



**Luciana dos Santos Lopes**

**EFEITO DE UMA AZIDA ORGÂNICA SOBRE A ATIVIDADE DA NTPDase EM  
LINFÓCITOS HUMANOS**

Santa Maria, RS

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Luciana dos Santos Lopes**

**EFEITO DE UMA AZIDA ORGÂNICA SOBRE A ATIVIDADE DA NTPDase EM  
LINFÓCITOS HUMANOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Nanociências, do  
Curso de Pós-graduação em Nanociências – Área de  
Ciências Naturais e Tecnológicas, Centro  
Universitário Franciscano.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS

2009

**Luciana dos Santos Lopes**

**EFEITO DE UMA AZIDA ORGÂNICA SOBRE A ATIVIDADE DA NTPDase EM  
LINFÓCITOS HUMANOS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-graduação em Nanociências – Área de Ciências Naturais e Tecnológicas, Centro Universitário Franciscano, pela seguinte Banca Examinadora:

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2009.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Bitencourt Rosa Leal – Orientador (UNIFRA)

Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Virgínia Cielo Rech

Santa Maria, RS, 19 de outubro de 2009

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação a minha filha Esther, meu amor maior.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade de ter vencido mais uma etapa em minha vida.

Ao meu marido Lauro e minha filha Esther, pelos momentos de paciência e ausência, não somente de corpo, mas também de espírito.

Aos meus pais, Ernesto e Marlene, pelo apoio em todos os momentos.

A minha irmã Suzana, pela força de sempre, nunca medindo esforços para me ajudar.

A minha orientadora Daniela, pela paciência, pelo aprendizado e pelo tempo disponibilizado.

A coordenadora do Mestrado em Nanociência Solange, que sempre esteve disponível para me ajudar, e que admiro e respeito muito.

A professora Marta, que muito me ajudou e segue sempre incansável nessa caminhada.

Ao professor Oscar e o colega Diego que disponibilizaram as famosas “azidas orgânicas”.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Isabel, Liliani, Gabriela, Daniele e especialmente ao João, meu braço direito e esquerdo.

Ao meu grande amigo e colega Luciano, pela parceria, pela amizade e por ser simplesmente a pessoa que é.

A minha amiga Rafaella, por todas as vezes que me ajudou nesse mestrado, sempre se mostrando disponível quando precisei.

Ao meu chefe e colega Elehu pelo incentivo, pela disponibilidade e compreensão em vários momentos.

A todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, pela tolerância nos momentos de ausência e pelo trabalho que inúmeras vezes fizeram por mim.

As minhas amigas em especial, Norma, Renata e Sandra Beck, pelas inúmeras vezes que me ouviram e pelas palavras de incentivo e amizade nessa caminhada.

E a todos, que de alguma forma, contribuíram para que o meu objetivo final fosse alcançado.

*“Quem, de três milênios,  
Não é capaz de se dar conta,  
Vive na ignorância, na sombra  
À mercê dos dias, do tempo.”*

Johann Wolfgang von Goethe

## RESUMO

A NTPDase (ecto-apirase, ecto-difosfohidrolase, CD39, EC 3.6.1.5) hidrolisa nucleotídeos tri e/ou difosfatados. É uma ectonucleotidase, identificada como antígeno de superfície de células linfóides, cuja maior expressão leva a um aumento das atividades de ATPase e ADPase nestas células. Os inibidores de ecto-nucleotidases podem representar valiosas ferramentas terapêuticas para amplificar os efeitos biológicos dos nucleotídeos liberados no meio extracelular, uma vez que estes induzem apoptose nos linfócitos, causando um estado de imunodepressão. Sabe-se através da literatura que azida sódica, quando utilizada em concentrações em torno de 20mM, produz uma significativa inibição na hidrólise de ATP e ADP causada por esta enzima. As azidas são componentes químicos muito usados em sínteses orgânicas, sendo notavelmente estáveis em ambiente biológico. Este trabalho, procurou determinar os efeitos inibitórios de uma azida orgânica derivada do ácido acético na hidrólise de ATP e ADP, ou seja, na atividade da NTPDase de linfócitos humanos. Uma vez que alterações na atividade e distribuição desta enzima têm sido relatadas em várias condições patológicas, demonstrando sua participação na ativação do linfócito, acredita-se que a identificação de novos compostos inibidores da enzima NTPDase venha a contribuir em patologias onde há necessidade de uma imunossupressão, como em alergias e doenças auto-imunes. Após incubação dos linfócitos em meio contendo diferentes concentrações de azida orgânica, verificou-se uma inibição significativa na hidrólise do ADP quando utilizadas as concentrações de 10 e 20 mM, sendo esta de 50 e 77%, respectivamente. Não foram verificados efeitos inibitórios sobre a hidrólise do ATP. A azida orgânica alterou a hidrólise dos nucleotídeos da adenina difosfatados, indicando que esta substância poderia ser utilizada como um inibidor da NTPDase, cujo tipo de inibição causada seria mista.

**Palavras-chave:** NTPDase, Inibidores enzimáticos, Azidas orgânicas.

## **ABSTRACT**

The NTPDase (apirase-ect, ect-difosfohidrolaze, CD39, EC 3.6.1.5) hydrolyzes tri nucleotides and/or diphosphate. It is an ectonucleotidase, identified as the antigen surface of lymphoid cells, whose greatest expression leads to an increase in activity of ATPase and ADPase and these cells through the hydrolysis of ATP and ADP. The inhibitor of ecto-nucleotidases may represent valuable therapeutic tools to amplify the biological effects of extracellular nucleotides, since they induce apoptosis in lymphocytes, causing a state of immunosuppression. It is known through the literature that sodium azide produces a significant inhibition in the hydrolysis of ATP and ADP, caused this enzyme when it is used in concentrations around 20mM. The azides are chemical components widely used in organic synthesis, and remarkably stable in biological environment. The aim of this study was to determine the inhibitory effects of an organic azide derived from acetic acid in the hydrolysis of ATP and ADP, which is the activity of NTPDase of human lymphocytes. Since changes in distribution and activity of this enzyme have been reported in various pathological conditions, demonstrating its participation in the activation of lymphocyte, it is believed that the identification of new compounds inhibiting NTPDase will contribute to treatment of diseases where there is a need for immunosuppression, as allergies and autoimmune diseases. After incubation of lymphocytes in medium containing different concentrations of azide organic, there was a significant inhibition of ADP in the hydrolysis when used concentrations of 10 and 20 mM, and this of 50 and 77% respectively. Unverified inhibitory effects on the ATP hydrolysis with organic azide. A changed the hydrolysis of nucleotide adenine diphosphate, indicating that the substance could be used as an inhibitor of mixed NTPDase.

**Key-words:** NTPDase, enzyme inhibitors, organic azides.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Interação de ATP e NAD extracelular e seus metabólitos em diferentes receptores na superfície da célula (adaptado de HAAG et al., 2006) .....	20
Figura 2 – Inativação de purinas na superfície celular (YEGUTKIN, 2008) .....	21
Figura 3 – Topografia e propriedades catalíticas de membros da família E-NTPDase (ZIMMERMANN, 2000) .....	22
Figura 4 – Estrutura Química da Azida Orgânica sintetizada à partir do ácido acético (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O) .....	32
Figura 5 – Técnica de separação de linfócitos por gradiente de densidade (BÖYUM, 1968) .....	32
Figura 6 – Efeito <i>in vitro</i> de azida orgânica na atividade da NTPDase em linfócitos humanos. Os dados representam a média ± erro padrão da média para três experimentos diferentes. As barras negras representam a hidrólise do ATP a as cinzas, a hidrólise do ADP. <sup>a</sup> $p < 0,05$ comparado ao controle. <sup>b</sup> $p < 0,05$ comparado à concentração de 1 mM de azida. <sup>c</sup> $p < 0,01$ comparado ao controle .....	35
Figura 7 – Gráfico de Lineweaver–Burk para a hidrólise de ATP (◇) e ADP (◆) e <i>inset</i> V versus S, sem a presença do inibidor. A hidrólise do ATP e do ADP foi determinada usando substrato na faixa de 30–3000 μM (n=3 em triplicata) .....	38
Figura 8 – Estimativa do K <sub>i</sub> através de replot de Lineweaver-Burk (K <sub>m</sub> /app versus [I]). O valor de K <sub>i</sub> é estimado onde o gráfico intercepta o eixo x, sendo o eixo y=0. O valor de K <sub>i</sub> estimado para a azida orgânica foi 2,56 mM .....	40
Figura 9 – Plot para determinação do IC <sub>50</sub> da azida orgânica. O valor estimado para IC <sub>50</sub> foi 11,2 mM .....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Inibição da NTPDase pela azida sódica em diversas fontes citadas na literatura .....	36
Tabela 2 – Inibição provocada por diferentes concentrações de azida orgânica na atividade <i>in vitro</i> da NTPDase em linfócitos humanos com ADP como substrato .....	37
Tabela 3 – Porcentagem da atividade <i>in vitro</i> da NTPDase em linfócitos humanos com ATP como substrato em diferentes concentrações de azida orgânica .....	37
Tabela 4 – Parâmetros cinéticos encontrados para a NTPDase de linfócitos humanos ...	39
Tabela 5 – Valores de $K_m$ para a NTPDase citados na literatura em diversas fontes .....	39
Tabela 6 – Efeito da azida orgânica <i>in vitro</i> nos parâmetro cinéticos da NTPDase de linfócitos humanos para o substrato ADP .....	39
Tabela 7 – Valores de $K_i$ para alguns inibidores da NTPDase citados na literatura .....	41

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACRs – Regiões conservadas da apirase  
ADP – Adenosina difosfato  
ATP – Adenosina trifosfato  
APCs – Células apresentadoras de antígenos  
AMP – Adenosina monofosfato  
AZT – 3'-Ácido-2',3'-didesoxitimidina  
CD – Cluster differentiation  
E-NTPDases – Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases  
NK – Natural Killer  
EDTA – Etilenodiaminotetraacético  
E-NPP – Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase  
IL-2 – Interleucina 2  
ALL – Leucemia linfoblástica  
B-CLL – Leucemia linfocítica B crônica  
TCD4<sup>+</sup> – Célula T-auxiliar  
TCD8<sup>+</sup> – Célula T-citotóxica  
INF- $\gamma$  – Interferon gama  
IL-4 – Interleucina 4  
IL-5 – Interleucina 5  
IL-6 – Interleucina 6  
IL-10 – Interleucina 10  
UDP – Uridina difosfato  
UTP – Uridina trifosfato  
GTP – Guanosina trifosfato

CTP – Citidina trifosfato

TCA – Ácido tricloroacético

$K_m$  – Constante de Menten-Michaelis

IC50 – Concentração do inibidor que inibe 50% da atividade da enzima

F1 – Proteína periférica de membrana que compõe ATPases (domínio)

FoF1 – Complexo de proteínas que compõem ATPases

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	9
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1 NUCLEOTÍDEOS E SUA FUNÇÃO IMUNE .....	16
2.2 ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS .....	20
2.2.1 Família E-NTPDase .....	21
2.2.1.1 NTPDase1 (EC 3.6.1.5), NTPDase2 e NTPDase3 .....	22
2.2.1.2 NTPDase4 .....	23
2.2.1.3 NTPDase5 e NTPDase6 .....	23
2.2.1.4 NTPDase7 e NTPDase8 .....	24
2.2.2 Família E-NPP .....	24
2.2.3 Fosfatases alcalinas .....	24
2.2.4 Ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) .....	25
2.3 FUNÇÕES DA NTPDase NAS CÉLULAS LINFÓIDES .....	25
2.4 INIBIÇÃO DA NTPDase .....	27
2.4.1 Azida sódica como inibidora da NTPDase .....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1 REAGENTES UTILIZADOS .....	31
3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS .....	31
3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	31
3.4 OBTENÇÃO DAS AZIDAS .....	31
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NTPDase .....	32
3.5.1 Isolamento de células mononucleadas das amostras .....	32
3.5.2 Determinação de proteína .....	33
3.5.3 Hidrólise de ATP e ADP .....	33

3.6 ESTIMATIVA DO IC50 E PARÂMETROS CINÉTICOS .....	33
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os linfócitos humanos possuem em sua superfície a enzima NTPDase (ecto-apirase, ecto-difosfohidrolase, CD39, EC 3.6.1.5), responsável pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares como ATP e ADP e/ou outros di ou tri fosfatados. A NTPDase é um membro da família E-NTPDase e foi identificada como antígeno de superfície de células linfóides (CD39), sendo que sua maior expressão levaria a um aumento das atividades de ATPase e ADPase nestas células. O ATP extracelular possui efeitos citostáticos e citotóxicos em algumas células tumorais, por mecanismos ainda desconhecidos. Além disso, provoca liberação de histamina de mastócitos e a secreção de grânulos de neutrófilos e monócitos, enquanto inibe a função de macrófagos e a citotoxicidade mediada por células NK (DOMBROWSKI et al., 1998).

As moléculas de superfície celulares reconhecidas pelos anticorpos monoclonais são chamadas “antígenos”, uma vez que podem ser produzidos anticorpos contra elas, ou “marcadores”, porque identificam e discriminam diferentes populações celulares. Esses antígenos recebem designação CD (cluster differentiation). Esta classificação dos antígenos tem permitido a identificação de células da resposta imune, seus tipos de resposta e funções efetoras. Estas moléculas promovem interações e adesão célula-a-célula e traduzem sinais que levam à ativação de linfócitos (ABBAS et al., 2002). O CD39 (NTPDase) foi originalmente identificado como marcador de ativação linfóide, expresso em linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, células NK e células endoteliais (KANSAS et al., 1991).

A atividade da NTPDase associada ao CD39 está envolvida na rejeição de enxertos (ROBSON et al., 1996), na injúria esquêmica (CANDINAS et al., 1996), em perturbações oxidativas, servindo como mediadora extracelular na produção de citocinas em diversas respostas inflamatórias (ROBSON et al., 1997).

Através da determinação da atividade da NTPDase em linfócitos de pacientes imunodeprimidos, verificou-se um aumento em sua atividade, acompanhada por uma maior expressão de CD39 na superfície destas células (LEAL et al., 2005a), sugerindo um importante desempenho desta enzima no controle da função dos linfócitos. A atividade da NTPDase parece ser importante para a manutenção da resposta imune, mantendo concentrações adequadas de ATP extracelular, pois ele é essencial para certas funções imunológicas, mas também pode se tornar prejudicial quando induz apoptose nos linfócitos, aumentando o estado de imunodepressão.

Uma vez que alterações na atividade e distribuição desta enzima têm sido relatadas em várias condições patológicas, demonstrando sua participação na ativação do linfócito, acredita-se que a identificação de novos compostos inibidores da enzima NTPDase venha a contribuir em patologias onde há necessidade de uma imunossupressão, como em alergias e doenças auto-imunes.

Este trabalho teve como objetivo geral identificar novos inibidores da NTPDase. Especificamente, procurou-se verificar possíveis efeitos inibitórios de uma azida orgânica, sintetizada a partir do ácido acético, na atividade da NTPDase presente na superfície de linfócitos humanos normais e avaliar os parâmetros cinéticos da enzima frente a esse inibidor.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 NUCLEOTÍDEOS E SUA FUNÇÃO IMUNE

Os nucleotídeos e os nucleosídeos são importantes moléculas biológicas envolvidas em muitos processos biológicos (ANDERSON et al., 1997; ZIMMERMANN, 1999; ROBSON et al., 2006). Os nucleotídeos modulam várias funções teciduais, como o fluxo sanguíneo, produção de secreções, indução de inflamação e indução de reações imunes. Influenciam nos processos que afetam o metabolismo celular, na adesão, na ativação e na migração celular (LUTHJE, 1989). Dependendo do subtipo de receptores celulares ativados, eles podem disparar e mediar processos que afetam o metabolismo celular, os mecanismos de ativação, a migração e a adesão celular. Além disso, podem estar envolvidos em mecanismos de proteção celular, incluindo a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose, os quais ocorrem na aterosclerose, nas doenças neurodegenerativas e em várias doenças inflamatórias (ROBSON et al., 2006).

O ATP extracelular e seus metabólitos são reconhecidos por receptores purinérgicos presentes na superfície de diversas células (Figura 1). Existem duas famílias desses receptores – P1 e P2 – cujos membros são ativados pela adenosina e por ATP e ADP, respectivamente (BURNSTOCK, 2007).

Os nucleotídeos extracelulares, tais como ATP, ADP, UTP, UDP podem atuar como ativadores/agonistas em uma variedade de receptores de nucleotídeos (receptores P2), receptores P2 purínicos e ou receptores P2 pirimidínicos (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998). A ativação dos receptores P2 é controlada por ecto-nucleotidases (NTPDases) (ZIMMERMANN, 2000). Os nucleotídeos liberados do citoplasma de vários tipos de células, antes de serem hidrolisados por ectonucleotidases, devem interagir com receptores específicos da membrana plasmática, os purinoreceptores P2 (DI VIRGILIO et al., 2001; KUNAPULI et al., 2003).

As ações da adenosina são mediadas pela ativação de quatro subtipos de receptores conhecidos (A1, A2A, A2B e A3), pertencentes à família P1 de receptores purinérgicos que, por sua vez, são membros de uma superfamília de receptores compostos por sete regiões transmembrana e acoplados à proteína G (FREDHOLM et al., 1994). Esses receptores se caracterizam por apresentarem distribuição tecidual e perfil farmacológico bastante peculiar, sendo capazes de participar das respostas imune e inflamatória em tecidos lesados,

desempenhando um papel crucial nos efeitos benéficos induzidos pela adenosina, principalmente em casos de exarcebação dessas respostas (JACOBSON e GAO, 2006).

Os receptores A2 funcionam como se fossem sensores de atividade pró-inflamatória e agem como bloqueadores do excesso de resposta imune. A ligação da adenosina aos receptores A2A e A2B (acoplados a proteína G- família Gs) leva ao aumento dos níveis de AMP cíclico (AMPC) intracelular pela ativação da enzima adenilato ciclase, inibindo a atividade imune da célula (RASKOVALOVA et al., 2005). O receptor A2A possui alta afinidade por adenosina, ao contrário do receptor de baixa afinidade A2B, o que leva a crer que eles podem ser recrutados sequencialmente, dependendo do acúmulo de adenosina no meio. Isso pode permitir um incremento gradual do sinal inibitório, permitindo, também, sob algumas circunstâncias, uma inibição parcial da resposta imune sem interromper totalmente, por exemplo, o processo de destruição de um patógeno (SITKOVSKY e OHTA, 2005). Esse efeito regulador se dá principalmente pela inibição da produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  (LAPPAS et al., 2005; HASKO et al., 2000; KRECKLER et al., 2006) e aumento da produção de IL-10 (PANTHER et al., 2003) por células envolvidas na resposta imune.

A sinalização da adenosina via acoplamento dos receptores A2A e A2B com a proteína Gs é contrabalanceada pela sinalização resultante do acoplamento dos receptores A1 e A3 com a proteína Gi, o que inibe a adenilato ciclase e leva a altos níveis de AMPC, garantindo outro nível de controle para prevenir, por exemplo, a inibição prematura das células do sistema imune pelos receptores A2 (ABBRACCHIO e CERUTI, 2007; STIKOVSKY e OHTA, 2005). Além disso, a adenosina pode agir tanto em receptores A2A quanto A3 inibindo a capacidade migratória de células dendríticas pela inibição da expressão de moléculas envolvidas nesse processo, com a CCR5 e CCL19, sem afetar a maturação dessas células (HOFER et al., 2003).

Os receptores P2 se dividem, com base na estrutura molecular e nos mecanismos de transmissão de sinais, em duas subfamílias: P2X, associados a canais iônicos e P2Y, receptores de sete domínios transmembrana, acoplados à proteína G. Atualmente, sete subtipos de receptores P2X e oito P2Y são conhecidos, incluindo receptores que são sensíveis tanto a purinas quanto a pirimidinas (NORTH, 2002; RALEVIC e BURSTOCK, 1998).

A ativação dos diferentes tipos desses receptores dá início as vias de sinalização que levam à regulação da ativação de fatores de transcrição tais como: fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), proteína ativadora 1 (AP-1), fator nuclear de células T ativadas (NFAT), cujos efeitos estão relacionados com a produção de várias citocinas por células do sistema imune (ARMSTRONG et al., 2007).

Os receptores P2X servem como mediadores nas mudanças de permeabilidade de cátions mono e divalentes (BRAKE et al., 1994). O sinal de transdução ocorre via influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e efluxo de  $\text{K}^+$ , causando despolarização da membrana e um aumento de cálcio citoplasmático (CHEN et al., 1995; DI VIRGILIO et al., 2001). Sua ativação medeia aos efeitos ativadores de altas doses de ATP em células da imunidade inata (KUSBER e BARTON, 2001; AGA et al., 2002).

O ATP e não outros nucleosídeos-5-trifosfatados causam um aumento abrupto dos níveis citoplasmáticos de cálcio dentro da célula suscetível, seguido por condensação do citoplasma, tumefação celular, segmentação nuclear e fragmentação do DNA, culminando finalmente na apoptose (ZHENG et al., 1991). O aumento da concentração de cálcio citoplasmático nas células suscetíveis serve como um sinal precoce do início de apoptose (ORRENIUS et al., 1989). O tratamento de células com ATP causa alterações necróticas típicas tais como a tumefação celular e a vacuolização do citoplasma. O núcleo das células tratadas com ATP, entretanto revelou alterações apoptóticas como condensação da cromatina e marginalização (FERRARI et al., 1999).

O papel dos nucleotídeos extracelulares como moléculas sinalizadoras em diversos tecidos, incluindo o sistema imune, está bem estabelecido na literatura (DI VIRGILIO et al., 2001; YEGUTKIN et al., 2002). Em especial, o ATP é capaz de modular importantes processos tais como ativação, proliferação/citotoxicidade celular, desenvolvimento e funções efetoras dos linfócitos (DI VIRGILIO et al., 2000). O ADP não apresenta um papel definido nessas células (DOMBROWSKI et al., 1998), porém é um importante promotor da agregação plaquetária, enquanto que adenosina é um potente inibidor deste processo. O ADP em adição ao ATP também é importante no transporte de cloretos, na vasodilatação, na contração muscular, nas doenças cartilaginosas e na função renal (BURNSTOCK et al., 2004).

O ATP permanece estocado nas vesículas sinápticas juntamente com outros transmissores. Após a estimulação nervosa esta molécula é liberada na fenda sináptica (TODOROV et al., 1997). Além disso, o ATP realiza uma estimulação de células não neurais por mecanismo parócrino (HARDEN et al., 1999).

A hidrólise do ATP é controlada pela enzima NTPDase, a qual executa um importante papel em algumas funções dos linfócitos, como reconhecimento e/ou ativação das células T citotóxicas frente a um estímulo antigênico (FILLIPINI et al., 1990). Demonstrou-se que a secreção de importantes citocinas linfocitárias mediada pelo ATP extracelular, é dependente da hidrólise desse nucleotídeo (LANGSTON et al., 2003).

Os nucleotídeos extracelulares possuem importantes papéis como moléculas

sinalizadoras, os quais foram bem estabelecidos em diversos tecidos, incluindo o sistema cardiovascular, no qual medeiam os efeitos inflamatórios e antiinflamatórios (YEGUTKIN et al., 2002).

O ATP quando secretado para o meio extracelular por linfócitos é capaz de mediar a resposta imune (IVANENKOV et al., 2005), uma vez que induz a secreção de importantes mediadores tais como interferon- $\gamma$  e IL-2 por parte dos linfócitos T (DI VIRGILIO et al., 2001; LANGSTON et al., 2003). Além de modular os processos de ativação, diferenciação, desenvolvimento e respostas efetoras dos linfócitos, dependendo das concentrações extracelulares, ainda é capaz de induzir dois efeitos antagônicos como a proliferação celular, quando em baixas concentrações, e a morte celular, quando em altas concentrações (DI VIRGILIO et al., 2000).

Entretanto, esse nucleotídeo é um importante estimulante da agregação plaquetária (KEUREN et al., 2007), ativando e recrutando-as para o sítio da injúria tecidual (MARCUS et al., 2003). Sabe-se que as plaquetas, quando ativadas, secretam o conteúdo de suas vesículas, sendo o ATP um desses componentes liberados para o meio extracelular. Este ATP secretado pelas plaquetas, por sua vez, seria capaz de influenciar o sistema imune. Em condições fisiológicas, os nucleotídeos estão presentes no meio extracelular em baixas concentrações, normalmente em quantidades nanomolares, podendo chegar até quantidades micromolares em determinadas situações. Estas quantidades são influenciadas por vários fatores, tais como a sua secreção, a lise celular, o efeito da diluição no espaço extracelular e a ação catalítica de enzimas do tipo E-NTPDases (ectonucleotidases) (DI VIRGILIO et al., 2001b).

Os nucleotídeos extracelulares funcionam como sinalizadores moleculares em uma grande variedade de funções fisiológicas tais como coagulação sanguínea, inflamação, reações imunes, contração muscular lisa, e de proliferação celular (por exemplo, no desenvolvimento embrionário e câncer) (ROBSON et al., 2006).

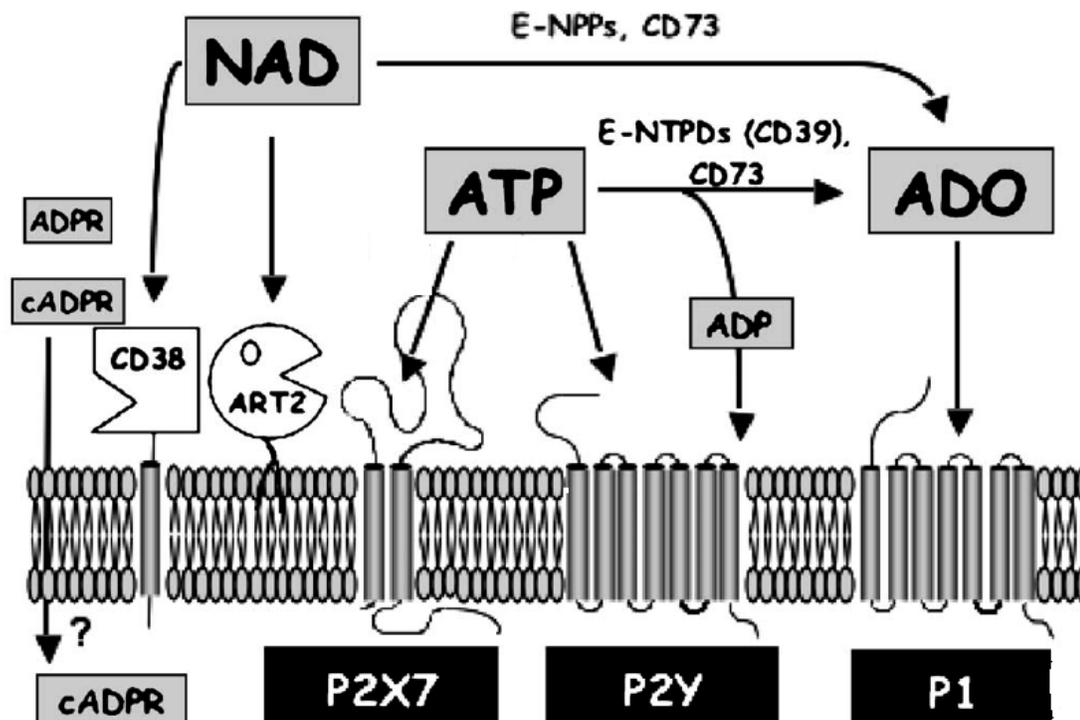


Figura 1 – Interação de ATP e NAD extracelular e seus metabólitos em diferentes receptores na superfície da célula (adaptado de HAAG et al., 2006).

## 2.2 ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS

As enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares são conhecidas como ecto-nucleotidasas, pois estão ancoradas à superfície celular e possuem o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2000). As ecto-nucleotidasas podem ser classificadas como família das E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), família E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), fosfatases alcalinas e ecto-5'-nucleotidase, sendo amplamente distribuídas nos tecidos (ZIMMERMANN, 2000). Além das enzimas citadas, existe a enzima ADA (adenosina deaminase), a qual é também uma importante enzima de cadeia de purinas, responsável pela deaminação da adenosina formando inosina (Figura 2). Ela apresenta uma localização citosólica, mas pode também estar localizada na superfície da membrana celular, como uma ectoenzima (YEGUTKIN, 2008).





com dois domínios transmembrana, um N-terminal e um C-terminal, sendo que seus sítios catalíticos localizam-se do lado de fora da membrana (CHEN e GUIDOTTI, 2001). Na presença obrigatória de cátions divalentes como  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , a CD39 hidrolisa tanto o ATP a ADP, como o ADP até AMP (PLESNER, 1995; WANG e GUIDOTTI, 1996).

Na maioria dos casos, os valores de *K<sub>m</sub>* estão em faixas micromolares. Na sua topografia na membrana possui um domínio transmembrana com regiões amino e carboxiterminais. Estas características também são comuns às enzimas NTPDase2 e NTPDase3 (ZIMMERMANN, 2001).

A NTPDase1 e a NTPDase2 estão presentes em uma grande variedade de tecidos, incluindo coração, placenta, pulmão, fígado, musculatura esquelética, timo, rim, pâncreas, testículos, ovários, próstata, cólon e cérebro (ZIMMERMANN e BRAUN, 1999).

Altos níveis de atividade de ATPase estão associados com a vasculatura (endotélio, músculo liso e cardíaco), linfócitos e plaquetas (PLESNER, 1995). Também a NTPDase1 já foi caracterizada em células do sistema imune como linfócitos (LEAL et al., 2005) e plaquetas (PILLA et al., 1996). A NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) possui uma forte preferência pelo ATP com taxas moleculares de ATP/ADP de 1:0,03 ou menos (MATEO et al., 1999). É particularmente associada com o sistema nervoso central e periférico e a enzima quando presente no sistema vascular pode regular ou inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP ou ATP (YEGUTKIN, 2008). A NTPDase3 (CDL3, HB6) é um intermediário funcional que hidrolisa ATP em uma taxa molecular de aproximadamente 1: 0,3 (CRAWFORD et al., 2007).

#### 2.2.1.2 NTPDase4

Sua estrutura é semelhante às das enzimas anteriormente citadas, apresentando duas formas: uma forma está localizada no aparato de Golgi (UDPase) (WANG e GUIDOTTI, 1998) e uma forma lisossomal está localizada nos vacúolos de UDPase, hidrolisando UDP e outros nucleosídeos di e tri-fosfatados, não sendo capaz de hidrolisar ATP e ADP (ZIMMERMANN, 2000).

#### 2.2.1.3 NTPDase5 e NTPDase6

Quando expressa em células COS-7, a NTPDase5 (CD39L4, ER-UDPase) é secretada e possui uma preferência por nucleosídeos 5'-difosfatados, especialmente UDP (MULERO et

al., 1999). Uma suposta NTPDase6 (CD39L2), que ainda não foi funcionalmente caracterizada, está situada no Aparato de Golgi e em uma pequena extensão na membrana plasmática (ZIMMERMANN, 2001).

#### 2.2.1.4 NTPDase7 e NTPDase8

A NTPDase7 (LALP1) foi clonada em humanos e ratos (SHI et al., 2001) e possui localização intracelular, sendo classificada como endo-apirase, com preferência pelos substratos UTP, GTP e CTP. Bigonnesse e cols. (2004) clonaram e caracterizaram a NTPDase8 em ratos, a qual parece regular os níveis de nucleotídeos extracelulares de maneira distinta de outras ectonucleotidases. A NTPDase8 mostrou ainda grande expressão no fígado com níveis menores da enzima detectados nos rins e jejuno. A enzima também demonstrou envolvimento na regulação da secreção da bile (YEGUTKIN, 2008).

#### 2.2.2 Família E-NPP

Estas enzimas possuem ampla distribuição tecidual e revelam atividade de fosfodiesterase e pirofosfatase as quais são propriedades da mesma molécula enzimática. São capazes de hidrolisar 3', 5'-cAMP a AMP, ATP a AMP e ADP a AMP e Pi ou NAD<sup>+</sup> a AMP e nicotinamida mononucleotídeo. A hidrólise ocorre tanto com nucleotídeos purínicos quanto pirimidínicos (ZIMMERMANN, 2000; GODING et al., 2003). Há evidências que indicam que esta família pode modular a sinalização mediada por receptores P2 (PICHER e BOUCHER, 2000).

A família das E-NPPs inclui 7 membros (NPP1-7) envolvidos numa grande variedade de atividades biológicas, que incluem: a formação dos ossos, a motilidade celular, as metástases tumorais e a resistência à insulina em diabetes tipo II (GODING et al., 2003; STEFAN et al., 2006). As NPPs1-3 estão envolvidas na hidrólise de nucleotídeos e as NPPs 6-7 hidrolisam ligações fosfodiéster em fosfolipídeos e fosfoéster de colina. Notavelmente, a NPP-2 hidrolisa tanto fosfolipídeos quanto nucleotídeos (STEFAN et al., 2006). Relata-se também a existência das NPPs 4 e 5, porém pouco se sabe sobre sua atividade catalítica (GODING et al., 2003).

#### 2.2.3 Fosfatases alcalinas

Estas enzimas representam uma família de ecto-fosfomonoesterases não-específicas

que degradam não somente nucleosídeos 5'-tri, di monofosfatados, mas também liberam fosfato inorgânico de uma variedade de compostos orgânicos, incluindo proteínas (WHYTE, 1996) e são similares a ecto-5'-nucleotidase, pois são ancoradas na membrana plasmática via GPI, possuindo formas solúveis no soro (ZIMMERMANN, 2001).

#### 2.2.4 Ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5)

A ecto-5'-nucleotidase ancorada na membrana via GPI também é conhecida como proteína de superfície CD73 (CHRISTENSEN, 1997), que representa um marcador de maturação de linfócitos B e linfócitos T. Uma forma solúvel desta enzima também já foi descrita. A enzima hidrolisa nucleosídeos 5'-monofosfatados ao seu respectivo nucleosídeo e Pi, sendo a principal responsável pela formação de adenosina extracelular, a partir de nucleotídeos da adenina, a qual interage com receptores de adenosina (P1) (RESTA e THOMPSON, 1997; AIRES, 1998; ZIMMERMANN, 2000; COLGAN et al., 2006).

A 5'-nucleotidase em linfócitos pode ter um importante papel na regulação do sistema imune humano. Uma atividade diminuída em linfócitos B foi observada em pacientes com deficiência primária de imunoglobulinas (EDWARDS et al., 1978; CHRISTENSEN et al., 1996) e em casos de leucemia linfocítica crônica de células B (ROSI et al., 2002). Os receptores de adenosina são expressos numa variedade de tecidos e tipos celulares, incluindo linfócitos, e servem como mediadores muito importantes para respostas fisiológicas, como débito cardíaco e contratilidade, neurotransmissão, função renal, vasodilatação da musculatura lisa, agregação plaquetária e geração de ânion superóxido (ROSI et al., 2002).

### 2.3 FUNÇÕES DA NTPDase NAS CÉLULAS LINFÓIDES

As células T desempenham várias funções imunes que podem ser divididas em duas categorias chamadas de reguladora e de efetora. As funções reguladoras são realizadas por células T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) as quais produzem importantes linfocinas. O linfócito Th1 é responsável pela produção de IL-2, que atua na ativação de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, e INF- $\gamma$ , o qual ativa macrófagos. Os linfócitos Th2 são responsáveis pela produção de IL-4 e IL-5, as quais induzem nas células B à produção de anticorpos (imunoglobulinas), além de IL-6 e IL-10. As funções efetoras são desempenhadas por células TCD8<sup>+</sup> ativadas que eliminam as células infectadas por vírus, células tumorais e enxertos (LANGSTON et al., 2003; ZAGO, 2004).

As células B desempenham duas funções importantes: a primeira é que quando ativadas por linfócitos T auxiliares diferenciam-se em plasmócitos secretores de anticorpos; a segunda, é que atuam também como células apresentadoras de antígenos (APCs) a exemplo de macrófagos, células dendríticas do baço e células de Langerhans da pele, que são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T auxiliares (LEVINSON et al., 1998; ZAGO et al., 2004).

A NTPDase1 é a principal ectonucleotidase presente na rede vascular, podendo também estar presente a NTPDase 2 (ROBSON et al., 2006). Esta enzima foi identificada como o antígeno de superfície CD39 das células linfóides, cuja maior expressão levaria ao aumento nas atividades de ATPase e ADPase nestas células. O CD39 tem sido reconhecido como um marcador de ativação de linfócitos T (KANSAS et al., 1991; ZEBISCH et al., 2007), e também como capaz de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (MALISZEWSKI et al., 1994; KACSMAREK et al., 1996).

A NTPDase possui importante desempenho no controle da função linfocitária, isto inclui o reconhecimento do antígeno e/ou ativação de funções efetoras das células T-citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990).

Alterações na atividade e distribuição desta enzima têm sido relatadas em várias condições patológicas (BONAN et al., 2001; KITTEL et al., 2002; LUNKES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005), como diabetes e hipertensão (LUNKES et al., 2003), insuficiência renal crônica (SILVA et al., 2005), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2007) em câncer de mama (ARAÚJO et al., 2005) e em processo infeccioso pelo HIV (LEAL et al., 2005).

Leal e cols. (2005a), sugerem que nucleotídeos extracelulares e seu metabolismo podem estar envolvidos na resposta imune na infecção pelo vírus HIV, onde propõem que durante a infecção crônica por este vírus haveria um aumento de ATP extracelular devido a apoptose dos linfócitos onde a hidrólise deste nucleotídeo pela NTPDase1 seria de grande importância.

A alteração da atividade em linfócitos de pacientes com ALL e B-CLL evidencia que NTPDase pode ter um importante papel na modulação destas doenças, via hidrólise de ATP e ADP (SCHETINGER et al., 2008). Vuaden e cols. (2007), demonstraram uma alteração na atividade das nucleotidasas de linfócitos e soros de ratos na presença de lipopolissacarídeos. O autor sugere que as mudanças na atividade da enzima ajam na regulação dos nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares, sendo capaz de iniciar o processo inflamatório.

Foi observado por Leal e cols. (2005a) que a hidrólise de ATP e ADP é essencial para resposta imune do HIV. Os resultados indicaram claramente um aumento na atividade da

NTPDase1 em linfócitos de pacientes HIV positivos, confirmados por um acentuado aumento da expressão de CD39 na superfície destas células.

## 2.4 INIBIÇÃO DA NTPDase

O fluxo metabólico, através das diversas vias pode ser alterado por inibidores, moduladores e agentes que seqüestram componentes destas (CRAIG, 1992; SANCHEZ et al., 1992). Genericamente, um inibidor pode ser definido como um composto que diminui a velocidade de hidrólise de um determinado substrato (SALVESEN e NAGASE, 1989).

Apesar das diferenças estruturais, muitos inibidores interagem com suas enzimas alvo de acordo com um mecanismo padrão, composto por etapas como a ligação do sítio ativo da proteinase alvo ao sítio reativo da superfície do inibidor e a quebra de uma ligação peptídica dentro do sítio reativo do inibidor para formar o inibidor modificado (TRAVIS e SALVESEN, 1983). As regiões dos inibidores complementares aos sítios ativos das enzimas apresentam-se como um pseudo-substrato (HARPEL, 1987). No caso dos inibidores que obedecem a um mecanismo padrão, a hidrólise da ligação peptídica do sítio ativo não se processa completamente, e um equilíbrio é estabelecido entre a forma do inibidor com a ligação peptídica intacta (TRAVIS e SALVESEN, 1983).

Há duas grandes classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis. Um tipo comum de inibição reversível é chamado de competitiva, onde um inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Enquanto o inibidor ocupa o sítio ativo, ele impede a ligação do substrato à enzima. Muitos inibidores competitivos são compostos que se assemelham com o substrato e combinam com a enzima para formar um complexo enzima-substrato, mas sem levar à catálise. Mesmo combinações transitórias desse tipo reduzirão a eficiência da enzima. Levando em consideração a geometria molecular dos inibidores que se assemelham ao substrato, podemos chegar a conclusões sobre que partes do substrato normal se ligam a enzima. Pelo fato do receptor se ligar reversivelmente à enzima, a competição pode ser inclinada a favorecer o substrato, simplesmente adicionando-se mais substrato (LEHNINGER, 2004).

Dois outros tipos de inibição reversível, incompetitiva e mista, embora frequentemente definidos em termos de enzima que age sobre somente um substrato, são na prática observados apenas com enzimas tendo dois ou mais substratos. Um inibidor incompetitivo liga-se a um sítio distinto do sítio ativo do substrato e ao contrário do inibidor competitivo, liga-se apenas no complexo enzima-substrato. Um inibidor misto também se liga a um sítio

distinto do sítio ativo do substrato, mas ele se liga tanto à enzima quanto ao complexo enzima-substrato. O uso de um dos produtos de reação como um inibidor é freqüentemente e particularmente informativo. Se apenas um dos dois produtos de reação estiver presente, a reação reversa não se realiza (VOET, 2004).

Na inibição irreversível os inibidores se ligam de forma covalente ou destroem o grupo funcional de uma enzima que é essencial para sua atividade. Há também aqueles que formam uma associação não-covalente particularmente estável. A formação de uma ligação covalente entre um inibidor irreversível e uma enzima é comum (VOET, 2006).

Uma classe especial de inibidores irreversíveis é a dos inativadores suicidas. Esses compostos são relativamente não reativos até o momento em que se ligam ao sítio ativo de uma enzima específica, sendo com isso convertido a um composto muito reativo que se combina de forma irreversível com a enzima. Esses compostos são chamados também de inativadores com base no mecanismo, porque eles seqüestram o mecanismo de reação normal da enzima para inativá-la (LEHNINGER, 2004).

A inibição de uma ecto-nucleotidase pode resultar em uma potencialização da sinalização, via ATP, nos receptores P2 (CRACK et al., 1994). Muitos inibidores de ecto-nucleotidasas também funcionam como antagonistas dos receptores P2. Estes incluem o suramin, piridoxilfosfato-6-azofenil-2', 4'- ácido dissulfônico (PPADS) e azul reativo 2 (ZIMMERMANN, 2001).

As ecto-ATPDases quebram nucleotídeos tri e difosfatos, enquanto as ecto-ATPases quebram apenas nucleotídeos trifosfato (PLESNER, 1995). Ambas são inibidas por Triton X-100, e são diferenciadas entre si pela inibição por azida, uma vez que apenas as ecto-ATPDases são inibidas por azida em concentrações de 10-20 mM (PLESNER, 1995). O fluoreto de alumínio tem alta afinidade pelos sítios ligantes de nucleotídeos das ATPases, sendo um análogo do fosfato  $\gamma$  do ATP (CRUZ, 2006). As ATPases podem ser inibidas por alguns efetores como o vanadato, azida, alumínio, flúor e triton (PINHEIRO, 2001). Já as ecto-ATPases solúveis não sofrem alterações visíveis, quando se acrescenta Triton X-100 (SHPETNER et al., 1988; SMITH et al., 1998).

Analisando-se as regiões conservadas da apirase (HANDA e GUIDOTTI, 1996) pode-se verificar a presença de arginina e ácidos glutâmico e aspártico. Smith e Kirley (1999) mostraram que uma mutação no ácido aspártico 219 da região conservada IV (ACR IV) da apirase, reduz a atividade enzimática em mais de 90%, indicando que esses grupos são críticos para a hidrólise do substrato.

As NTPDases são caracterizadas por sua insensibilidade a inibidores específicos do

tipo P, tipo V e tipo F e também por apresentarem maior atividade enzimática em pH alcalino (KEGEL et al., 1997; SCHETINGER et al., 2001).

#### 2.4.1 Azida sódica como inibidora da NTPDase

As azidas são muito usadas em sínteses orgânicas (SCRIVEM e TURNBULL, 1988) e são notavelmente estáveis em ambiente biológico. Por exemplo, servem como protetores ortogonais de grupos *in vivo* (PRESCHER et al., 2004) e componentes de fármacos como no antiretroviral AZT (PAN-ZHOU et al., 1998). Não foram relatadas como inibidores de proteases, mas segundo Le e cols. (2006), resultados preliminares sugerem que o grupo azidometileno pode ser usado para produzir potente inibição não somente em enzimas como a caspase-1, mas também em outras proteases de cisteína.

A azida sódica é um útil reagente de prova, mutagênico e preservativo. Em hospitais e laboratórios, é um biocida; e é especialmente importante em reagentes em escala soluções estoque os quais devem impedir o crescimento bacteriano onde a azida de sódio atua como um bacteriostático por inibir a citocromo oxidase em bactérias Gram-negativas; bactérias Gram-positivas (estreptococos, pneumococos, lactobacilos) são resistentes à azida (LICHSTEIN et al., 1943). Pode ser destruída por tratamento com solução ácida de nitrito de sódio (ASHER et al., 1990).

É um conhecido inibidor da ATPase mitocondrial (PULLMAN et al., 1960). Ao contrário da energia de acoplamento dos inibidores, por exemplo, oligomicina e díciclohexilcarbodiâmina, que inibem somente a membrana mitocondrial, a azida inibe tanto FoF1 quanto F1 solúvel, indicando que o sítio de inibição da azida é F1 (VASILYEVA et al., 1982; HYNDMAN et al., 1994).

Em um estudo realizado, utilizando azida em células hepáticas de ratos, verificou-se que a atividade enzimática foi capaz de hidrolizar nucleosídeos trifosfatados, com exceção do ATP, bem como vários outros nucleosídeos difosfatados (ERNSTER et al., 1962). As ATPases em vasos umbilicais humanos (YAGI et al., 1995), placenta humana (CHRISTOFORIDIS et al. 1995) e fígado de galinha (STROBEL et al., 1993) foram inibidas por azidas em diferentes concentrações (10-20mM).

As E-ATPases que se caracterizam por ter orientação extracelular pela ativação de  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , têm insensibilidade aos inibidores específicos da ATPases, do tipo F, P, e V (PLESNER, 1995; PLESNER et al., 1997). Assim, a sensibilidade à inibição da azida tem sido geralmente considerada como um importante critério para distinguir as ecto-ATPDases

de ecto-ATPases, o que pode ter diferentes papéis nas respostas fisiológicas dos diferentes tecidos que possuem nucleotídeos extracelulares (BEAUDOIN et al., 1996; PLESNER, 1995; PLESNER et al., 1997). A azida sódica é relatada na literatura como inibidor de NTPDases (SCHETINGER et al., 2001, MATTOS et al., 2001), inibindo a hidrólise de ATP e ADP paralelamente na concentração de 20 mM (LEAL et al., 2005).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES UTILIZADOS

- Comassie blue
- Verde de malaquita
- Tampão hemolítico
- Sistema pH 8,0 (Tris HCl)
- ATP (Sigma)
- ADP (Sigma)
- Azida Orgânica
- Salina 0,9%

#### 3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Espectrofotômetro
- Freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$
- Centrífuga de mesa
- Banho a  $37^{\circ}\text{C}$
- Vórtex
- Vidrarias
- Homoginizador
- Pipetas automáticas

#### 3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue total colhidas com EDTA de pacientes ambulatoriais do Hospital Universitário de Santa Maria foram provenientes de material de descarte do Laboratório de Análises Clínicas deste hospital. Para cada experimento foram usadas três amostras. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 3.4 OBTENÇÃO DAS AZIDAS

As amostras de azidas orgânica ( $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}$ ) foram sintetizadas pela primeira vez no

laboratório de Síntese Orgânica do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA) e disponibilizadas pelo professor Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues.

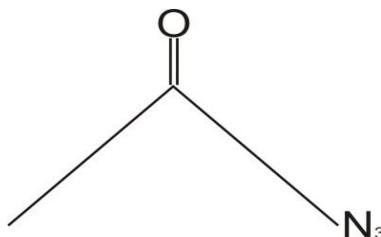


Figura 4 – Estrutura Química da Azida Orgânica sintetizada à partir do ácido acético ( $C_3H_3N_3O$ ).

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NTPDase

#### 3.5.1 Isolamento de células mononucleadas das amostras

Os linfócitos foram isolados de sangue total coletado com EDTA e separados em Ficoll-Hystopaque por diferentes gradientes de densidade conforme descrito por Böyum (1968). A amostra é diluída em salina em proporções iguais, colocada lentamente com pipeta de Pasteur sobre o Ficoll-Hystopaque em tubo cônico. O tubo é então submetido a centrifugação e após é retirada a camada de células mononucleares que fica entre o sobrenadante e o sedimento, a qual passa por lavagens com salina com o objetivo de eliminar totalmente a presença de plaquetas.

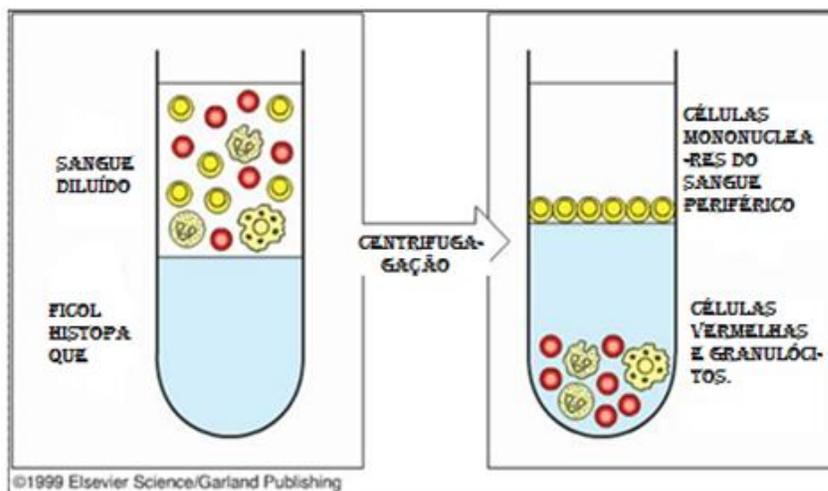


Figura 5 – Técnica de separação de linfócitos por gradiente de densidade (BÖYUM, 1968).

### 3.5.2 Determinação de proteína

A concentração de proteína utilizada no cálculo de atividade enzimática foi determinada pelo o método de Comassie Blue, usando albumina bovina como padrão (BRADFORD, 1976).

### 3.5.3 Hidrólise de ATP e ADP

Após isolamento das células mononucleares e determinação da concentração de proteína, ajustou-se esta concentração de forma que a mesma ficasse na faixa de 2 a 4  $\mu\text{g}$  por tubo (concentração final após incubação). Procedeu-se então uma incubação prévia de 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e depois uma incubação com 2mM de substrato somente com as amostras e o meio de reação. A hidrólise dos nucleotídeos foi determinada, pela medida de fosfato inorgânico liberado na reação usando o método colorimétrico proposto por Chan e cols. (1986) e padronizado em linfócitos normais por Leal e cols. (2005). O meio de reação continha 0,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 120mM de NaCl, 5mM de KCl, 60mM de glicose e 50 mM de Tris-HCl, em pH de 8,0 em um volume final de 200 $\mu\text{l}$ . A azida orgânica quando utilizada para verificação de inibição, foi adicionada ao meio de reação em diferentes concentrações, (1mM, 5mM, 10mM e 20mM), em um volume final de 200 $\mu\text{l}$ . As amostras foram incubadas em banho a  $37^{\circ}\text{C}$  por 70 minutos. Após foi usado TCA 10% com a finalidade de parar a reação e as amostras foram resfriadas por 10 minutos antes da análise da liberação do fosfato inorgânico (Pi) usando Verde de Malaquita como reagente colorimétrico e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como padrão em espectrofotômetro numa faixa de leitura de 630nm. As amostras foram analisadas em triplicatas para avaliar a atividade específica em nmol de Pi/min/mg de proteína.

## 3.6 ESTIMATIVA DO IC50 E PARÂMETROS CINÉTICOS

A constante de Michaelis ( $K_m$ ) foi determinada pelo plot de Lineweaver-Burk, utilizando as velocidades iniciais obtidas nas concentrações de substrato na faixa de 30 a 3000 $\mu\text{M}$  (0,03-3mM). Na presença de concentrações de azida orgânica, na faixa de 1-20mM, foram determinados os valores de  $K_m$  aparente, com os quais foi realizado o replot do Lineweaver-Burk ( $K_m$  aparente versus concentração do inibidor) permitindo a determinação do  $K_i$ . O plot de porcentagem de atividade ou porcentagem de inibição permitiu identificar o IC50. As representações gráficas foram realizadas com auxílio do programa Slidewrite Plus

4.0 e para os cálculos de regressão linear para determinação de  $K_m$  e  $V/máx$  (método de Lineweaver-Burk) foi utilizada uma calculadora científica.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida por teste de Tukey-Kramer considerando um nível de significância de 5% para determinar diferença entre as concentrações utilizadas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um considerável número de compostos alteram ou inibem a hidrólise de nucleotídeos pela NTPDase. Entre eles, podemos citar análogos de nucleotídeos não-hidrolisáveis e inibidores de receptores P2. O único composto disponível comercialmente capaz de inibir a hidrólise de ATP em vários tecidos sem agir nos receptores P2 é o ARL 67156, análogo do ATP. Outros inibidores potenciais tem sido citados, mas são necessárias novas avaliações quanto a diferentes potências, entre os membros da família E-NTPDase e quanto a efeitos distintos nos diferentes tecidos (ZIMMERMANN et al., 2006).

Este trabalho procurou avaliar os possíveis efeitos inibitórios de uma azida orgânica derivada do ácido acético sobre a atividade da NTPDase presente na superfície de linfócitos humanos, uma vez que o grupamento azida, no caso da azida sódica, já foi relatado como um inibidor desta enzima. Através da adição de diferentes concentrações de azida orgânica no meio de incubação para determinação da atividade enzimática, verificou-se que a hidrólise do ATP pela NTPDase não foi alterada em nenhuma das concentrações utilizadas. Porém, a hidrólise de ADP pela mesma enzima sofreu significativa diminuição quando foi acrescentada a azida orgânica em concentrações de 10 e 20 mM (Figura 6), resultados que conferem com trabalhos anteriormente realizados (Tabela 1).

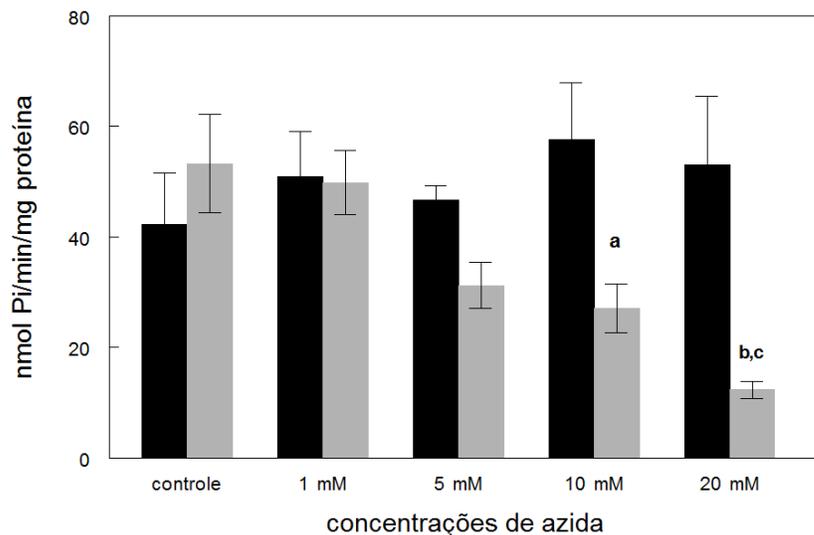


Figura 6 – Efeito *in vitro* de azida orgânica na atividade da NTPDase em linfócitos humanos.

Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média para três experimentos diferentes. As barras negras representam a hidrólise do ATP e as cinzas, a hidrólise do ADP. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparado ao controle. <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparado à concentração de 1 mM de azida. <sup>c</sup>  $p < 0,01$  comparado ao controle.

Tabela 1 – Inibição da NTPDase pela azida sódica em diversas fontes citadas na literatura.

<b>Tecidos</b>	<b>Concentração</b>	<b>% de atividade do controle</b>	<b>Referência</b>
Membrana de cérebro de zebrafish	20 mM	32 para ATP 66 para ADP	RICO et al., 2003
Soro de ratos	10 mM	84 para ATP 79 para ADP	OSSES et al., 2004
Soro de ratos	20 mM	76 para ATP 81 para ADP	OSSES et al., 2004
<i>Trichomonas vaginalis</i>	20 µM	63 para ADP	AGUIAR MATOS et al., 2001
Plaquetas	10 mM	79 para ATP 66 para ADP	PILLA et al., 1996
Plaquetas	20 mM	82 para ATP 61 para ADP	PILLA et al., 1996

É sabido através da literatura que a inibição pela azida sódica, uma azida inorgânica, tem sido utilizada como um dos critérios de diferenciação entre NTPDases e ATPases (PLESNER et al., 1995, ZIMMERMAN, 2001). A inibição na hidrólise somente do ATP, indicaria a presença de uma ATPase, enquanto a inibição na hidrólise do ADP ou em ambos, sugeriria a presença de uma NTPDase (WANG et al., 1997).

A diminuição na hidrólise de ADP na presença da azida orgânica poderia estar relacionada com trabalhos, que relatam que a eficácia da inibição de hidrólise pela azida, pode estar ligada ao substrato ATP ou ADP (KNOWLES et al., 1999). Fazendo um paralelo entre a azida orgânica em questão e a azida sódica, vários trabalhos têm encontrado inibição pela azida sódica na hidrólise do ATP em paralelo à do ADP, o que também foi observado em relação a linfócitos e plaquetas (PILLA et al., 1996; LEAL et al., 2005). Lunkes e cols. (2003) encontraram uma inibição na hidrólise dos dois substratos em plaquetas, quando utilizada a concentração de 20 mM de azida sódica, mas na concentração de 10mM somente houve inibição significativa na hidrólise do ADP. Esta diferença na inibição pela azida pode ser considerada como um importante critério para distinção entre ecto-ADPases e ecto-ATPases, que podem ter diferentes papéis nas respostas fisiológicas de diferentes tecidos para nucleotídeos extracelulares (SARKIS et al., 1995; PLESNER et al., 1995; PLESNER et al., 1997). A partir da adição de 10 e 20 mM da azida orgânica ao meio de reação, observou-se

que, na hidrólise do ADP, houve uma inibição da atividade da NTPDase de linfócitos de 50 e 77%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Inibição provocada por diferentes concentrações de azida orgânica na atividade *in vitro* da NTPDase em linfócitos humanos com ADP como substrato.

<b>Concentração do inibidor</b>	<b>Atividade %</b>	<b>Inibição %</b>
0 Mm	100	0
1 mM	93	7
5 mM	58	42
10 mM	50	50
20 mM	23	77

Não foi observada inibição significativa na hidrólise do ATP em nenhuma das concentrações usadas de azida orgânica, conforme está demonstrado na tabela 3. Em grande parte dos trabalhos disponíveis na literatura podemos observar um maior efeito inibitório da azida sódica na hidrólise do ATP, o que poderia estar ligado a uma menor afinidade da enzima pelo substrato. A partir dos resultados obtidos procuro-se caracterizar a inibição da NTPDase pela azida orgânica sintetizada a partir do ácido acético, quando o substrato utilizado é o ADP e comparando-a com a inibição causada pela azida sódica.

Tabela 3 – Porcentagem da atividade *in vitro* da NTPDase em linfócitos humanos com ATP como substrato em diferentes concentrações de azida orgânica.

<b>Concentração do inibidor</b>	<b>Atividade %</b>
0 mM	100
1 mM	120
5 mM	110
10 mM	136
20 mM	125

Knowles e cols. (1999) sugeriram que enquanto a azida sódica diminui tanto  $V_{max}$  e  $K_m$  para o ADP, ela não altera a  $K_m$  de ATP. Dessa forma, a afinidade da azida pelo complexo E'ADP parece ser significativamente maior do que para a enzima livre ou E'ATP. A resposta da enzima a outros três inibidores como o flúor, vanadato, e pirofosfato, é dependente do substrato e do pH, o que parece ser verdadeiro também para a azida. Isto

indicaria uma discriminação entre ADP e ATP pela enzima NTPDase.

Independentemente de íons divalentes e pH, a inibição da hidrólise de ADP pela azida é sempre maior do que na hidrólise de ATP. Isto pode ocorrer devido ao fato de que a azida liga-se fracamente à enzima na presença de ATP, mas mais fortemente na presença de ADP. É possível que a azida, devido sua carga negativa e tamanho, possa ocupar o sítio de ligação  $\gamma$ -fosfato, obrigatório do ATP quando o ADP já está presente no sítio ativo. Isto resulta em um melhor ajustamento do ADP no sítio de ligação do substrato (KNOWLES et al., 1999).

A partir da inibição significativa da hidrólise de ADP pela azida orgânica, seguiu-se a investigação no sentido de determinar o  $K_m$  e a  $V_{m\acute{a}x}$  para a hidrólise do ATP e ADP em linfócitos humanos na ausência do inibidor. Sabe-se que a atividade catalítica máxima da enzima é adaptada ao ambiente extracelular e requer a presença de cátions divalentes tais como cálcio e magnésio e um pH alcalino. Na maioria dos casos os valores do  $K_m$  encontram-se em uma faixa micromolar (ZIMMERMANN, 2000). Um experimento típico para a determinação do  $K_m$  está representado de acordo com Michaelis-Menten e Lineweaver–Burk (Figura 7), sendo que o  $K_m$  encontrado para a hidrólise do ADP foi de 82,5  $\mu\text{M}$  e a velocidade máxima calculada em 61 nmol de  $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, como indicado na tabela 4. Um trabalho anteriormente realizado sugere que a ligação do ADP com a enzima é significativamente mais frágil que a ligação com ATP. Propõe ainda que a ligação de ATP com o sítio ativo é favorável, provavelmente porque este se ajusta melhor que o ADP que possui a falta do  $\gamma$ -fosfato (KNOWLES et al., 1999). A diferença encontrada nos valores de  $K_m$  para a hidrólise do ATP e do ADP sugere uma menor afinidade da NTPDase pelo ADP como substrato, sendo que esta diferença é característica das ectonucleotidases. Os resultados encontrados estão de acordo com os parâmetros cinéticos encontrados em outras fontes por diversos autores (Tabela 5).

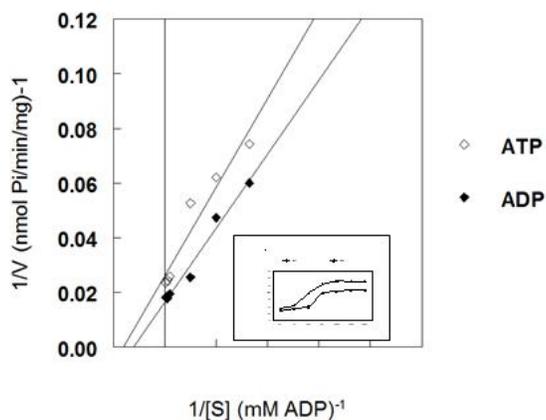


Figura 7 – Gráfico de Lineweaver–Burk para a hidrólise de ATP ( $\diamond$ ) e ADP ( $\blacklozenge$ ) e *inset* V versus S, sem a presença do inibidor. A hidrólise do ATP e do ADP foi determinada usando substrato na faixa de 30–3000  $\mu\text{M}$  ( $n=3$  em triplicata).

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos encontrados para a NTPDase de linfócitos humanos.

<b>Substrato</b>	<b>K<sub>m</sub> (μM)</b>	<b>V<sub>máx</sub> (nmol de Pi/min/mg de proteína)</b>
ATP	63	38,7
ADP	82,6	61

\* Todos os experimentos foram realizados em pelo menos três vezes e os resultados foram similares. O *K<sub>m</sub>* foi determinado pelo plot de Lineweaver-Burk, utilizando as velocidades iniciais obtidas nas concentrações de substratos na faixa de 30 a 3000μM (0,03-3mM).

Tabela 5 – Valores de *K<sub>m</sub>* para a NTPDase citados na literatura em diversas fontes.

<b>K<sub>m</sub></b>	<b>Fonte</b>	<b>Referência</b>
31 μM para ATP 21 μM para ADP	Fígado de porco	LECLERC et al., 2000
80 μM para ATP 45 μM para ADP	Sinaptosoma de córtex cerebral de rato	BATTASTINI et al., 1991
183 μM para ATP 96,5 μM para ADP	Membrana de cérebro do Zebrafish (Danio rerio)	RICO et al., 2003
49 μM para ATP 49 μM para ADP	<i>Trichomonas vaginalis</i>	AGUIAR MATOS ET al., 2001.
131 μM para ATP 110 μM para ADP	Células de Sertoli de ratos imaturos	CASALI et al., 2001
233 μM para ATP 221 μM para ADP	Cultura de neurônios de hipocampo	BOECK et al., 2002

Uma vez determinado o *K<sub>m</sub>* para a NTPDase de linfócitos, partiu-se para a identificação do tipo de inibição causada pela azida orgânica. Através do plot de Lineweaver-Burk (dados não mostrados), utilizando diferentes concentrações da azida orgânica e diferentes concentrações de substrato, foi possível estimar os valores de *K<sub>m</sub>* aparente e *V<sub>máx</sub>* aparente para ADP, os quais são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Efeito da azida orgânica *in vitro* nos parâmetro cinéticos da NTPDase de linfócitos humanos para o substrato ADP.

<b>Azida Orgânica</b>	<b>K<sub>m</sub> (μM)</b>	<b>V<sub>máx</sub> (nmol de Pi/min/mg de proteína)</b>
0 mM	82,6	61
5 mM	125,9	53,0
10 mM	274,1	83,4

A inibição da hidrólise do ADP causada pela azida orgânica alterou tanto o  $K_m$  quanto o  $V_{m\acute{a}x}$  sugerindo assim que a azida orgânica causaria uma inibição do tipo mista. A partir dos resultados descritos na tabela 6, onde as concentrações citadas de azida orgânica levaram a uma inibição da atividade da enzima em torno de 40 a 60%, observou-se um aumento do  $K_m$ . Este aumento sugere uma menor interação enzimática com o substrato, pela presença do inibidor. Este tipo de inibição ocorreria devido ao fato de que o inibidor se ligaria a sítios da enzima que participam tanto da ligação do substrato quanto da catálise, sendo comum em enzimas que atuam sobre mais de um tipo de substrato (VOET e VOET, 2004). Knowles e cols. (1999) demonstraram que o tipo de inibição causada por outra azida, a azida sódica, pode depender do pH em que ocorre a hidrólise, podendo também ser competitiva ou mista. A azida orgânica parece inibir a NTPDase de forma diferente de outros inibidores, tais como o ARL 67156, cujo padrão de inibição é competitivo para NTPDase1 e NTPDase3 (BRUNSCHWEIGER et al., 2008).

Um replot secundário do Lineweaver–Burk ( $K_m$  aparente *versus* concentrações do inibidor) permitiu estimar o valor do  $K_i$  da azida orgânica para a NTPDase, conforme indicado na figura 8.

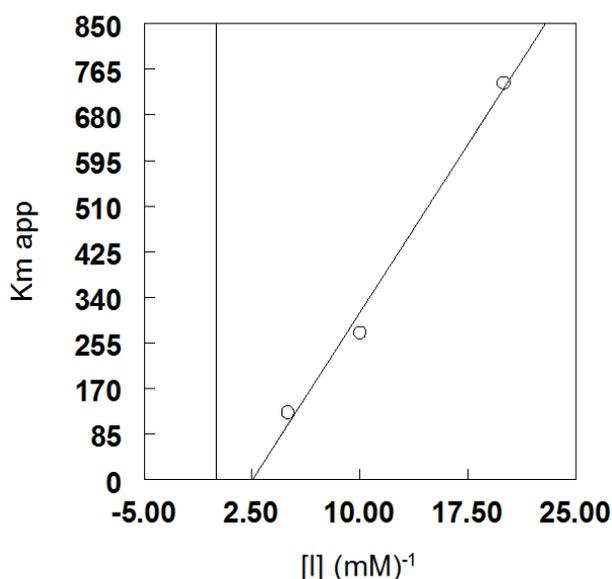


Figura 8 – Estimativa do  $K_i$  através de replot de Lineweaver-Burk ( $K_m/app$  versus  $[I]$ ). O valor de  $K_i$  é estimado onde o gráfico intercepta o eixo x, sendo o eixo  $y=0$ . O valor de  $K_i$  estimado para a azida orgânica foi 2,56 mM.

O  $K_i$  estimado para azida orgânica pela representação gráfica de Dixon em relação à

hidrólise de ADP foi de 2,56 mM, ou seja, 2560  $\mu\text{M}$ . Alguns trabalhos enfocando outros inibidores estão descritos na literatura, como a inibição pelo gadolínio, com  $K_i$  de 3  $\mu\text{M}$  e apresentando um padrão não-competitivo (ESCALADA et al., 2004), polioximetais, com  $K_i$  de 0,140  $\mu\text{M}$  (MÜLLER et al., 2006), suramin com  $K_i$  de 300 $\mu\text{M}$  (IOQBAL et al., 2005) e ARL 67156 com  $K_i$  de 11 $\mu\text{M}$ , como mostrado na tabela 7.

Tabela 7 – Valores de  $K_i$  para alguns inibidores da NTPDase citados na literatura.

$K_i$	Fonte de enzima	Inibidor	Referência
31 $\mu\text{M}$	Baço bovino	8-cicloheptilS-ATP	GENDRON et al., 2000
45 $\mu\text{M}$	Baço bovino	8-CH2tBuS-ATP	GENDRON et al., 2000
16 $\mu\text{M}$	Baço bovino	8-hexilS-ATP	GENDRON et al., 2000
10 $\mu\text{M}$	Baço bovino	8-BuS-ATP	GENDRON et al., 2000
27 $\mu\text{M}$	Células de ovário	ARL67156	MÜLLER et al., 2006
300 $\mu\text{M}$	Células de ovário	Suramin	MÜLLER et al., 2006
760 $\mu\text{M}$	Baço bovino	Verapamil-HCl	GENDRON et al., 2000b
2400 $\mu\text{M}$	Baço bovino	Diltiazem-HCl	GENDRON et al., 2000b

O passo seguinte foi a determinação do  $\text{IC}_{50}$  para a inibição pela azida orgânica. O valor estimado no plot de percentagem de atividade e de inibição foi de 11,2 mM, ou seja, 11200  $\mu\text{M}$  (Figura 9). Foi relatado na literatura que na presença de um composto conhecido como ebselen, há uma inibição na hidrólise de ADP com  $\text{IC}_{50}$  de 186  $\mu\text{M}$  (FÜRSTENAU et al., 2004), concentração bem inferior à concentração necessária de azida orgânica para inibir 50% da atividade enzimática.

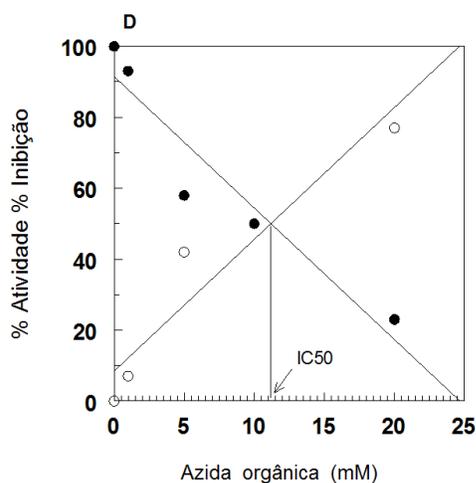


Figura 9 – Plot para determinação do  $\text{IC}_{50}$  da azida orgânica. O valor estimado para  $\text{IC}_{50}$  foi 11,2 mM.

O efeito do ATP extracelular nos receptores P2 é limitado pela sua degradação enzimática, ou seja pela ação de enzimas como a NTPDase. A identificação de novos inibidores da NTPDase que não ajam diretamente sobre o receptor, faz com que estes possam ser utilizados como drogas capazes de aumentar o tempo de vida do ATP *in situ*. Os efeitos verificados pela utilização da azida orgânica podem servir como subsídios para a síntese de novos compostos capazes de serem utilizados na terapêutica

## 5 CONCLUSÃO

A azida orgânica sintetizada a partir do ácido acético alterou a hidrólise dos nucleotídeos da adenina difosfatados na superfície dos linfócitos humanos, indicando que esta substância poderia ser utilizada como um inibidor da NTPDase. Os padrões cinéticos estimados após adição da azida, indicaram que a inibição encontrada foi mista. A inibição ocorre somente na hidrólise do ADP, demonstrando um comportamento diferente da enzima quanto aos substratos utilizados. Sugere-se então, que este inibidor seja testado em modelos experimentais animais onde haja uma resposta imune inapropriada, como no caso de reações de hipersensibilidade e doenças auto-imunes, para avaliar seu potencial terapêutico, uma vez que nestas situações, devido à grande ativação linfocitária, haveria uma alteração na atividade desta enzima.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABRACCHO, M. P.; CERUTI, S. P1 receptors and cytokine secretion. **Purinergic Signalling**. 3: 13-25, 2007.

AGA, M.; JOHNSON, C. J.; HART, A. P.; GUADARRAMA, A. G.; SURESH, M.; SVAREN, J.; BERTICS, P. J.; DARIEN, B. J. Modulation of monocyte signaling e pore formation in response to agonists fo the nucleotide receptor P2X(7). **Journal Leukoc. Biol.** 72: 222-232, 2002.

AGUIAR MATOS, J. A.; BORGES, F. P.; TASCA, T.; BOGO, M. R.; DE CARLI, G. A.; DA GRAÇA, Fauth M.; DIAS, R. D.; BONAN, C. D. Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. **Int J Parasitol.** 31 (8): 770-5, jun. 2001.

AIRES, S. P.; WEYRICH, K.; SCHAAF, B.; HANSEN, F.; DENNIN, R. H.; DALHOFF, K. Early T-cell apoptosis and fas expression during antiretroviral therapy in individuals infected with human immunodeficiency virus-1. **Scand Journal Immunol.** 48: 8691, 1998.

ANDERSON, C.; PARKINSON, F. Potential signaling roles for UTP and UDP: source, regulation and release of uracil nucleotides. **Trends Pharmacol Sci.** 18: 387-392, 1997.

ARAÚJO, M. C.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESSR, R. J. B.; MORSCH, V. M. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast câncer patiens. **Biochim biophys acta.** 1740: 421-426, 2005.

ARMSTRONG, S.; KORCOK, J.; SIMS, S. M.; DIXON, S. J. Activation of transcription factors by extracellular nucleotides in immune and related cell types. **Purinergic Signalling.** 3: 59-69, 2007.

ASHER, K.; BALDERMAN, D. 2-Phenyl-2-Adamantanamine Hydrochloride. **Organic Syntheses.** Collected Volume 7, p. 433, 1990.

BATTASTINI, A. M.; ROCHA, J. B. da; BARCELLOS, C. K.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochem Res.** 16 (12): 1303-10, Dec. 1991.

BEAUDOIN, A. R.; SE ÂVIGNY, J.; PICHER, M. ATP-diphosphohydrolases, Purification and immunohistochemical localization of the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. **Am. J. Physiol.** 272, 1996.

BIGONESE, F.; LEVÉSQUE, S. A.; KULKUSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.; FERNANDES, M. J. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase-8. **Bochemistry.** p. 5511-19, 2004.

BOECK, C. R.; SARKIS, J. J.; VENDITE, D. Kinetic characterization and immunodetection of ecto-ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in cultured hippocampal neurons. **Neurochem Int.** 40 (5): 449-53, apr. 2002.

BONAN, C. D.; AMARAL, I. C.; ROCKENBACH, R.; WALZ, A. M.; BATTASTINI, I.; SARQUIS, J. J. Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes. **Neurochem Res.** 25(6): 775-779, 2001.

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

BRADFORD, M. M. A. Arapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. **Anal. Biochem.** 157: 375-380, 1976.

BRAKE, A. J.; WAGENBACH, M. J.; JULIUS D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. **Nature.** 371:519-523, 1994.

BRUNSCHWEIGER, A.; IQBAL, J.; UMBACH, F.; SCHEIFF, A. B; MUNKONDA, M. N.; SEVIGNY, J.; KNOWLES, A. F.; MULLER, C. E. Selective nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) inhibitors: nucleotide mimetics derived from uridine-5-carboxamide. **J. Medic. Chem.** 51: 4518-4528, 2008.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cecl Mol. Life Sci.** 64: 1471-83, 2007.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and function of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol.** 240: 301-304, 2004.

CANDINAS D.; KOYAMADA, N.; MIYATAKE, T. et al. Loss of rat glomerular ATP diphosphohydrolase activity during reperfusion injury is as sociated with oxidative stress reactions. **Thromb. Haemost.** 76: 807-812, 1996.

CASALI, E. A.; SILVA, T. R. da; GELAIN, D. P.; KAISER, G. R.; BATTASTINI, A. M.; SARKIS, J. J.; BERNARD, E. A. Ectonucleotidase activities in Sertoli cells from immature rats. **Braz J Med Biol Res.** 34 (10): 1247-56, oct. 2001.

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. Adirect colorimetric assay for the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. **Anal. Biochem.** 72: 375-380, 1996.

CHEN, C. C.; AKOPIAN, A. N.; SIVILOTTI, L.; COLQUHOUN, D.; BURNSTOCK, G.; WOOD, J. N. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. **Nature.** 377: 428-431, 1995.

CHEN, W.; GUIDOTTI, G. Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 282, p. 90-95, 2001.

CHRISTENSEN, L. D. CD73 (ecto-5'-nucleotidase) on blood mononuclear cells. Regulation of ecto-5'-nucleotidase activity and antigenic heterogeneity of CD73 on blood mononuclear cells from healthy donors and from patients with immunodeficiency. **APMIS.** 1997.

CHRISTOFORIDIS, S.; PAPAMARCAKI, T.; GALARIS, D.; KELLNER, R.; TSOLAS, O. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. **Eur Journal Biochem.** 234, 1995.

COLGAN, S. P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signal.** v. 2, p. 351-360, 2006.

CRACK, B. E.; BEUCKER, M. W.; McKECHNIE, K. C.W. et al. Pharmacological analysis of ecto-ATPase inhibition: Evidence for combined enzyme inhibition and receptor antagonism in P2X-purinoreceptor ligands. **Br. J. Pharmacol.** 273: 24814-24821, 1994.

CRAIG, E. A. The heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: JONES, E. W.; PRINGLE, J. R.; BROACH, J. R. (ed.). *The Molecular and cellular biology of the yeast saccharomyces*. New York. **Cold Spring Harbor.** p. 501-37, 1992.

CRAWFORD, P. A.; GADDIE, K. J.; SMITH, T. M.; KIRLEY, T. Characterization of an alternative splice variant of human nucleoside triphosphatediphosphohydrolase 3 (NTPDase3): A processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. **J. Biol. Chem.** 269: 25710-25718, 2007.

CRUZ, G. C. N.; COELHO, M. V. Characterization of the Ca-ATPase activity of *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera: Chysomelidae: Bruchinae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology.** Part B. 2006.

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

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

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

DUARTE, M. M. F.; LORO, V. L.; ROCHA, J. B. T.; LEAL, D. B. R.; BEM, A. F. de; DORNELES, A.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotide of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS J.** 274 (11): 2707-2714, 2007.

EDWARDS, N. L.; MAGILAVY, D. B.; CASSIDY, J. T.; FOX, L. H. Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase deficiency in agammaglobulinemia. **Science.** 201: 628-30, 1978.

ERNSTER, L.; JONES, L. C. Study of the nucleoside tri- and diphosphatase activities of rat liver microsomes. **J. Cell Biol.** 15, 1962.

ESCALADA, A.; NAVARRO, P.; ROS, E.; ALEU, J.; SOLSONA, C.; MARTÍN-SATUÉ, M. Gadolinium inhibition of ecto-Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in torpedo electric organ. **Neurochemical Research.** 29: 1711-1714.

FERRARI, D.; LOS, M.; BAUER, M. K.; VANDENABEELE, P.; WESSELBORG, S.; SCHULZE-OSTHOFF, K. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. **FEBS Lett.** 47: 71-75, 1999.

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

FRASSETO, S. S.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. **Mol. Cell. Biochem.** v. 129, p. 47-55, 1993.

FREDHOLM, B. B.; ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; DALY, J. W.; HARDEN, T. K.; JACOBSON, K. A.; LEFF, P.; WILLIAMS, M. Nomenclature and classification of purinoceptors. **Pharmacol. Rev.** 46, 143-156, 1994.

FÜRSTENAU, C. R.; SPIER, A. P.; RÜCKER, B.; BERTI, S. L.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F. The effects of ebselen on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats. **Chem. Biol. Interact.** 148: 93-96, 2004.

GENDRON, F. P.; HALBFINGER, E.; FISCHER, B.; DUVAL, M.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; BEAUDOIN, A. R. Novel inhibitors of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases: chemical synthesis and biochemical and pharmacological characterizations. **J Med Chem.** 1; 43 (11): 2239-47, jun. 2000.

GODING, J. W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **J. Leukoc. Biol.** v. 67, p. 285-311, 2000.

GODING, J. W.; GROBBEN, B.; SLEGGERS, H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. **Biochim Biophys Acta.** 1638: 1-19, 2003.

HAAG, F.; ADRIOUCH, S.; BRAß, A.; JUNG, C.; MÖLLER, S.; SCHEUPLEIN, F.; BANNAS, P.; SEMAN, M.; KOCH-NOLTE, F. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. **Purinergic Signalling.** 3: 71-81, 2007.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem Biophys Res Commun.** 218: 916-23, 1996.

HARPEL, P. C. Blood proteolytic enzyme inhibitors: their role in modulating blood coagulation and fibrinolytic enzyme pathways. In: COLMAN, R. W.; HIRSH, J.; MARDER, V. J.; SALZMAN, E. W. (ed.). **Hemostasis and Thrombosis**. Philadelphia: J B Lippincott Company, p. 219-34, 1987.

HASGO, G.; KUHEL, D. G.; CHEN, J. F.; SCHWARZSCHILD, M. A.; DEITCH, E. A.; MABLEY, J. G.; MARTON, A.; SZABO, C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. **FASEB J.** 14: 2065-2074, 2000.

HOFFER, S.; IVARSSON, L.; STOITZNER, P.; AUFFINGER, M.; RAINER, C.; ROMANI, N.; HEUFLER, C. Adenosine slows migration of dendritic cells but does not affect other aspects of dendritic cell maturation. **J. Invest Dermatol.** 121: 300-307, 2003.

HYNDMAN, D. J.; MILGROM, Y. M.; BRAMHALL, E. A.; CROSS, R. L. Nucleotide-binding sites on Escherichia coli F1-ATPase. Specificity of noncatalytic sites and inhibition at catalytic sites by MgADP. **J. Biol. Chem.** 269, 1994.

IQBAL, J.; VOLLMAYER, P.; BRAUN, N.; ZIMMERMAN, H.; MULLER, C. E. A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction. **Purinergic Signall.** 1: 349-58, 2005.

IVANENKOV, V. V.; MELLER, J.; KIRLEY, T. L. Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): implications for NTPDase structural modeling. **Biochemistry.** 44 (25): 8998-9012, 2005.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat. Rev. Drug Discov.** 5: 247-264, 2006.

KACZMAREK, K.; KOZIAK, J.; SEVIGNY, J. B.; SIEGEL, J.; ANRATHER, A. R.; BEAUDOIN, F. H.; BACH, S. C. R. Identification and Characterization of CD39/Vascular ATP Diphosphohydrolase. **Journal Biol. Chem.** 271(51): 33116-33122, 1996.

KALIR, Asher; BALDERMAN, David. "2-Phenyl-2-Adamantanamine Hydrochloride". **Organic Syntheses.** Collected Volume 7. p. 433, 1990.

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

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

KEUREN, J. F.; MAGDELEYNS, E. J.; BENNAGHMOUCH, A.; BEVERS, E. M.; CURVERS, J.; LINDHOUT, T. Microparticles adhere to collagen type I, fibrinogen, von Willebrand factor and surface immobilized platelets at physiological shear rates. **British Journal Haematology.** 138: 527-533, 2007.

KNOWLES, A. F.; NAGY, A. K. Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. **Eur J Biochem.** 262 (2): 349-57, 1999.

KRECKLER, L. M.; WAN, T. C.; GE, Z. D.; AUCHAMPACH, J. A. Adenosine inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. **J. pharmacol. Exp. Ther.** 317: 172-180, 2006.

KUKULSKI, F.; SÉVIGNY, J.; KOMOSZYŃSKI, M. Comparative hydrolysis of extracellular adenine nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata. **Brain Res.** Dec. 24: 1030 (1): 49-56, 2004.

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

KUSNER, D. J.; BARTON, J. A. ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent mycobacterium tuberculosis via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion. **Journal Immunol.** 167: 3308-3315, 2001.

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

LAPPAS, C. M.; RIEGER, J. M.; LINDER J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- $\gamma$  production in murine CD4+ T cells. **Journal Immunol.** 174: 1073-1080, 2005.

LE, G. T.; ABBENANTE, G.; MADALA, P. K.; HOANG, H. N.; FAIRLIE, D. P. Organic azide inhibitors of cysteine protease. **J. Am. Chem. Soc.** v. 128, p. 12396-12397, 2006.

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

LEBEL, D.; POIRIER, C. G.; PHANEUF, S.; ST-JEAN, P.; LALIBERTÉ JF BEAUDOIN AR. Characterization and purification of calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. **Journal Biol Chem.** 255: 1227-33, 1980.

LECLERC, M. C.; GRONDIN, G.; GENDRON, F. P.; SÉVIGNY, J.; BEAUDOIN, A. R. Identification, characterization, and immunolocalization of a nucleoside triphosphate diphosphohydrolase in pig liver. **Arch Biochem Biophys.** 15; 377 (2): 372-8, may. 2000.

LEHNINGER, A. L.; COX, M.; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica.** 4. ed. Sarvier, 2004.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunológica.** 4. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998.

LICHSTEIN, M. H. Soule. **Journal of Bacteriology.** 47 (3): 221-230. The American Society for Microbiology. ISSN 0343-6993. 1943.

LUNKES, G. I.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSH, A.; MORSH, U. U. M.; MAZZANTTI, C. M.; SCHETINGER, M. R. C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thromb. Res.** 109: 189-194, 2003.

LUTHJE, J. Original metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. **Klin. Wochenschr.** 67: 317-327.

MALISZEWSKI, C. R.; DELESPESE, G. J.; SCHOENBORN, M.A.; ARMITAGE, R. J.; FANSLAW, W. C.; NAKAJIMA, T et al. CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. **J Immunol.** 153: 3574-83, 2004.

MARCUS A. J.; BROEKMAN, M. J.; DROSOPOULOS, J. H.; ISLAM, N.; PINSKY, D. J.; SESTI, C.; LEVI, R. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **J Pharmacol Exp Ther.** 305 (1): 9-16, 2003. Review.

MATEO, J.; HARDEN, T. K.; BOYER, J. L. Function expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. **Br J Pharmacol.** 128: 396-402, 1999.

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

MÜLLER, C. E.; IQBAL, J.; BAQI, Y.; ZIMMERMANN, H.; RÖLLICH, A.; STEPHAN, H. Polyoxometalates – anew class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. **Biorg. Medic. Chem. Letters.** 16: 5943-5947, 2006.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol Rev.** 82: 1013-1067, 2002.

ORRENIUS, S.; MCCONKEY, D. J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca<sup>2</sup> in toxic cell killing. **Trends Pharmacol Sci.** 10: 281-5, 1989.

OSÉS, J. P.; CARDOSO, C. M.; GERMANO, R. A.; KIRST, I. B.; RÜCKER, B.; FÜRSTENAU, C. R.; WINK, M. R.; BONAN, C. D.; BATTASTINI, A. M.; SARKIS, J. J. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Life Sci.** 14; 74 (26): 3275-84, may. 2004.

PANTHER, E.; CORINTI, S.; IDZKO, M.; HEROUY, Y.; NAPP, M.; GIROLOMONI, G.; NORGAUER, J. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. **Blood** 101. p. 3985-3990, 2003.

PAN-ZHOU, X. R.; CRETTON-SCOTT, E.; ZHOU, X. J.; YANG, M. X.; LASKER, J. M.; SOMMADISSI, J. P. **Biochem. Pharmacol.** v. 55, p. 757-766.

PICHER, M.; BOUCHER, R. C. Biochemical evidence for an ecto alkaline phosphodiesterase I in human airways. **Am Journal Respir Cell Mol Biol.** 23: 255-61, 2000.

PILLA, C.; EMANUELI, T.; FRASSETTO, S. S.; BATTASTINI, A. M.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets.** 6: 225-30, 1996.

PINHEIRO, C. M. **Caracterização parcial de uma ATPase de citosol de encéfalo de rato.** 2001. 79 f. Dissertação de Mestrado (Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

PLESNER, L.; KIRLEY, T. L.; KNOWLES, A. F. Ecto-ATPases. Recent Progress on Structure and Function. **Plenum Press.** New York and London, 1997.

PRESCHER, J. A.; DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. **Nature.** 430: 873-877, 2004.

PULLMAN, M. E.; PENEFSKY, H. S.; DATTA, A.; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.** 235, 1960.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. **Pharmacol Rev.** 50: 413-92, 1998.

RASKOVALOVA, T.; HUANG, X.; SITKOVSKY, M.; ZACHARIA, L. C.; JACKSON, E. K.; GOLERELIK, E. Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. **J. Immunol.** 175: 4383-4391, 2005.

RESTA, R.; THOMPSON, L. F. T cell signaling through CD37. **Cell Signal.** 9: 131-9, 1997.

RICO, E. P.; SENGER, M. R.; FAUTH, M. da G.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). **Life Sci.** 5; 73 (16): 2071-82, sep. 2003.

ROBERTS, R. M.; MATHIALAGAN, N.; DUFFY, J. Y.; SMITH, G. W. Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. **Critical reviews in Eukaryotic Gene Expressions.** 5 (3&4): 385-436, 1995.

ROBSON, S. C.; CANDINAS, D.; SIEGEL, J. B. et al. Potential mechanism of abnormal thromboregulation in xenograft rejection—loss of ecto-ATPases upon endothelial cell activation. **Transplantation Proc.** 28: 536, 1996.

ROBSON, S. C.; DAOUD, S.; BEGIN, M. et al. Modulation of vascular ATP diphosphohydrolase by fatty acids. **Blood Coagul. Fibrinolysis.** 8: 21-27, 1997.

ROBSON, S. C.; KACZMAREK, E.; SIEGEL, J. B. et al. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. **J. Exp. Med.** 185: 153-163.

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

ROSI, C. F.; MARINELLO, E. T. Ecto-5'-nucleotidase in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Biomed Pharmacother.** 56: 100-4, 2002.

SALVESEN, G.; NAGASE, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (eds.). **Proteolytic enzymes a practical approach.** Oxford: IRL Press, 1989.

SANCHEZ, Y.; TAULIEN, J.; BORKOVICH, K. A.; LINDQUIST, S. Hsp 104 is required for tolerance to many forms of stress. **Embo Journal.** 11: 2357-64, 1992.

SARKIS, J. J. F et al. ATP diphosphohydrolases: an overview. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science.** v. 47, p. 131-136, 1995.

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

SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; BONAN, C. D.; WYSE, A. T. S. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. **BioFactors**. 30: 1-22, 2008.

SCRIVEN, E. F. V.; TURNBULL, K. **Chem. Rev.** p. 297-368, 1988.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N.; GUCKELBERGER, O.; CSIZMADIA, E.; QAWI, I.; IMAI, M.; ZIMMERMANN, H.; ROBSON, S. C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. **Blood**. 15: 99 (8): 2801-9, 2002.

SHI, J. D.; KULAR, T.; WANG, C. M.; LI, Q. Z.; CRUZ, P. E.; DAVAOODI-SEMIRONI, A. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). **Journal Biol Chem**. 276: 17474-78, 2001.

SHPETNER, H. S.; PASCHAL, B. M.; VALLEE, R. B. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). **J. Cell Biol.** v. 107, p. 1001-1009, 1988.

SILVA, A. C.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; CORRÊA, M.; ARANTES, L. C.; ARAÚJO, M. C.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in chronic renal failure: relationship between hemostatic defects and renal failure severity. **Biochim Biophys Acta**. 1741: 282-288, 2005.

SITKOVSKY, M. V.; OHTA, A. **The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors:** Trends immunol. 26: 299-304, 2005.

SMITH, T. M.; LEWIS, C. S. A.; KIRLEY, T. L. Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: Inactivation and conversion of an ecto-apyrase to an ecto-NTPase. **Biochemistry**. 38: 5849-5857, 1999.

STROBEL, R. S.; NAGY, A. K.; KNOWLES, A. F.; BUEGEL, J.; ROSENBERG, M. O. Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase. Purification and characterization. **J. Biol. Chem**. 271, 1996.

TODOROV, L. D.; MIHAYLOVA-TODOROVA, S.; WESTFALL, T. D.; SNEDDON, P.; KENNEDY, C.; BJUR, R. A.; WESTFALL, D. P. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. **Nature**. 387: 76-79, 1997.

TRAVIS, J.; SALVESEN, G. Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors. **Behring Inst Mitt**. 73: 56-65, 1983.

VASILYEVA, E. V.; MINKOV, I. B.; FITIN, A. F.; VINOGRADOV, A. D. Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite. **Biochem. J**. 202, 1982.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 3. ed. 2004.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of Biochemistry**. Life at the Molecular Level. 2. ed., 2006.

VUADEN, F. C.; COGNATO, G. P.; BONORINO, C.; BOGO, M. R.; SARKIS, J. J. F.; BONAN, C. D. Lipopolysaccharide alters nucleotidases activities from lymphocytes and serum of rats. **Life Sci.** v. 80, p. 1784-1791, 2007.

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

WHITE, M. P. Hypophosphatasia: nature's window on alkaline phosphatase function in man. In: BILEZKIAN, J.; RAISZ, L.; RODAN, G. **Principles of Bone Biology.** San Diego: Academic Press. p. 951-68, 1996.

YAGI, K.; KATO, N.; SHINBO, M.; SHIMBA, L. S.; MIURA, Y. Purification and characterization of adenosine phosphatase from human umbilical vessels. **Chem. Pharm. Bull.** 40, 1992.

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

YEGUTTKIN, G. G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. **Biochim. Biophys. Acta.** 1783: 673-694, 2008.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Práticas.** 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Characterization of Rat NTPDase1, -2, and -3 Ectodomains Refolded from Bacterial Inclusion Badiest. **Biochemistry.** 46 (42): 11945-11956, 2007.

ZHENG, L. M.; ZYCHLINSKY, A.; LIU, C. C.; OJCIUS, D. M.; YOUNG, J. D. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. **Journal Cell Biol.** 112: 279-88, 1991.

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

\_\_\_\_\_. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol.** 362: 299-309, 2000.

\_\_\_\_\_. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 362: 299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H.; BRAU, N. Ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties and functional roles in the nervous system. **Prog Brain Res.** 120: 371-85, 1999.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)