/Macrophages

Monocytes/macrophages regulate inflammation and induce immunity. Monocytes enter the bloodstream and differentiate into resident tissue macrophages and acquire distinct phenotypes and functions depending on the microenvironment (Katsiari et al., 2010).

Macrophages from patients with SLE show a defective phagocytic activity and aberrant accumulation of apoptotic debris leading to the autoimmunity phenomenon (Kuroiwa and Lee, 1998). ATP has an inhibitory effect on phagocytes mediated by the P2X7 receptor, but the mechanism responsible for this effect is still not completely understood (Di Virgilio and Vuerich, 2015).

Dendritic cells

Dendritic cells (DC) process and present phagocytosed antigens to naïve T cells and are essential for immunity and tolerance (Podolska et al., 2015). In physiologic conditions, DCs are found

in tissues in an immature state, present autoantigens to autoreactive T cells and maintain the tolerance through mechanisms like anergy, silencing of detrimental effector T cells or the activation of Treg. DCs polarizes naïve T cells into Th1, Th2, Th17 or Treg cells in a manner dependent on the secretion of cytokines (Steinman et al., 2003). Extracellular nucleotides exert various effects on DC through P2, such as maturation, control of cytokine release and induction of cell death (Idzko et al., 2002). ATP, through the activation of P2Y₁₁ receptors, induces DC semi-maturation, increasing the expression of costimulatory molecules and decreased IL-12 production, which is associated with Th2 response or tolerance. However, prolonged exposure to high concentrations of ATP can activate P2X₇ receptors, mediating apoptosis and inducing NLRP3 inflammasome signaling in DCs, directing the maturation of these cells and leading to the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18 (Burnstock and Boeynaems, 2014), which are extremely important cytokines in SLE (Cigni et al., 2014) (Kahlenberg et al., 2011).

Neutrophils

Neutrophils are essential effector cells in the immune defense, responsible for the initial clearance of pathogens through phagocytosis, degranulation, and release of neutrophil extracellular traps (NETs). NETs are networks of extracellular decondensed chromatin fibers decorated with histones. After stimulation, neutrophils can undergo NETosis, a type of cell death which releases NETs (Fuchs et al., 2007). Increased NETosis and/or defective clearance of NETs in SLE is involved in the pathogenesis of this disease since NETs are a potential source of autoantigens found in renal and skin biopsies in these patients (Bonanni et al., 2015).

Receptors on the surface of neutrophils recognize DAMPs during inflammation, including nucleotides. ATP triggers proinflammatory responses in neutrophils such as the release of arachidonic acid, phagocytosis and also the induction of degranulation (Bours et al., 2006). The activation of neutrophils can also stimulate the NLRP3 inflammasome via ATP/P2X receptors (Tan and Weninger, 2017). ATP is also capable of preserving the survival of neutrophils, delaying apoptosis, thus regulating the duration of the inflammatory response. These effects of ATP on neutrophil survival are mediated via activation of the P2Y₁₁ receptor and may compromise the immune function of these cells by increasing their longevity (Vaughan et al., 2007). However, SLE patients neutrophils exhibit abnormal characteristics, such as increased infiltration, impaired phagocytosis and increased

apoptosis (Ren et al., 2003). For a better understanding of the role of ATP in neutrophils in SLE patients, further studies are necessary.

T cells

T cells play an important role in the development of tolerance and loss of this tolerance is implicated in the development of autoimmune diseases. Several T cell abnormalities have been described in SLE patients, emphasizing the involvement of these cells in SLE pathogenesis. T cells are key to B cell hyperactivity and consequent autoantibody production, which contributes to tissue damage in patients with SLE (Crispín et al., 2007). ATP is involved in the activation of the T cells by increasing TCR-mediated responses (Cekic and Linden, 2016). TCR stimulation causes the release of ATP by pannexin-1 hemichannels (Schenk et al., 2008) and vesicular exocytosis (Tokunaga et al., 2010). ATP increases the activation of the effector T cell during inflammation, through P2X receptors stimulation of Ca^{2+} influx (Cekic and Linden, 2016). During the immune response, activated T cells may also express P2Y receptors, such as P2Y6 (Giannattasio et al., 2011), but there is limited information on this receptor.

During the activation of T cells in patients with SLE, the T cell receptors (TCR) exhibit an overtly abnormal response, leading to an increased cytoplasmic Ca^{2+} influx and cytosolic protein tyrosine phosphorylation (Crispín et al., 2010). After stimulation, T cells proliferate and differentiate into different subsets (Th1, Th2, Th17 or Tregs). Tregs regulate the course of the protective immune response contributing to homeostasis and tolerance and limiting tissue damage (Walter Sifuentes Giraldo et al., 2012). ATP inhibits the suppressive activity and the viability of Treg cells, stimulating apoptosis due to pore formation by P2X7 (Cekic and Linden, 2016). Studies have reported abnormalities in Treg cell suppression abilities in SLE patients (Miyara et al., 2005) (Lin et al., 2007) (Alvarado-Sánchez et al., 2006) (Dal Ben et al., 2014). In addition to deficiency or loss of function of Tregs, SLE patients display an imbalance in the Th17/Treg ratio, with an increased number of Th17 cells, which are involved in the loss of immune tolerance, in detriment of Tregs (Kleczynska et al., 2011).

B Cells

Abnormalities in B-cell signaling in patients with SLE have been observed, evidencing the critical role of B cells in the pathogenesis of this disease (Peng, 2009). The loss of B cell tolerance is key in SLE pathogenesis since B cells of SLE patients produce autoantibodies mainly against nuclear

antigens (Dörner et al., 2011). Activation of B cells occurs via binding of the antigen to the antigen receptor (BCR), inducing signaling that controls phagocytosis, migration, proliferation, cytokine release, and production of autoantibodies (Reth and Wienands, 1997).

B cells express P2X and P2Y receptors (Jacob et al., 2013). ATP regulates B cell activation, adhesion, migration, and IgE secretion (Przybyła et al., 2018). ATP-driven P2X7 activation is crucial for secretion of IgM, indicating that this receptor plays a key role in the humoral response (Sakowicz-burkiewicz et al., 2013).

B cells from SLE patients show increased intracytoplasmic Ca^{2+} influx in response to BCR stimulation, resulting in overactivation of these cells (Pugh-bernard and Cambier, 2006). The increased expression of P2X7 in T and B lymphocytes of SLE patients seems to be positively correlated with the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), showing that this receptor is directly associated with the clinical manifestations of SLE (Li et al., 2012).

NTPDase and control of the cellular immune response

E-NTPDases hydrolyze extracellular tri- and diphosphonucleosides to monophosphonucleosides, requiring millimolar concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} for maximal activity (Yegutkin, 2008). Several studies show the importance of NTPDase in inflammation and immune responses, since the proinflammatory signaling of ATP, via P2X7, can be terminated by the action of this enzyme (Deaglio and Robson, 2011) (Antonioli et al., 2013). NTPDase1 (CD39) is the prototype E-NTPDase family and is the dominant ectoenzyme in the immune system (Mizumoto et al., 2002). In order to improve the understanding of the mechanisms involved in the immune response, Leal et al. (Leal et al., 2005) characterized the activity of NTPDase1 (CD39) in lymphocytes and standardized a colorimetric method to determine the activity of this enzyme.

The expression and activity of CD39 undergo changes according to the pathophysiological context, this enzyme has been found to be altered in autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS) (Spanevello et al., 2010), rheumatoid arthritis (RA) (Jaques et al., 2013) (Moncrieffe et al., 2010) and SLE (Becker et al., 2019) (Loza et al., 2011). The study by Spanevello et al. (Spanevello et al., 2010) showed that the activity of NTPDase in lymphocytes of patients with MS is increased in relation to the control, suggesting that this enzyme modulates of the immune and inflammatory response in MS. The work of Jaques et al. (Jaques et al., 2013) evaluated the activity of NTPDase in lymphocytes of patients with RA, which is increased in relation to the control group, evidencing an organic

mechanism to decrease the levels of inflammatory ATP and increase the levels of adenosine, an anti-inflammatory molecule.

In the study by Moncrieffe et al. (Moncrieffe et al., 2010), increased CD39 expression was found in synovial fluid T cells from juvenile arthritis patients, suggesting that this increase in CD39 in the inflamed regions could represent an immunomodulatory mechanism through the hydrolysis of ATP. The study by Loza et al. (Loza et al., 2011) analyzed the expression of CD39 in Treg cells of patients with SLE and found a decreased expression of CD39 in these patients. This defect has a functional impact on the regulation of T cells and may represent a potential biomarker of SLE (Loza et al., 2011). On a previous study, we evaluated the expression and activity of CD39 in lymphocytes of SLE patients, both of which were found to be increased and were significantly correlated. These increases in both expression and activity could represent a compensatory mechanism to control inflammation since this enzyme has anti-inflammatory effects (Becker et al., 2019).

Extracellular ATP has several proinflammatory effects through binding to P2X7 receptors, including the release of IL-1 β and IL-18 (Ferrari et al., 2006), cytokines linked to various diseases including SLE (Areas et al., 2007). CD39 prevents the secretion of IL-1 β and IL-18 (Ferrari et al., 2006), the breakdown of ATP by CD39 and consequent generation of adenosine represents an important immunoregulatory mechanism (Mandapathil et al., 2010). CD39-null mice show an impaired B-cell response to T-dependent antigens, suggesting that CD39 contributes to the maturation of the antibody response (Dwyer et al., 2007).

Treg cells are affected by ATP, through the activation of P2X7 receptors, which exerts an inhibitory effect on the function and generation of these cells inducing the conversion of these cells into Th17 cells, thereby tilting the balance towards the latest (Schenk et al., 2011). Corroborating to this data, the lack of CD39 leads to the expansion of the Th17 cell subset in a study with knockout CD39 in a murine model of lupus (Knight et al., 2018). The expression of CD39 in Tregs was found to prevent conversion to Th17 cells in humans, and suppress IL-17 production (Fletcher et al., 2009). The catalytic effect of CD39 on ATP favor the generation of adenosine, which boosts Treg numbers and their immunosuppressive function (Ohta and Sitkovsky, 2014).

Although CD39, along with CD73, is not a classical marker of Tregs, such as CD25 and FOXP3, it is also recognized as a surface marker of these cells (Knight et al., 2018) and may indicate the severity of the immune tolerance loss (Gambichler et al., 2015). The role of CD39 in the

maintenance of immune tolerance is associated with its capacity of degrading ATP and consequently inhibiting the production of IL-17, which stimulates B cells to produce autoantibodies (Knight et al., 2018). The activity of CD39 has two anti-inflammatory effects, the first is the removal of proinflammatory ATP, and the second is the amplification of adenosine production, a nucleoside that exhibits suppressive and anti-inflammatory activity (Borsellino et al., 2007). By degrading ATP, CD39 ensures the downstream production of adenosine and boosts the suppressive action of Tregs and prevents the conversion of Tregs into Th17 cells, suppressing the production of IL-17 (Fletcher et al., 2009). Thus, this enzyme aids the maintenance of a balanced Th17/Treg ratio.

CONCLUDING REMARKS

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a debilitating and potentially fatal autoimmune disease. The lack of a specific diagnostic test and the complexity of the treatment make the management of this disease even more challenging. A better understanding of the immunopathogenic mechanisms involved in SLE may help uncover crucial information to clarify its origin, find useful diagnostic and disease progression biomarkers and enable the development of treatment targets.

ATP acts as a danger signal and exerts a variety of effects on immune cells (Figure 3), via P2 receptors. This nucleotide is involved in three major features of SLE: loss of immune tolerance, continuous antibody release, and inflammation, in the ATP-driven P2X7/inflammasome activation which is associated with inflammation and consequent systemic manifestations of the disease. Thus, the P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome could be used as treatment targets for SLE.

While activation of P2X7 receptors seems to contribute to the pathogenesis of the disease, CD39 exerts a protective effect against SLE. In addition, the expression of this enzyme may indicate the severity of the immune dysfunction associated with autoimmunity. To date, there are only a few studies specifically correlating SLE and the purinergic system. For a better understanding of the dysregulation of the immune system in this pathology more studies involving the purinergic system are needed.

Conflict of Interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha (IFFAR).

REFERENCES

- Adamson, S.E., Leitinger, N., 2014. The Role of Pannexin1 in the Induction and Resolution of Inflammation. *FEBS Lett.* 588, 1416–1422. doi:10.1016/j.febslet.2014.03.009.
- Alvarado-Sánchez, B., Hernández-Castro, B., Portales-Pérez, D., Baranda, L., Layseca-Espinosa, E., Abud-Mendoza, C., Cubillas-Tejeda, A.C., González-Amaro, R., 2006. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 27, 110–118. doi:10.1016/j.jaut.2006.06.005
- Álvarez, K., Vasquez, G., 2017. Damage-associated molecular patterns and their role as initiators of inflammatory and auto-immune signals in systemic lupus erythematosus. *Int. Rev. Immunol.* 36, 259–270. doi:10.1080/08830185.2017.1365146
- Antonoli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., Haskó, G., 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* 19, 355–367. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005.
- Areas, A., Braga, F., Miranda, L., Fischer, R., Figueredo, C., Miceli, V., Gustafsson, A., Sztajnbock, F., 2007. Increased IL-18 serum levels in patients with juvenile systemic lupus erythematosus. *Acta Reum. Port.* 32, 387–8.
- Arulkumar, N., Unwin, R.J., Tam, F.W.K., 2011. A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs* 20, 897–915. doi:10.1517/13543784.2011.578068.A
- Babelova, A., Moreth, K., Tsalas-Greul, W., Zeng-Brouwers, J., Eickelberg, O., Young, M.F., Brucker, P., Pfeilschifter, J., Schaefer, R.M., Gröne, H.J., Schaefer, L., 2009. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 24035–24048. doi:10.1074/jbc.M109.014266
- Becker, L.V., da Silva Pereira Saccol, R., Morsch, V.M., Leal, D.B.R., Casali, E.A., Lopes, N.G.M., Cardoso, V.V., Schetinger, M.R.C., 2019. Activity and expression of E-NTPDase is altered in peripheral lymphocytes of systemic lupus erythematosus patients. *Clin. Chim. Acta* 488, 90–97. doi:https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.032
- Bonanni, A., Vaglio, A., Bruschi, M., Sinico, R.A., Cavagna, L., Moroni, G., Franceschini, F., Allegri, L., Pratesi, F., Migliorini, P., Candiano, G., Pesce, G., Ravelli, A., Puppo, F., Martini, A., Tincani, A., Ghiggeri, G.M., 2015. Multi-antibody composition in lupus nephritis: Isotype and antigen specificity make the difference. *Autoimmun. Rev.* 14, 692–702. doi:10.1016/j.autrev.2015.04.004
- Borsellino, G., Kleiweietfeld, M., Mitri, D. Di, Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Ho, S., Centonze, D., Bernardi, G., Rossini, P.M., Battistini, L., Ro, O., Falk, K., 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225–1233. doi:10.1182/blood-2006-12-064527.
- Bours, M.J.L., Swennen, E.L.R., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C., 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 112, 358–404. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.013
- Burnstock, G., Boeynaems, J.M., 2014. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal.* 10, 529–564. doi:10.1007/s11302-014-9427-2
- Cekic, C., Linden, J., 2016. Purinergic regulation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 177–192. doi:10.1038/nri.2016.4
- Chekeni, F.B., Elliott, M.R., Sandilos, J.K., Walk, S.F., Kinchen, M., Lazarowski, E.R., Armstrong, A.J., Penuela, S., Laird, W., Salvesen, G.S., Isakson, B.E., Bayliss, D. a, Kodi, S., 2010. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467, 863–867. doi:10.1038/nature09413.
- Chekeni, F.B., Ravichandran, K.S., 2011. The role of nucleotides in apoptotic cell clearance: Implications for disease pathogenesis. *J. Mol. Med.* 89, 13–23. doi:10.1007/s00109-010-0673-7
- Chen, J., Zhao, Y., Liu, Y., 2014. The role of nucleotides and purinergic signaling in apoptotic cell clearance - implications for chronic inflammatory diseases. *Front. Immunol.* 5, 1–9. doi:10.3389/fimmu.2014.00656
- Cigni, A., Pileri, P.V., Faedda, R., Gallo, P., Sini, A., Satta, A.E., Marras, R., Carta, E., Argiolas, D., Rum, I., Masala, A., 2014. Interleukin 1, interleukin 6, interleukin 10, and tumor necrosis factor α in active and quiescent systemic lupus erythematosus. *J. Investig. Med.* 62, 825–9. doi:10.2310/JIM.0000000000000085
- Crispín, J.C., Kyttaris, V., Juang, Y.-T., Tsokos, G.C., 2007. Systemic lupus erythematosus: new molecular targets. *Ann. Rheum. Dis.* doi:10.1136/ard.2007.078493
- Crispín, J.C., Liossis, S.C., Kis-toth, K., Lieberman, L. a, Kyttaris, V.C., Juang, Y., Tsokos, G.C., 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* 16, 47–57. doi:10.1016/j.molmed.2009.12.005.

- Dal Ben, E.R.R., Prado, C.H., Baptista, T.S.A., Bauer, M.E., Staub, H.L., 2014. Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e síndrome antifosfolípide secundária possuem números reduzidos de células B CD4+ CD25+ Foxp3+ (células Treg) e células B CD3– CD19+ circulantes. *Rev. Bras. Reumatol.* 4, 6–11.
- Deaglio, S., Robson, S.C., 2011. Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. *Adv. Pharmacol.* 61, 301–332. doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00010-2
- Deuteraiou, K., Kitas, G., Garyfallos, A., Dimitroulas, T., 2018. Novel insights into the role of inflammasomes in autoimmune and metabolic rheumatic diseases. *Rheumatol. Int.* doi:10.1007/s00296-018-4074-5
- Di Virgilio, F., 2007. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 465–472. doi:10.1016/j.tips.2007.07.002
- Di Virgilio, F., 2005. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal.* 1, 205–209. doi:10.1007/s11302-005-6312-z
- Di Virgilio, F., Boeynaems, J.M., Robson, S.C., 2009. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 507–513. doi:10.1016/j.coph.2009.06.021
- Di Virgilio, F., Giuliani, A.L., 2016. Purinergic signalling in autoimmunity: A role for the P2X7R in systemic lupus erythematosus? *Biomed. J.* 39, 326–338. doi:10.1016/j.bj.2016.08.006
- Di Virgilio, F., Vuerich, M., 2015. Purinergic signaling in the immune system. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 191, 117–123. doi:10.1016/j.autneu.2015.04.011
- Dias, S.S., Isenberg, D.A., 2014. Advances in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore).* 42, 126–133. doi:10.1016/j.mpmed.2013.12.013
- Dörner, T., Jacobi, A.M., Lee, J., Lipsky, P.E., 2011. Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Methods* 363, 187–197. doi:10.1016/j.jim.2010.06.009
- Dosch, M., Gerber, J., Jebbawi, F., Beldi, G., 2018. Mechanisms of ATP release by inflammatory cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–16. doi:10.3390/ijms19041222
- Dourado, M., Wong, E., Hackos, D.H., 2014. Pannexin-1 Is Blocked by Its C-Terminus through a Delocalized Non-Specific Interaction Surface. *PLoS One* 9, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0099596
- Dwyer, K.M., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T.B., Robson, S.C., 2007. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* 3, 171–180. doi:10.1007/s11302-006-9050-y
- Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Ravichandran, K.S., 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal for phagocytic clearance. *Nature* 461, 282–286. doi:10.1038/nature08296.Nucleotides
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., Di Virgilio, F., 2006. The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *J. Immunol.* 176, 3877–3883. doi:10.4049/jimmunol.176.7.3877
- Fletcher, J.M., Lonergan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., O'Farrelly, C., Tubridy, N., Mills, K.H.G., 2009. CD39+Foxp3+ Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* 183, 7602–7610. doi:10.4049/jimmunol.0901881
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241. doi:10.1083/jcb.200606027
- Gambichler, T., Pätzholz, J., Schmitz, L., Lahner, N., Kreuter, A., 2015. FOXP3+ and CD39+ regulatory T cells in subtypes of cutaneous lupus erythematosus. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 29, 1972–1977. doi:10.1111/jdv.13123
- Giannattasio, G., Ohta, S., Boyce, J.R., Xing, W., Balestrieri, B., Boyce, J.A., 2011. The purinergic G protein-coupled receptor 6 inhibits effector T cell activation in allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 187, 1486–1495. doi:10.1080/10937404.2015.1051611.INHALATION
- Herrmann, M., Voll, R.E., Kalden, J.R., 2000. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol. Today* 21, 424–6. doi:S0167-5699(00)01675-3 [pii]
- Hu, D., Liu, X., Chen, S., Bao, C., 2010. Expressions of IL-18 and its binding protein in peripheral blood leukocytes and kidney tissues of lupus nephritis patients. *Clin. Rheumatol.* 29, 717–721. doi:10.1007/s10067-010-1386-6
- Idzko, M., Dichmann, S., Ferrari, D., Virgilio, F. Di, Sala, A., Girolomoni, G., Panther, E., Norgauer, J., 2002. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin – sensitive P2y receptors. *Blood* 100, 925–933.

- Idzko, M., Ferrari, D., Eltzschig, H.K., 2014. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509. doi:10.1038/nature13085
- Jacob, F., Novo, C.P., Bachert, C., Van Crombruggen, K., 2013. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal.* 9, 285–306. doi:10.1007/s11302-013-9357-4
- Jaques, J.A., Becker, L.V., Gonçalves, C., Leal, A.M., Montagner, T., Bertoldo, D., Pinheiro, K.D.V., Morsch, V.M., Rosa, M., Schetinger, C., Bitencourt, D., Leal, R., 2013. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem. Funct.* 31, 395–9.
- Junger, W.G., 2011. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 201–212. doi:10.1038/nri2938.Immune
- Kahlenberg, J.M., Kaplan, M.J., 2014. The Inflammasome and lupus- another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? *Curr. Opin. Rheumatol.* 26, 475–481. doi:10.1097/BOR.000000000000088.The
- Kahlenberg, J.M., Thacker, S.G., Berthier, C.C., Cohen, C.D., Kretzler, M., Kaplan, M.J., 2011. Inflammasome Activation of IL-18 Results in Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 187, 6143–6156. doi:10.4049/jimmunol.1101284.Inflammasome
- Katsiari, C.G., Lioussis, S.N.C., Sfrikakis, P.P., 2010. The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: A reappraisal. *Semin. Arthritis Rheum.* 39, 491–503. doi:10.1016/j.semarthrit.2008.11.002
- Khakh, B.S., Alan North, R., 2006. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527–532. doi:10.1038/nature04886
- Kienitz, M., Bender, K., Dermietzel, R., Pott, L., Zoidl, G., 2011. Pannexin 1 Constitutes the Large Conductance Cation Channel of Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 290–298. doi:10.1074/jbc.M110.163477
- Kleczynska, W., Jakiela, B., Plutecka, H., Milewski, M., 2011. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus. *FOLIA Histochem. Cytobiol.* 49, 646–653.
- Knight, J.S., Mazza, L.F., Yalavarthi, S., Sule, G., Ali, R.A., 2018. Ectonucleotidase-Mediated Suppression of Lupus Autoimmunity and Vascular Dysfunction. *Front. Immunol.* 9, 1–11. doi:10.3389/fimmu.2018.01322
- Kuroiwa, T., Lee, E.G., 1998. Cellular interactions in the pathogenesis of lupus nephritis: The role of T cells and macrophages in the amplification of the inflammatory process in the kidney. *Lupus* 7, 597–603. doi:10.1191/096120398678920712
- Leal, D.B.R., Streher, C.A., Neu, T.N., Bittencourt, P., Leal, A.M., Silva, E.P., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2005. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1. Biochim. Biophys. Acta 1721, 9–15. doi:10.1016/j.bbagen.2004.09.006
- Li, X., Wang, M., Tao, J., Li, X., Yu, N., 2012. The Clinical Significance and Expression of P2X7 Purinergic Receptor in Peripheral Blood from Patients with New-Onset Systemic Lupus Erythematosus, in: 2012 ACR/ARHP Annual Meeting. pp. 6–7.
- Lin, S.C., Chen, K.H., Lin, C.H., Kuo, C.C., Ling, Q.D., Chan, C.H., 2007. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 37, 987–996. doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01882.x
- Locovei, S., Wang, J., Dahl, G., 2006. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* 580, 239–244. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.004
- Loza, M.J., Anderson, A.S., O'Rourke, K.S., Wood, J., Khan, I.U., 2011. T-cell specific defect in expression of the NTPDase CD39 as a biomarker for lupus. *Cell. Immunol.* 271, 110–117. doi:10.1016/j.cellimm.2011.06.010.T
- Mahajan, A., Herrmann, M., Muñoz, L.E., 2016. Clearance deficiency and cell death pathways: A model for the pathogenesis of SLE. *Front. Immunol.* 7, 1–12. doi:10.3389/fimmu.2016.00035
- Mandapathil, M., Hilldorfer, B., Szczepanski, M.J., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., Lang, S., Jackson, E.K., Gorelik, E., Whiteside, T.L., 2010. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+regulatory T Cells. *J. Biol. Chem.* 285, 7176–7186. doi:10.1074/jbc.M109.047423
- Miyara, M., Amoura, Z., Parizot, C., Badoual, C., Dorgham, K., Trad, S., Nochy, D., Debre, P., Piette, J.-C., Gorochov, G., 2005. Global Natural Regulatory T Cell Depletion in Active Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 175, 8392–8400. doi:10.4049/jimmunol.175.12.8392
- Mizumoto, N., Kumamoto, T., Robson, S.C., Sévigny, J., Matsue, H., Enjyoji, K., Takashima, A., 2002.

- CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat. Med.* 8, 358–365. doi:10.1038/nm0402-358
- Moncrieffe, H., Nistala, K., Kamhieh, Y., Evans, J., Eddaoudi, A., Eaton, S., Wedderburn, L.R., 2010. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J. Immunol.* 185, 134–143. doi:10.4049/jimmunol.0803474
- Morandini, A.C., Savio, L.E.B., Coutinho-Silva, R., 2014. The role of P2X7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. *Biomed. J.* 37, 169–77. doi:10.4103/2319-4170.127803
- Muñoz, L.E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A.A., Herrmann, M., 2010. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 280–289. doi:10.1038/nrrheum.2010.46
- Navratil, J., Ahearn, J., 2001. Apoptosis, clearance mechanisms, and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr. Rheumatol. Rep.* 3, 191–8.
- Ohta, A., Sitkovsky, M., 2014. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front. Immunol.* 5, 1–9. doi:10.3389/fimmu.2014.00304
- Peng, S.L., 2009. Altered T and B lymphocyte signaling pathways in lupus. *Autoimmun. Rev.* 8, 179–183. doi:10.1016/j.autrev.2008.07.040
- Pinheiro, A.R., Paramos-de-carvalho, D., Certal, M., Costa, M.A., Costa, C., Se, J., Correia-de-sa, P., 2013. Histamine Induces ATP Release from Human Subcutaneous Fibroblasts , via Pannexin-1 Hemichannels , Leading to Ca²⁺ Mobilization and Cell Proliferation. *J. Biol. Chem.* 288, 27571–27583. doi:10.1074/jbc.M113.460865
- Pisetsky, D.S., 2011. Cell Death in the Pathogenesis of Immune-Mediated Diseases: The Role of HMGB1 and DAMP-PAMP Complexes. *Swiss Med. weekly.* 141, w13256. doi:10.4414/smw.2011.13256.Cell
- Podolska, M.J., Biermann, M.H., Maueröder, C., Hahn, J., Herrmann, M., 2015. Inflammatory etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update. *J. Inflamm. Res.* 8, 161–71. doi:10.2147/JIR.S70325
- Przybyła, T., Sakowicz-Burkiewicz, M., Pawelczyk, T., 2018. Purinergic signaling in B cells. *Acta Biochim. Pol.* 65, 1–7.
- Pugh-bernard, A.E., Cambier, J.C., 2006. B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 451–455.
- Ravichandran, K.S., Lorenz, U., 2007. Engulfment of apoptotic cells: Signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 964–974. doi:10.1038/nri2214
- Ren, Y., Tang, J., Mok, M.Y., Chan, A.W.K., Wu, A., Lau, C.S., 2003. Increased Apoptotic Neutrophils and Macrophages and Impaired Macrophage Phagocytic Clearance of Apoptotic Neutrophils in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48, 2888–2897. doi:10.1002/art.11237
- Reth, M., Wienands, J., 1997. Initiation and Processing of Signals From the B Cell Antigen Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 453–479. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.453
- Sakowicz-burkiewicz, M., Kocbuch, K., Grden, M., Maciejewska, I., Szutowicz, A., Pawelczyk, T., 2013. Immunobiology High glucose concentration impairs ATP outflow and immunoglobulin production by human peripheral B lymphocytes : Involvement of P2X7 receptor. *Immunobiology* 218, 591–601. doi:10.1016/j.imbio.2012.07.010
- Sandilos, J.K., Chiu, Y., Chekeni, F.B., Armstrong, A.J., Walk, S.F., Ravichandran, K.S., Bayliss, D.A., 2012. Pannexin 1 , an ATP Release Channel , Is Activated by Caspase Cleavage of Its Pore-associated C-terminal Autoinhibitory region. *J. Biol. Chem.* 287, 11303–11311. doi:10.1074/jbc.M111.323378
- Sarmiento, L.F., Sarmiento, L.F., Muñoz, L.E., Sarmiento, L.F., Muñoz, L.E., Chirinos, P., Bianco, N.E., Zabaleta-Lanz, M.E., 2007. Opsonization by anti-dsDNA antibodies of apoptotic cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 40, 337–339. doi:10.1080/08916930701356663
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., Moriyama, Y., 2008. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5683–5686.
- Scheckenbach, K.E.L., Crespín, S., Kwak, B.R., Chanson, M., 2011. Connexin Channel-Dependent Signaling Pathways in inflammation. *J. Vasc. Res.* 48, 91–103. doi:10.1159/000316942
- Schenk, U., Frascoli, M., Proietti, M., Geffers, R., Traggiai, E., Buer, J., Ricordi, C., Westendorf, A.M., Grassi, F., 2011. ATP Inhibits the Generation and Function of Regulatory T Cells Through the Activation of Purinergic P2X Receptors. *Sci. Signal.* 4, ra12. doi:10.1126/scisignal.2001270
- Schenk, U., Westendorf, A.M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Verderio, C., Buer, J., Scanziani, E., Grassi, F., 2008. Purinergic Control of T Cell Activation by ATP Released Through Pannexin-1

- Hemichannels. *Sci. Signal.* 1, 3–8. doi:10.1126/scisignal.1160583
- Seye, C.I., Yu, N., Jain, R., Kong, Q., Minor, T., Newton, J., Erb, L., Gonzales, F.A., Weisman, G.A., 2003. The P2Y2 Nucleotide Receptor Mediates UTP-induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Coronary Artery Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 24960–24965. doi:10.1074/jbc.M301439200
- Shen, H., Yang, Y., Meng, X., Luo, X., 2018. NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 17, 694–702. doi:10.1016/j.autrev.2018.01.020
- Sosinsky, G.E., Boassa, D., Dermietzel, R., Duffy, H.S., Laird, D.W., Macvicar, B.A., Naus, C.C., Penuela, S., Scemes, E., Spray, D.C., Thompson, R.J., Zhao, H., Dahl, G., 2011. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels* 5, 193–197. doi:10.4161/chan.5.3.15765
- Spanevello, R.M., Mazzanti, C.M., Schmatz, R., Thomé, G., Bagatini, M., Correa, M., Rosa, C., Stefanello, N., Potrich, L., Moretto, M.B., Oliveira, L., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2010. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Clin. Chim. Acta* 411, 210–214. doi:10.1016/j.cca.2009.11.005
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Nussenzweig, M., 2003. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987, 15–25.
- Tan, S.Y., Wenginger, W., 2017. Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. *Curr. Opin. Immunol.* 44, 34–42. doi:10.1016/j.coi.2016.11.002
- Taylor, S.R.J., Turner, C.M., Elliott, J.I., McDaid, J., Hewitt, R., Smith, J., Pickering, M.C., Whitehouse, D.L., Cook, H.T., Burnstock, G., Pusey, C.D., Unwin, R.J., Tam, F.W.K., 2009. P2X7 Deficiency Attenuates Renal Injury in Experimental Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1275–1281. doi:10.1681/ASN.2008060559
- Timóteo, M.A., Carneiro, I., Silva, I., Noronha-Matos, J.B., Ferreirinha, F., Silva-Ramos, M., Correia-De-Sá, P., 2014. ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y6 receptors. *Biochem. Pharmacol.* 87, 371–379. doi:10.1016/j.bcp.2013.11.007
- Tokunaga, A., Tsukimoto, M., Harada, H., Moriyama, Y., Kojima, S., 2010. Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *J. Biol. Chem.* 285, 17406–17416. doi:10.1074/jbc.M110.112417
- Tsokos, G.C., Lo, M.S., Reis, P.C., Sullivan, K.E., 2016. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 716–730. doi:10.1038/nrrheum.2016.186
- Vaughan, K.R., Stokes, L., Prince, L.R., Meis, S., Matthias, U., Bingle, C.D., Sabroe, I., Surprenant, A., Whyte, M.K.B., 2007. Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor1. *J. Immunol.* 179, 8544–8553.
- Vitiello, L., Gorini, S., Rosano, G., La Sala, A., 2012. Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood* 120, 511–518. doi:10.1182/blood-2012-01-406496
- Volin, M. V., Koch, A.E., 2011. Interleukin-18: A Mediator of Inflammation and Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. *J. Interf. Cytokine Res.* 31, 745–751. doi:10.1089/jir.2011.0050
- Walter Sifuentes Giraldo, A., García Villanueva, M.J., Boteanu, A.L., Lois Iglesias, A., Zea Mendoza, A.C., 2012. New Therapeutic Targets in Systemic Lupus. *Reumatol. Clin.* 8, 201–207. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2012.06.011
- Woehrl, T., Yip, L., Elkhali, A., Sumi, Y., Chen, Y., Yao, Y., Insel, P.A., Junger, W.G., 2010. Pannexin-1 hemichannel – mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* 116, 3475–3485. doi:10.1182/blood-2010-04-277707.
- Wu, H., Fu, S., Zhao, M., Lu, L., Lu, Q., 2016. Dysregulation of cell death and its epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus. *Molecules* 22, 1–12. doi:10.3390/molecules22010030
- Yang, C.A., Chiang, B.L., 2015. Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* 61, 1–8. doi:10.1016/j.jaut.2015.05.001
- Yegutkin, G.G., 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783, 673–694. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.024
- Zhao, J., Wang, H., Dai, C., Wang, H., Zhang, H., Huang, Y., Wang, S., Gaskin, F., Yang, N., Fu, S.M., 2013. P2X7 blockade attenuates murine lupus nephritis by inhibiting activation of the NLRP3/ASC/Caspase 1 pathway. *Arthritis Rheum.* 65, 3176–3185. doi:10.1002/art.38174
- Zharkova, O., Celhar, T., Cravens, P.D., Satterthwaite, A.B., Fairhurst, A.-M., Davis, L.S., 2017. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 56, i55–i66. doi:10.1093/rheumatology/kew427

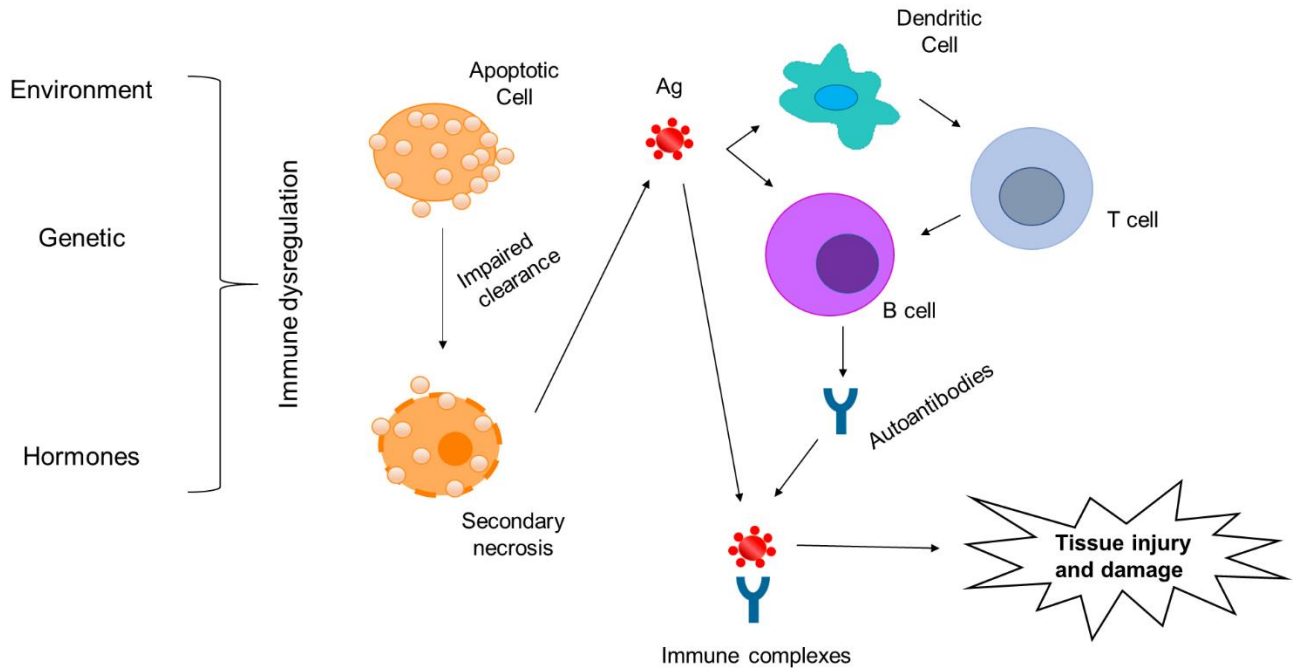


Fig. 1 Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). Apoptotic cells undergo secondary necrosis, causing cells to lose membrane integrity and release intracellular content that will serve as a source of autoantigens, which are recognized by dendritic cells and activate T cells. T cells provide help for B cells to produce autoantibodies. The union of autoantibodies with autoantigens forms the immune complexes, which are deposited in tissues and organs causing inflammation and damage. Ag, autoantigens

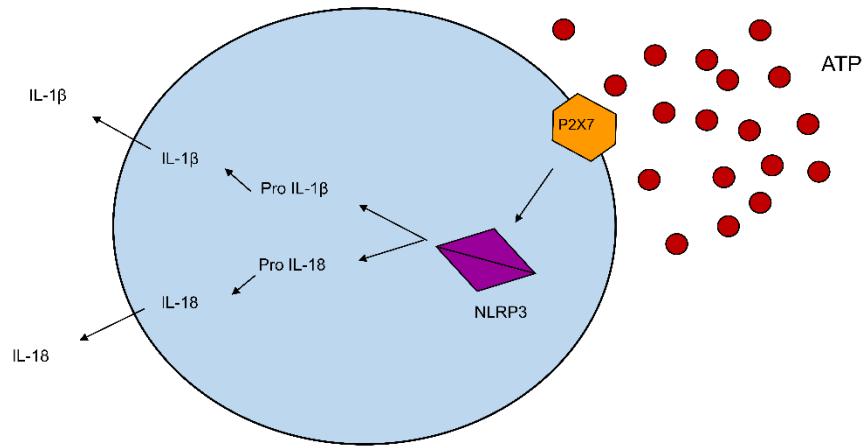


Fig. 2 Activation of the inflammasome via P2X7 receptors

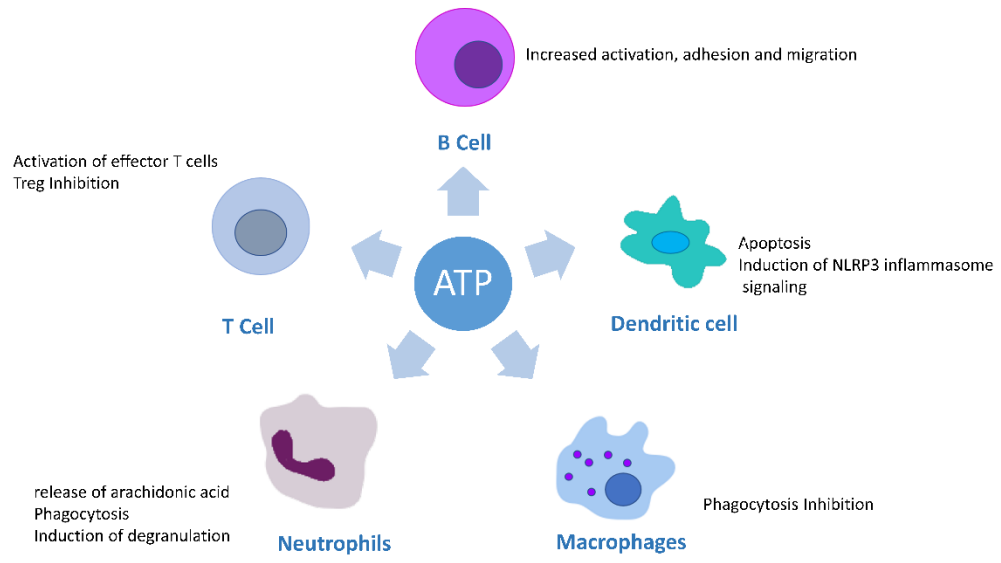


Fig. 3 Signaling of ATP in some immune cells involved in SLE

Box 1 | Systemic lupus erythematosus

- The incidence rates varied from 0.3 to 23.7 per 100,000 person-years.
- The prevalence rates ranged from 6.5 to 178.0 per 100,000 inhabitants.
- The incidence is higher in women than in men at a ratio of 8-15: 1.
- The peak incidence occurs during reproductive age, the mean age of diagnosis ranges from 17 to 32 years.
- Is more frequent in descendants of Africans, Hispanics, Chinese and Asians; in general these patients present a greater number of hematological, neurological and renal manifestations.
- The mortality rate is 2.6-3 times higher than in the general population, probably related to high rates of infections, cardiovascular disease and kidney disease.
- Presents a heterogeneity of clinical manifestations where different organs and systems can be affected.
- The diagnosis is based on clinical and immunologic criteria.
- Disease control is complex, before planning the treatment it is necessary to determine the severity of the disease, including which organs are affected and the degree of inflammation.

Table 1 Differences between apoptosis and necrosis

APOPTOSIS	NECROSIS
Physiological cell death	Pathological cell death
Plasma membrane integrity	Loss of plasma membrane integrity
Selective release of ATP	Total intracellular ATP content released
Efficient clearance of apoptotic cells by macrophages	Impaired clearance of apoptotic cells by macrophages
No release of DAMPs	Release of DAMPs
No inflammation and sequestering of autoantigens	Inflammation and accessibility of autoantigens

4 DISCUSSÃO

Lúpus eritematoso sistêmico é uma doença inflamatória, autoimune e multisistêmica (YEOH; DIAS; ISENBERG, 2018). A doença acomete mais mulheres do que homens e a idade de diagnóstico é mais comumente descrita na terceira e quarta décadas de vida (DIAS; ISENBERG, 2014). Em acordo com a literatura, os dados do nosso trabalho revelaram que a doença atinge mais mulheres, foram selecionados 33 pacientes do sexo feminino e somente 2 do sexo masculino. Em relação aos anticorpos antinucleares, 34 pacientes apresentaram FAN (fator antinúcleo) positivo, novamente de acordo com os dados da literatura.

ATP e adenosina são importantes moléculas de sinalização na imunidade e inflamação. Em nosso trabalho encontramos concentração de ATP aumentada no soro dos pacientes com LES, possivelmente associado com o status pró-inflamatório da doença. O nível de ATP e outros nucleotídeos pode ser regulado durante resposta imune e inflamatória através de ectoenzimas. A ectoenzima NTPDase converte ATP/ADP em AMP possuindo um importante papel imunorregulatório (BOURS et al., 2006).

Neste trabalho avaliamos a atividade e a expressão da E-NTPDase em linfócitos de pacientes com LES. Os resultados mostraram aumento da atividade e expressão da E-NTPDase (CD39) nesses pacientes, indicando que esta enzima estaria envolvida na doença. Também encontramos uma correlação positiva entre a atividade e a expressão da CD39. O aumento da CD39 representaria um mecanismo compensatório, ajudando no controle da inflamação, já que esta enzima exerce efeitos anti-inflamatórios através da remoção de ATP ou por participar da geração de adenosina. Moncrieffe et al. (2010) encontraram aumento na expressão de CD39 nos linfócitos T em sítios de inflamação, sugerindo que o meio inflamatório acarreta na regulação positiva da CD39 de linfócitos T, agindo como um mecanismo para reduzir os efeitos inflamatórios e restaurar a homeostasia (MONCRIEFFE et al., 2010).

Jaques et al. (2013) encontraram aumentada atividade da E-NTPDase em linfócitos de pacientes com artrite reumatoide, uma doença autoimune, sugerindo um esforço orgânico para diminuir os níveis de ATP extracelular e aumentar os níveis de adenosina (JAQUES et al., 2013). O trabalho de Herrath et al. (2014) concluiu que a expressão da CD39 está aumentada em ambas as populações de linfócitos CD4+T

e Treg no tecido sinovial de pacientes com AR indicando que a inflamação influencia a expressão de CD39 (HERRATH et al., 2014). Um estudo utilizando um modelo murino de lúpus, através da administração intraperitoneal de pristane, realizado com ratos nocaute para CD39 e ratos selvagens verificou que a deleção da CD39 resulta em altos níveis de anticorpos anti-RNP em resposta ao pristane. Em relação ao comportamento dos linfócitos T (expansão de linfócitos T efetor e linfócitos Th17), foi notado que estas alterações estavam presentes independente da administração de pristane, o que poderia ser visto como uma predisposição para a inflamação e autoimunidade, resultado da perda da atividade da ectonucleotidase (KNIGHT et al., 2018).

Também avaliamos a atividade e expressão da E-NTPDase em pacientes em duas fases da doença, remissão e exacerbação. Não encontramos diferenças entre esses dois grupos na atividade e na expressão da CD39. O que poderia ser explicado pela presença constante de autoanticorpos e persistentes anormalidades na tolerância mesmo durante a fase de remissão, demonstrando que este desbalanço está presente independente do estágio da doença (YURASOV et al., 2006).

Avaliamos a expressão da enzima E-5'-nucleotidase nos pacientes com LES, porém não encontramos nenhuma diferença entre os pacientes e o grupo controle. Outros trabalhos com pacientes com LES encontraram reduzida atividade (STOLK et al., 1999) e expressão (DONG-MEI et al., 2010) dessa enzima, infelizmente no nosso trabalho o número de pacientes em que foi avaliada a expressão da CD73 foi pequeno, o que poderia ter dificultado a visualização de alguma alteração nesta enzima.

A adenosina funciona como um segundo sinal durante a inflamação que provoca uma regulação negativa das atividades pró-inflamatórias do sistema imune para evitar danos colaterais e destruição de tecidos (SITKOVSKY; OHTA, 2005); possuindo um importante papel na modulação da resposta dos linfócitos (KOSHIBA et al., 1999). Em nosso estudo encontramos a concentração de adenosina diminuída no soro dos pacientes com LES, o que poderia ser devido ao aumento da atividade da E-ADA nos linfócitos, esses diminuídos níveis de adenosina possivelmente estão associados com o status inflamatório da doença.

A concentração extracelular de adenosina é regulada pela enzima ADA, a qual converte adenosina em inosina (FRANCO et al., 1997). Ao analisarmos a atividade da E-ADA em linfócitos de pacientes com LES, encontramos um aumento

dessa atividade. No trabalho de Jaques et al., a atividade da E-ADA encontra-se diminuída em linfócitos de pacientes com AR, sugerindo que esta diminuição poderia ser uma resposta dinâmica dos linfócitos na tentativa de aumentar as concentrações de adenosina (JAQUES et al., 2013). Em pacientes com EM a atividade da E-ADA em linfócitos também encontra-se diminuída, resultando em um mecanismo compensatório para diminuir a inflamação e a resposta imune nesses pacientes (SPANVELLO et al., 2010). Já no trabalho de Hitoglou et al. (2001), com pacientes com LES, encontrou-se aumentada atividade da ADA total no soro e em linfócitos desses pacientes, correlacionados com o aumento da atividade da ADA_{total}/ADA₂ no soro e ADA_{total}/ADA₁ em linfócitos (HITOGLOU et al., 2001). A regulação positiva da ADA pode ser associada com o favorecimento da resposta imune Th1, resposta está associada com um status pró-inflamatório (YONEYAMA et al., 2004). Podemos sugerir que o aumento da atividade da E-ADA nos pacientes com LES poderia ser responsável pela manutenção do estado inflamatório destes pacientes. Visto que em pacientes com LES existe uma elevação da razão Th1/Th2 (WONG et al., 2000). Analisamos também a atividade da E-ADA em duas fases da doença, remissão e recaída, porém não encontramos diferenças entre os dois grupos.

A ADA possui uma ampla distribuição tecidual, presente inclusive no soro, possuindo um papel crucial no desenvolvimento e manutenção do sistema imune normal (SAGHIRI et al., 2012). Neste trabalho determinamos a atividade da ADA no soro dos pacientes com LES, e encontramos uma atividade diminuída dessa enzima nos pacientes com LES quando comparados ao controle. O trabalho de Torgutalp et al. (2017) encontrou uma positiva correlação entre a atividade da ADA no soro com a atividade inflamatória em hepatite autoimune (TORGUTALP et al., 2017). Aumentada atividade da ADA tem sido mostrada no soro de algumas doenças autoimunes como AR (HITOGLOU et al., 2001), doença de Crohn (MAOR et al., 2011) e inclusive em LES (SAGHIRI et al., 2012). A isoenzima predominante no soro é a ADA₂, e uma significativa fonte dessa enzima são os macrófagos (CONLON; LAW, 2004). Defeitos na ADA₂ tem sido ligado a prejudicada polarização de macrófagos M2 in vitro, um fenótipo que acreditava-se ser em grande parte anti-inflamatório, mas também pode levar à fibrose durante reparo e regeneração do fígado (JIANG et al., 2018). Macrófagos de pacientes com LES apresentam defeito na atividade fagocítica (KUROIWA; LEE, 1998), poderíamos supor que a atividade da ADA está alterada devido a estes defeitos nos macrófagos destes pacientes.

Para excluir o efeito de algumas medicações utilizadas no tratamento do LES, avaliamos *in vitro* o efeito desses fármacos na atividade das enzimas E-NTPDase e E-ADA em amostras de voluntários saudáveis e não encontramos nenhuma alteração significativa; sugerindo que estes fármacos, nas concentrações testadas, não são responsáveis pelas alterações destas enzimas. Porém salientamos que os efeitos *in vivo* podem ser diferentes dos testes *in vitro*.

Durante a realização deste trabalho encontramos lacunas na literatura acerca do envolvimento do ATP, seus receptores e a enzima NTPDase no LES. Portanto, escrevemos uma revisão englobando estes assuntos, o que gerou algumas conclusões. O ATP exerce uma variedade de efeitos nas células imunes, via receptores P2 (DI VIRGILIO; BOEYNAEMS; ROBSON, 2009); apresentando envolvimento em algumas alterações presentes no LES como a perda da tolerância imune e a ativação do P2X7/inflamassomo, a qual é associada a inflamação e consequentemente a manifestações da doença. O P2X7 parece contribuir para o estado inflamatório do LES, por outro lado a CD39 exerce um efeito protetor contra a patogênese devido seus efeitos anti-inflamatórios.

Por fim, demonstramos assim, que a atividade e expressão da E-NTPDase estão alteradas em linfócitos de pacientes com LES, bem como a atividade da ADA em linfócitos e soro desses pacientes. Concluindo que estas enzimas têm importante papel na modulação das respostas inflamatória e imune nos pacientes com LES. Porém mais estudos são necessários sobre LES e sistema purinérgico para um melhor entendimento desta patologia e assim encontrar melhores tratamentos.

5 CONCLUSÕES

- Os níveis de ATP estão aumentados no soro dos pacientes com LES evidenciando o status inflamatório dessa doença, já os níveis de adenosina estão diminuídos e poderiam representar o impacto do aumento da atividade da E-ADA nos linfócitos e também poderia ser correlacionado com o status inflamatório do LES.
- O aumento na atividade e expressão da enzima E-NTPDase nos linfócitos de pacientes com LES sugere um mecanismo para diminuir os níveis de ATP pró-inflamatório nesses pacientes.
- O aumento da atividade da E-ADA em linfócitos de pacientes com LES pode ser associado com a manutenção do estado inflamatório desses pacientes, já que o aumento da E-ADA diminui os níveis de adenosina, molécula com propriedades anti-inflamatórias.
- Uma reduzida atividade da ADA no soro de pacientes lúpicos poderia ter relação com o defeito nos macrófagos apresentados por estes pacientes, já que estes são a principal fonte de ADA2, que é a enzima predominante no soro.
- Através do manuscrito de revisão concluímos que enquanto a ativação do receptor P2X7 via ATP parece contribuir para a patogênese do LES, a CD39 exibe um efeito contrário, ou seja protetor.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “Estudo da atividade das enzimas E-NTPDase, ecto-adenosina desaminase e acetilcolinesterase em linfócitos de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Instituição/ Departamento: Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFSM

Telefone e endereço postal: (55) 3220-9581 ou (55)9946-7672. Avenida Roraima, 1000, prédio 20, sala 4102, 97105-970- Santa Maria- RS

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “ESTUDO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS E-NTPDASE, E-ADENOSINA DESAMINASE E ACETILCOLINESTERASE EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO”.

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, de forma voluntária, tendo o direito de desistir a qualquer momento. Não haverá nenhuma forma de compensação financeira e não haverá nenhum custo para você.

Objetivo: a pesquisa avaliará a atividade de algumas substâncias que compõem o sangue de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e de pessoas sem qualquer outra doença, para melhor entendermos sobre esta doença e assim obtermos informações capazes de futuramente auxiliar no controle e novos tratamentos.

Procedimento e riscos: a pesquisa consistirá na coleta de sangue podendo ocorrer o risco de um pequeno desconforto devido à picada da agulha, e do local da coleta ficar dolorido ou arroxeadado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde.

Benefícios: os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante e consiste apenas para ajudar em novos estudos sobre os mecanismos, evolução, controle e tratamento do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Confidencialidade: as informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

Eu,..... (assinatura do(a) participante da pesquisa), RG nº: após a leitura ou escuta da leitura deste documento, estou suficientemente informado, ficando claro que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade, bem como de esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto e de espontânea vontade, expresse minha concordância em participar do estudo.

.....
Assinatura do voluntário

Santa Maria,..... de de.....

.....
Assinatura do Responsável pelo estudo

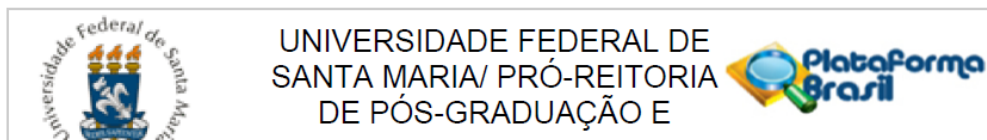
Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com os pesquisadores:

Daniela Leal – (055) 3220-9581

Lara Becker – (055) 9156-6249

Comitê de Ética em Pesquisa: Avenida Roraima, 1000- Prédio da Reitoria- 7º andar- sala 702, Cidade Universitária- Bairro Camobi- 97105-900- Santa Maria-RS. Tel: (055) 3220-9362, e-mail: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade das enzimas E-NTPDase, E-Adenosina Desaminase e Acetilcolinesterase em linfócitos de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico

Pesquisador: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 47532415.7.0000.5346

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

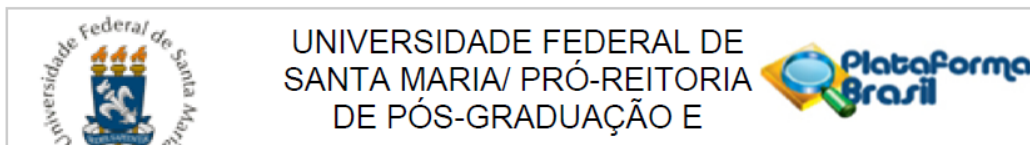
Número do Parecer: 1.213.658

Apresentação do Projeto:

Várias anormalidades têm sido relatadas em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) em relação às citocinas circulantes. Devido à importância das citocinas na regulação do sistema imune, estas moléculas não são interessantes somente na "fase efetora" da doença autoimune, na qual a autotolerância é quebrada, mas também na "fase de iniciação" da autoimunidade quando a resposta imune duradoura contra autoantígenos é gerada. Para uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na resposta inflamatória e autoimune, será determinada a atividade das enzimas AChE, ENTPDase e E-ADA em linfócitos de pacientes com LES, selecionados nos ambulatórios de reumatologia do Hospital Universitário de Santa Maria, bem como a quantificação de diferentes citocinas no soro destes pacientes.

No momento da consulta (Ambulatórios A e B- Reumatologia do Hospital Universitário de Santa Maria) o paciente será convidado a participar do estudo, sendo colhida uma amostra de sangue para análise dos parâmetros a serem estudados. Estes dados serão comparados com indivíduos saudáveis, os quais serão selecionados através de consulta a banco de dados, para análise de resultado dos testes laboratoriais solicitados rotineiramente. Após a verificação dos exames e identificação do indivíduo que fará parte do grupo controle será buscado junto ao registro destes

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



Continuação do Parecer: 1.213.658

pacientes telefone e/ou endereço (residentes em Santa MariaRS) para contato e posterior convite à pesquisa. Caso o convite para participação seja aceito, será marcada uma data e hora para coleta domiciliar e aplicação do TCLE.

Serão analisadas 60 amostras de sangue, sendo 30 de pacientes com diagnóstico de Lúpus Eritematoso sistêmico (ambos os sexos) e 30 de indivíduos controles (ambos os sexos), sabidamente saudáveis e na mesma faixa etária priorizada para o grupo em teste. O n amostral foi calculado levando em consideração a incidência de casos de Lúpus no Brasil a população da cidade de Santa Maria.

Todas as variáveis serão testadas para normalidade de distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos serão analisadas pelo teste t de Student, considerando-se significativas quando $p < 0,05$.

Objetivo da Pesquisa:

GERAL: avaliar a atividade das enzimas AChE, E-NTPDase e E-ADA em linfócitos de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos na resposta anti-inflamatória e autoimune nestes pacientes.

ESPECÍFICOS:

Verificar a atividade e a expressão da enzima E-NTPDase em linfócitos de pacientes diagnosticados com Lúpus Eritematoso sistêmico.

Determinar a atividade da E-Adenosina desaminase em linfócitos de pacientes com LES. Verificar a atividade da enzima Acetilcolinesterase em linfócitos de pacientes com LES. Quantificar os níveis de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina no soro dos referidos pacientes.

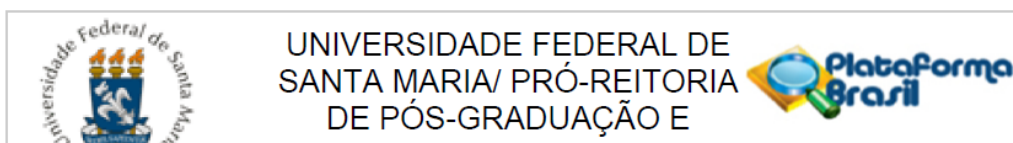
Verificar a expressão dos receptores P2X7 em linfócitos de pacientes com LES.

Quantificar citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL17 A, TNF e IFN-) no soro destes pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: pequeno desconforto devido à picada da agulha, e do local da coleta ficar dolorido ou arroxeadado, voltando ao normal em poucos dias.

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



Continuação do Parecer: 1.213.658

BENEFÍCIOS: indiretos através do conhecimento gerado sobre mecanismos, evolução, controle e tratamento do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta termo de confidencialidade, TCLE, folha de rosto, autorização institucional e registro do projeto.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

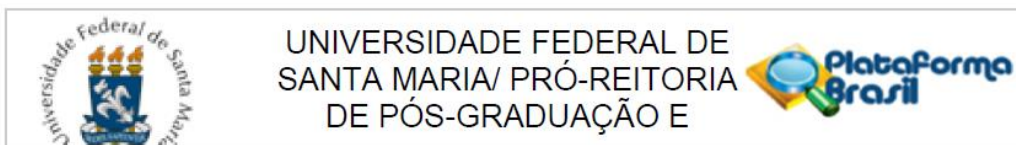
Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	24/08/2015 11:49:46	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.docx	24/08/2015 11:46:29	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	28/08/2015 11:26:49	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_558643.pdf	28/08/2015 11:28:40		Aceito

Situação do Parecer:

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



Continuação do Parecer: 1.213.658

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 03 de Setembro de 2015

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

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

ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

30/11/2018

Gmail - Successfully received: submission ATP signaling and NTPDase in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) for Immunobiology



Lara Becker <laravbecker@gmail.com>

Successfully received: submission ATP signaling and NTPDase in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) for Immunobiology

1 mensagem

Immunobiology <EvisSupport@elsevier.com>

30 de novembro de 2018 21:28

Responder a: IMBIO@elsevier.com

Para: laravbecker@gmail.com

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: IMBIO_2018_98

Title: ATP signaling and NTPDase in Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

Journal: Immunobiology

Dear Dr. Becker,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Immunobiology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=IMBIO and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Immunobiology

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. **Cellular and Molecular Immunology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2005.
- ABBRACCHIO, M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII : Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors : From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 281–341, 2006.
- AHMED, S.; ANOLIK, J. H. B-cell Biology and Related Therapies in Systemic Lupus Erythematosus. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 109–130, 2010.
- AIRAS, L. CD73 and Adhesion of B-Cells to Follicular Dendritic Cells. **Leukemia & Lymphoma**, v. 29, n. 1–2, p. 37–47, 1998.
- ALARCON-RIQUELME, M. E. Recent Advances in the Genetics of Autoimmune Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1110, p. 1–9, 2007.
- ALUNNO, A. et al. Balance between Regulatory T and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus : The Old and the New. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2012, p. 5–9, 2012.
- ALVARADO-SÁNCHEZ, B. et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Autoimmunity**, v. 27, n. 2, p. 110–118, 2006.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842–62, 2012.
- ANTONIOLI, L. et al. Immunity , inflammation and cancer : a leading role for adenosine. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 842–857, 2013a.
- ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355–367, 2013b.
- ARAÚJO, A et al. Expressões e sentidos do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Estudos de Psicologia (Natal)**, v. 12, n. 2, p. 119-127, 2007.
- ASWAD, F.; KAWAMURA, H.; DENNERT, G. High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 5, p. 3075–3083, 2005.
- BALDWIN, S. A. et al. The equilibrative nucleoside transporter family , SLC29.

Pflügers Archives : European Journal of Physiology, v. 447, n. 5, p. 735–743, 2004.

BLUME, C. et al. Autoimmunity in CD73 / Ecto-5' Nucleotidase Deficient Mice Induces Renal Injury. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 1–14, 2012.

BORSELLINO, G. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1225–1233, 2007.

BOSCH, X. Systemic Lupus Erythematosus and the Neutrophil. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 8, p. 758–760, 2011.

BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.

BROWNING, J. L. B cells move to centre stage : novel opportunities for autoimmune disease treatment. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 7, p. 564–576, 2006.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. **Pharmacological Reviews.**, v. 58, n. 1, p. 58–86, 2006.

CAMBIER, J. C. et al. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? **Nature Reviews. Immunology**, v. 7, n. 8, p. 633–643, 2007.

CHAVELE, K.; EHRENSTEIN, M. R. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **FEBS Letters**, v. 585, n. 23, p. 3603–3610, 2011.

CHROBAK, P. et al. CD73 Plays a Protective Role in Collagen-Induced Arthritis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 6, p. 2487–2492, 2015.

CHURCH, L. D.; COOK, G. P.; MCDERMOTT, M. F. Primer : inflammasomes and interleukin 1 β in inflammatory disorders. **Nature Clinical Practice. Rheumatology**, v. 4, n. 1, p. 34–42, 2008.

CIGNI, A. et al. Interleukin 1, interleukin 6, interleukin 10, and tumor necrosis factor α in active and quiescent systemic lupus erythematosus. **Journal of Investigative Medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 62, n. 5, p. 825–9, 2014.

CONLON, B. A.; LAW, W. R. Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 1, p. 14–20, 2004.

COOPER, G. S. et al. Hormonal and Reproductive Risk Factors for Development of

- Systemic Lupus Erythematosus Results of a Population-Based , Case – Control Study. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 7, p. 1830–1839, 2002.
- COSMI, L. et al. Human CD8+ CD25 + thymocytes share phenotypic and functional features with CD4 + CD25 + regulatory thymocytes. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4107–4114, 2003.
- COURTNEY, P. A. et al. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus : relations with disease activity , antibodies to double stranded DNA , and neutropenia. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 58, n. 5, p. 309–314, 1999.
- COUTANT, F.; MIOSSEC, P. Altered dendritic cell functions in autoimmune diseases: Distinct and overlapping profiles. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 12, p. 703–715, 2016.
- CRIMEEN-IRWIN, B. et al. Failure of immune homeostasis the consequences of under and over reactivity. **Current Drug Targets. Immune, endocrine and metabolic disorders**, v. 5, n. 4, p. 413–422, 2005.
- CRISPÍN, J. C. et al. Systemic Lupus erythematosus: new molecular targets. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.66, n.3, p. iii65-69, 2007.
- CRISPÍN, J. C. et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 2, p. 47–57, 2010.
- CSÓKA, B. et al. Adenosine A 2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. **FASEB journal**, v. 22, n. 10, p. 3491–3499, 2008.
- CVETANOVICH, G. L.; HAFLER, D. A. Human Regulatory T Cells in Autoimmune Diseases. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 6, p. 753–760, 2010.
- DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257–1265, 2007.
- DEAGLIO, S.; ROBSON, S. C. Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. **Advances in Pharmacology**, v. 61, p. 301–332, 2011.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 3, p. 205–209, 2005.
- DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 9, p. 465–472, 2007.

DI VIRGILIO, F.; BOEYNAEMS, J. M.; ROBSON, S. C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 507–513, 2009.

DI VIRGILIO, F.; GIULIANI, A. L. Purinergic signalling in autoimmunity: A role for the P2X7R in systemic lupus erythematosus? **Biomedical Journal**, v. 39, n. 5, p. 326–338, 2016.

DIAS, S. S.; ISENBERG, D. A. Advances in systemic lupus erythematosus. **Medicine**, v. 42, n. 3, p. 126–133, 2014.

DONG-MEI, L. et al. The expression of CD73 in CD4+ regulatory T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. **Zhonghua nei ke za zhi**, v. 49, n. 9, p. 772–5, 2010.

DOSCH, M. et al. Mechanisms of ATP release by inflammatory cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–16, 2018.

DOURADO, M.; WONG, E.; HACKOS, D. H. Pannexin-1 Is Blocked by Its C-Terminus through a Delocalized Non-Specific Interaction Surface. **Plos One**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 2014.

DURCAN, L., PETRI, M. Immunomodulators in SLE: Clinical evidence and Immunologic actions. **Journal of Autoimmunity**, v. 74, p. 73-84, 2016.

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

DWYER, K. M. et al. cells denotes a regulatory memory phenotype. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 10, n. 11, p. 2410–2420, 2010.

ELTZSCHIG, H. K. et al. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation : coordination by extracellular nucleotide metabolism. **Blood**, v. 104, n. 13, p. 3986–3992, 2004.

ERNST, P. B.; GARRISON, J. C.; THOMPSON, L. F. Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 4, p. 1993–1998, 2010.

FELTEN, R. et al. Advances in the treatment of systemic lupus erythematosus: from back to the future and beyond. **Joint, Bone, Spine: Revue du Rhumatisme**. 2018.

FILACI, G. et al. Impairment of CD8 + T Suppressor Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. :**

1950), v. 166, n. 10, p. 6452–6457, 2001.

FLETCHER, J. M. et al. CD39+Foxp3+ Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 11, p. 7602–7610, 2009a.

FLETCHER, J. M. et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 11, p. 7602–7610, 2009b.

FORTUNA, G.; BRENNAN, M. T. Systemic Lupus Erythematosus Epidemiology, Pathophysiology, Manifestations, and Management. **Dental Clinics of North America**, v. 57, n. 4, p. 631–655, 2013.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 283–294, 1997.

FREDHOLM, B. B. Adenosine , an endogenous distress signal , modulates tissue damage and repair. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1315–1323, 2007.

GAKIS, C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2 : diagnostic and biological role. **The European Respiratory Journal**, v. 9, n. 4, p. 632–633, 1996.

GALLUCCI, S.; LOLKEMA, M.; MATZINGER, P. Natural adjuvants : Endogenous activators of dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1249–1255, 1999.

GALLUCCI, S.; MATZINGER, P. Danger signals : SOS to the immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 1, p. 114–119, 2001.

GARCIA, G. E. et al. Adenosine A2A Receptor Activation and Macrophage-mediated Experimental Glomerulonephritis. **FASEB journal**, v. 22, n. 2, p. 445–454, 2008.

GAY, B. D. et al. Receptor Editing : An Approach by Autoreactive B Cells to Escape Tolerance. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 4, p. 999–1008, 1993.

GRANT, C. R. et al. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 59, n. 3, p. 1007–1015, 2014.

GRAY, J. H.; OWEN, R. P.; GIACOMINI, K. M. The concentrative nucleoside transporter family , SLC28. **Pflügers Archives : European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 728–734, 2004.

GREEN, D. R. et al. Immunogenic and tolerogenic cell death. **Nature Reviews. Immunology**, v. 9, n. 5, p. 353–363, 2009.

GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. CD39 , NTPDase 1 , is attached to the plasma

membrane by two transmembrane domains . Why ? **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 391–398, 2006.

HAKKIM, A. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 21, p. 9813–9818, 2010.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and Cloning of a Soluble ATP-Diphosphohydrolase (Apyrase) from Potato Tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 218, n. 3, p. 916–923, 1996.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. Regulation of inflammation by adenosine. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 85, p. 1–8, 2013.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine : an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 33–39, 2004.

HASKÓ, G.; PACHER, P. Regulation of Macrophage Function by Adenosine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 4, p. 865–869, 2012.

HENSON, P. M.; HUME, D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 5, p. 244–250, 2006.

HERRATH, J. et al. Surface expression of CD39 identifies an enriched Treg-cell subset in the rheumatic joint, which does not suppress IL-17A secretion. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 10, p. 2979–2989, 2014.

HITOGLOU, S. et al. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 6, p. 411–6, 2001.

HOFFMAN, R. W. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v. 113, p. 4–13, 2004.

HOSKIN, D. W. et al. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). **International Journal of Oncology**, v. 32, n. 3, p. 527–535, 2008.

HUNG, T. et al. The Ro60 Autoantigen Binds Endogenous Retroelements and Regulates Inflammatory Gene Expression. **Science**, v. 350, n. 6259, p. 455–459, 2015.

HUTLOFF, A. et al. Involvement of Inducible Costimulator in the Exaggerated Memory B Cell and Plasma Cell Generation in Systemic Lupus Erythematosus.

Arthritis and Rheumatism, v. 50, n. 10, p. 3211–3220, 2004.

JACOBI, A. M. et al. Phenotypic Characterization of Autoreactive B Cells — Checkpoints of B Cell Tolerance in Patients with Systemic Lupus Erythematosus.

PloS One, v. 4, n. 6, p. e5776, 2009.

JAQUES, J. A. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 5, p. 395–9, 2013.

JERNE, N. K. The somatic generation of immune recognition. 1971. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 5, p. 1234–1242, 2004.

JIANG, Z. G. et al. Serum activity of macrophage-derived adenosine deaminase 2 is associated with liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 7, p. 1170–1172, 2018.

JIN, J. et al. Distribution of P2Y receptor subtypes on haematopoietic cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, n. 5, p. 789–794, 1998.

JIN, X. et al. Altered expression of CD39 on memory regulatory T cells in type 1 diabetes patients. **Journal of Diabetes**, 2018.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201–212, 2011.

KAHLENBERG, J. M. et al. Neutrophil Extracellular Trap-Associated Protein Activation of the NLRP3 Inflammasome Is Enhanced in Lupus Macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 3, p. 1217–1226, 2013.

KAKU, H. et al. A novel mechanism of B-cell mediated immune suppression through CD73-expression and adenosine production. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 193, n. 12, p. 5904–5913, 2014.

KALJAS, Y. et al. Human adenosine deaminases ADA1 and ADA2 bind to different subsets of immune cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 3, p. 555–570, 2017.

KARASSA, F. B.; TRIKALINOS, T. A.; IOANNIDIS, J. P. A. The role of Fc c RIIA and IIIA polymorphisms in autoimmune diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 5, p. 286–291, 2004.

KING, A. E. et al. Nucleoside transporters : from scavengers to novel therapeutic targets. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 8, p. 416–425, 2006.

KNIGHT, J. S. et al. Ectonucleotidase-Mediated Suppression of Lupus Autoimmunity and Vascular Dysfunction. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1322, p. 1–11, 2018.

- KOSCEC, M. et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 4, p. 2033–2041, 1997.
- KOSHIBA, M. et al. Patterns of A_{2A} Extracellular Adenosine Receptor Expression in Different Functional Subsets of Human Peripheral T Cells . Flow Cytometry Studies with Anti-A_{2A} Receptor Monoclonal Antibodies. **Molecular Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 614–624, 1999.
- KUROIWA, T.; LEE, E. G. Cellular interactions in the pathogenesis of lupus nephritis: The role of T cells and macrophages in the amplification of the inflammatory process in the kidney. **Lupus**, v. 7, n. 9, p. 597–603, 1998.
- KYOGOKU, C. et al. Genetic Association of the R620W Polymorphism of Protein Tyrosine Phosphatase PTPN22 with Human SLE. **American Journal of Human Genetics**, v. 75, n. 3, p. 504–507, 2004.
- LEE, Y. H. et al. Overall and cause-specific mortality in systemic lupus erythematosus : an updated meta-analysis. **Lupus**, v. 25, n. 7, p. 727–34, 2016.
- LÉVESQUE, S. A. et al. NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 1473–1485, 2010.
- LIBERAL, R. et al. CD39 mediated regulation of Th17-cell effector function is impaired in juvenile autoimmune liver disease. **Journal of Autoimmunity**, v. 72, p. 102–112, 2016.
- LIN, S. C. et al. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 37, n. 12, p. 987–996, 2007.
- LINDEN, J.; CEKIC, C. Regulation of Lymphocyte Function by Adenosine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2097–2103, 2012.
- LINKER-ISRAELI, M.; QUISMORIO, F. J.; HORWITZ, D. CD8⁺ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4⁺ cells to support autoantibody synthesis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 33, n. 8, p. 1216–1225, 1990.
- LIU, W.; ALMO, S. C.; ZANG, X. Co-stimulate or Co-inhibit Regulatory T Cells , Which Side to Go ? Co-stimulate or Co-inhibit Regulatory T Cells , Which Side to Go ? **Immunological Investigations**, v. 45, n. 8, p. 813–831, 2016.
- LOCOVEI, S.; WANG, J.; DAHL, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP

through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. **FEBS Letters**, v. 580, p. 239–244, 2006.

LÓPEZ-CASTEJÓN, G.; PELEGRÍN, P. Current status of inflammasome blockers as anti-inflammatory drugs. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 7, p. 995–1007, 2012.

LOZA, M. J. et al. T –cell specific defect in expression of the NTPDase CD39 as a biomarker for lupus. **Cellular Immunology**, v. 271, n. 1, p. 110–117, 2011.

MANDAPATHIL, M. et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+regulatory T Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7176–7186, 2010.

MAOR, I. et al. Adenosine deaminase activity in patients with Crohn ' s disease : distinction between active and nonactive disease. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 23, n. 7, p. 598–602, 2011.

MARTINEZ-NAVIO, J. M. et al. Adenosine deaminase potentiates the generation of effector , memory , and regulatory CD4+ T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 1, p. 127–136, 2011.

MEDINA-QUIÑONES, C. V. et al. Analysis of Complete Remission in Systemic Lupus Erythematosus Patients Over a 32-Year Period. **Arthritis Care & Research**, v. 68, n. 7, p. 981–987, 2016.

MOK, C. C.; LAU, C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 7, p. 481–490, 2003.

MONCRIEFFE, H. et al. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 1, p. 134–143, 2010.

MORANDI, F. et al. The Role of Extracellular Adenosine Generation in the Development of Autoimmune Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–10, 2018.

MORANDINI, A. C.; SAVIO, L. E. B.; COUTINHO-SILVA, R. The role of P2X7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 4, p. 169–77, 2014.

MOULTON, V. R. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2279, p. 1–21, 2018. MUNOZ, L. E. et al.

Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 17, n. 5,

p. 371–375, 2008.

MUÑOZ, L. E. et al. Autoimmunity and chronic inflammation - Two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 1, p. 38–42, 2010a.

MUÑOZ, L. E. et al. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 5, p. 280–289, 2010b.

NORTH, R. A. P2X receptors. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 371, n. 1700, p. pii: 20150427, 2016.

OHTA, A. et al. The development and immunosuppressive functions of CD4 + CD25 + FoxP3 + regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 190, p. 1–12, 2012.

OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 304, p. 1–9, 2014.

OLSEN, N. J.; KARP, D. R. Autoantibodies and SLE—the threshold for disease. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 10, n. 3, p. 181–186, 2014.

ONISHI, R. M.; GAFFEN, S. L. Interleukin- 17 and its target genes : mechanisms of interleukin- 17 function in disease. **Immunology.**, v. 129, n. 3, p. 311–321, 2010.

PACHECO, R. et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9583–9588, 2005.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133–1141, 2005.

PENG, S. L. Altered T and B lymphocyte signaling pathways in lupus. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 3, p. 179–183, 2009.

PERL, A. et al. Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 7, p. 360–367, 2004.

PERNIOK, A. et al. High levels of circulating early apoptic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 7, n. 2, p. 113–118, 1998.

PETRI, M. et al. Derivation and Validation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2677–2686, 2012.

PODOLSKA, M. J. et al. Inflammatory etiopathogenesis of systemic lupus

erythematosus: an update. **Journal of Inflammation Research**, v. 8, p. 161–71, 2015.

POLACHINI, C. R. N. et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. **Neuroscience**, v. 266, p. 266–274, 2014.

PONS-ESTEL, G. J.; UGARTE-GIL, M. F.; ALARCÓN, G. S. Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 13, n. 8, p. 799–814, 2017.

RASKOVALOVA, T. et al. Adenosine-Mediated Inhibition of Cytotoxic Activity and Cytokine Production by IL-2 / NKp46-Activated NK cells: involvement of protein Kinase A isozyme I (PKA I). **Immunologic Research**, v. 36, n. 1–3, p. 91–99, 2006.

RETAMAL, M. A. et al. Possible Involvement of Different Connexin43 Domains in Plasma Membrane Permeabilization Induced by Ischemia-Reperfusion. **Journal of Membrane Biology**, v. 218, n. 1–3, p. 49–63, 2007.

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

SAGHIRI, R. et al. Serum adenosine deaminase activity in patients with systemic lupus erythematosus: A study based on ADA1 and ADA2 isoenzymes pattern. **Rheumatology International**, v. 32, n. 6, p. 1633–1638, 2012.

SANDILOS, J. K. et al. Pannexin 1 , an ATP Release Channel , Is Activated by Caspase Cleavage of Its Pore-associated C-terminal Autoinhibitory region. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 14, p. 11303–11311, 2012.

SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 511–518, 2014.

SCHECKENBACH, K. E. L. et al. Connexin Channel-Dependent Signaling Pathways in inflammation. **Journal of Vascular Research**, v. 48, p. 91–103, 2011.

SCHENK, U. et al. ATP Inhibits the Generation and Function of Regulatory T Cells Through the Activation of Purinergic P2X Receptors. **Science Signaling**, v. 4, n. 162, p. ra12, 2011.

SESTAK, A. L. et al. Current status of lupus genetics. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 3, p. 1–9, 2007.

SESTER, D. P. et al. Deficient NLRP3 and AIM2 Inflammasome Function in

- Autoimmune NZB Mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 195, n. 3, p. 1233–1241, 2015.
- SHAH, K. et al. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 3, p. 1–10, 2010.
- SHAO, W.; COHEN, P. L. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2011.
- SHELLY, S.; BOAZ, M.; ORBACH, H. Prolactin and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 6–7, p. A465–A470, 2012.
- SHLOMCHIK, M. J. Review Sites and Stages of Autoreactive B Cell Activation and Regulation. **Immunity**, v. 28, n. 1, p. 18–28, 2008.
- SINAI, P. et al. T/B cell interactions are more transient in response to weak stimuli in SLE-prone mice. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 12, p. 3522–3531, 2014.
- SITKOVSKY, M. V et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 657–682, 2004.
- SITKOVSKY, M. V; OHTA, A. The ‘ danger ’ sensors that STOP the immune response : the A2 adenosine receptors ? **Trends in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 299–304, 2005.
- SOSINSKY, G. E. et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. **Channels**, v. 5, n. 3, p. 193–197, 2011.
- 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.
- STOLK, J. N. et al. Reduced purine 5'-nucleotidase activity in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus: results of a pilot study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 58, n. 2, p. 122–125, 1999.
- SUH, B.-C. et al. P2X 7 Nucleotide Receptor Mediation of Membrane Pore Formation and Superoxide Generation in Human Promyelocytes and Neutrophils. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 11, p. 6754–6763, 2001.
- TAS, S. W. et al. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 2, p. 216–221, 2006.
- TAYLOR, S. R. J. et al. P2X7 Deficiency Attenuates Renal Injury in Experimental

- Glomerulonephritis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 6, p. 1275–1281, 2009.
- TAYSI, S. et al. Serum adenosine deaminase and cytidine deaminase activities in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Chemical Laboratory in Medicine**, v. 40, n. 5, p. 493–495, 2002.
- THIEL, M.; CALDWELL, C. C.; SITKOVSKY, M. V. The critical role of adenosine A_{2A} receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 5, n. 6, p. 515–526, 2003.
- TIMÓTEO, M. A. et al. ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P_{2Y6} receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 2, p. 371–379, 2014.
- TORGUTALP, M. et al. Relationship between serum adenosine deaminase levels and liver histology in autoimmune hepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 21, p. 3876–3882, 2017.
- TSOKOS, G. C. et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 12, p. 716–730, 2016.
- TSOKOS, G. C.; BALOW, J. Immunology of Anergy and Systemic Lupus Erythematosus. In: SCHWARTZ, R. (Ed.). **Immunology of Anergy and Systemic Lupus Erythematosus**. Basel: Karger, 1984. p. 93–161.
- UNGERER, J. P. J. et al. Serum Adenosine Deaminase: Isoenzymes and Diagnostic Application. **Clinical Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1322–1326, 1992.
- VAN DER WEYDEN, M. B.; KELLEY, W. N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 18, p. 5448–5456, 1976.
- VILAR, M. J. P.; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, v. 11, p. 528–532, 2002.
- VINAPAMULA, K. S. et al. Serum Adenosine Deaminase as Inflammatory Marker in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR**, v. 9, n. 9, p. BC08-10, 2015.
- VITIELLO, L. et al. Immunoregulation through extracellular nucleotides. **Blood**, v. 120, n. 3, p. 511–518, 2012.
- VIVEKANANDHAN, S. et al. Adenosine deaminase and 5' nucleotidase activities in peripheral blood T cells of multiple sclerosis patients. **Neurochemical Research**, v.

30, n. 4, p. 453–456, 2005.

VOLIN, M. V.; KOCH, A. E. Interleukin-18: A Mediator of Inflammation and Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 10, p. 745–751, 2011.

WALSH, K. P.; MILLS, K. H. G. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 11, p. 521–530, 2013.

WANG, N. et al. Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, n. 1, p. 35–50, 2013.

WONG, C. K. et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 9, n. 8, p. 589–593, 2000.

WONG, C. K. et al. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus : Implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 127, n. 3, p. 385–393, 2008.

WU, H. et al. Dysregulation of cell death and its epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2016.

YANG, C. A.; CHIANG, B. L. Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v. 61, p. 1–8, 2015.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008.

YEGUTKIN, G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 6, p. 473-497, 2014.

YEOH, S. A.; DIAS, S. S.; ISENBERG, D. A. Advances in systemic lupus erythematosus. **Medicine (United Kingdom)**, v. 46, n. 2, p. 84–92, 2018.

YIP, L. et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X 7 receptors. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 6, p. 1685–1693, 2009.

YONEYAMA, Y. et al. Plasma adenosine concentrations increase in women with hyperemesis gravidarum. **Clinica Chimica Acta**, v. 342, n. 1–2, p. 99–103, 2004.

YU, T. et al. Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release , P2X7 receptors , and FAK activation. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 298, n. 3, p. 457–464, 2010.

YURASOV, S. et al. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in

remission. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2255–2261, 2006.

ZAMANI, B.; JAMALI, R.; JAMALI, A. Serum adenosine deaminase may predict disease activity in rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 7, p. 1967–1975, 2012.

ZANIN, R. F. et al. Differential Macrophage Activation Alters the Expression Profile of NTPDase and Ecto-5'-Nucleotidase. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. e31205, 2012.

ZAVIALOV, A. V et al. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 2, p. 279–290, 2010.

ZAVIALOV, A. V; ENGSTRÖM, A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **The Biochemical Journal**, v. 391, n. pt1, p. 51–57, 2005.

ZHANG, L. et al. Adenosine 2A receptor is protective against renal injury in MRL / lpr mice. **Lupus**, v. 20, n. 7, p. 667–677, 2011.

ZHANG, P.; LU, Q. Genetic and epigenetic influences on the loss of tolerance in autoimmunity. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 5, p. 575–585, 2018.

ZHARKOVA, O. et al. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 56, n. suppl_1, p. i55–i66, 2017.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase : molecular structure and functional aspects. **The Biochemical Journal**, v. 285, n. pt 2, p. 345–365, 1992.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.