

**CONDIÇÕES IDEAIS DE pH E TEMPERATURA PARA
A ATIVIDADE DA NTPDase EM LINFÓCITOS DE
PACIENTES IMUNODEPRIMIDOS PELA INFECÇÃO
CAUSADA PELO HIV¹**

*IDEAL CONDITIONS FOR pH AND TEMPERATURE IN THE NTPDase
ACTIVITY IN LYMPHOCYTES OF IMMUNOSUPPRESSED PATIENTS
BY HIV INFECTION*

**João Felipe Peres Rezer², Luciana dos Santos Lopes³, Cláudio
Alberto Martins Leal⁴, Maria Rosa Chitolina Schetinger⁵ e
Daniela Bitencourt Rosa Leal⁶**

RESUMO

A NTPDase (ecto-apirase, ecto-difosfoidrolase, CD39, EC 3.6.1.5) é uma enzima identificada como antígeno de superfície de células linfóides, cuja maior expressão leva a um aumento da hidrólise do ADP e ATP nessas células. O objetivo, neste trabalho, foi caracterizar a enzima NTPDase em linfócitos de pacientes imunodeprimidos pela infecção causada pelo HIV, determinando condições ideais *in vitro* para sua atividade. As amostras utilizadas foram provenientes de pacientes HIV-positivos atendidos no ambulatório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Santa Maria. Os linfócitos foram isolados de sangue total coletado com EDTA e separados em Ficoll-Hystopaque em gradientes de densidade. As amostras foram incubadas tendo ATP e ADP como substratos e a atividade enzimática determinada medindo a liberação de fosfato inorgânico através de ensaio colorimétrico, com verde de malaquita como reagente. Em linfócitos de pacientes HIV positivos, observou-se uma atividade máxima da enzima em temperatura de 37°C e pH 8,0 tanto na hidrólise de ATP como na hidrólise de ADP.

Palavras-chave: NTPDase, linfócitos e HIV.

¹ Trabalho de Iniciação Científica - PROBIC.

² Acadêmico do Curso de Biomedicina - UNIFRA.

³ Aluna do Mestrado em Nanociências - UNIFRA.

⁴ Professor do Curso de Biomedicina - UNIFRA

⁵ Professora do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica - UFSM.

⁶ Orientadora - UNIFRA.

ABSTRACT

The NTPDase (ecto-apirase, ecto-difosfoidrolase, CD39, EC 3.6.1.5) is an enzyme identified as the surface antigens of lymphoid cells, which an increased expression leads to an increased hydrolysis of ATP and ADP in these cells. The objective of this study was to characterize the enzyme NTPDase in lymphocytes of patients immunosuppressed by HIV infection, determining the ideal conditions in vitro for their activity. The samples used were from HIV-positive patients seen at the clinic of Infectious Diseases at the Santa Maria University Hospital (Santa Maria-RS). The lymphocytes were isolated from whole blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Hystopaque on density gradients. The samples were incubated with ATP and ADP as substrates and enzymatic activity determined by measuring the release of inorganic phosphate by colorimetric test with green of malachite as reagent. As for the lymphocytes of HIV-positive patients, there was a maximum activity of the enzyme in temperature of 37°C and pH 8.0 in both the hydrolysis of ATP as the hydrolysis of ADP.

Keywords: NTPDase, lymphocytes, HIV.

INTRODUÇÃO

O HIV é um retrovírus conhecido como vírus da imunodeficiência humana, inicialmente isolado por Montagnier e colaboradores, em 1983-1984; foi denominado HIV-1, atualmente distribuído por todo o mundo (STURM, 1988). As células que possuem o antígeno de superfície CD4 são suscetíveis à infecção pelo HIV-1. Os mecanismos de defesa do hospedeiro incluem respostas celulares e humorais, a resposta imune inicial é caracterizada por uma expansão maciça de linfócitos T citotóxicos específicos para peptídeos derivados de proteínas do HIV, o que pode levar a uma redução da viremia (ABBAS et al., 2002). Os pacientes imunodeprimidos pela infecção causada pelo HIV possuem sérias alterações no metabolismo das células imune, incluindo alterações bioquímicas. Sugere-se que a indução inapropriada de apoptose de células T está envolvida na perda contínua de células CD4+ durante a infecção pelo HIV-1 (SAMUELSSON et al., 1997).

Por estarem amplamente distribuídas nas células sanguíneas, as ectonucleotidases participam de importantes interações celulares, agindo, por exemplo, na agregação plaquetária e em processos inflamatórios e imunes (ZIMMERMANN,

2001). 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 como ATP e ADP extracelular e/ou outros di ou tri fosfatados. A NTPDase (ecto-apirase, ecto-difosfohidrolase, CD39, EC 3.6.1.5) é uma ectonucleotidase e possui importante desempenho no controle da função linfocitária, incluindo o reconhecimento do antígeno e/ou ativação de atividades efetoras das células T-citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990). Essa enzima foi identificada como o antígeno de superfície CD39 das células linfóides, sendo que o aumento de sua expressão levaria a uma maior hidrólise de ADP e ATP nessas células. A infecção pelo HIV resulta em alterações nas células imunes e na secreção de citocinas importantes na resposta a patógenos. Nessa situação, podem ocorrer alterações bioquímicas na resposta imune, como, por exemplo, alterações na hidrólise de nucleotídeos, ou seja, na atividade das enzimas que degradam nucleotídeos extracelulares.

A hidrólise de ATP pela NTPDase é necessária para a secreção de citocinas de tipo 1 pelo linfócito T CD4+, como IL-2 e IFN- γ , indispensáveis à continuidade da resposta imune celular e ativação da resposta imune humoral (BAILER et al., 1999). O CD39 (NTPDase) foi originalmente identificado como marcador de ativação linfóide expresso em linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, células NK e endoteliais e, também, como capaz de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (KANSAS et al., 1991). Essa enzima hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons de Ca⁺ e Mg⁺ (ZIGANSHIN et al., 1994).

A análise das sequências de todas as NTPDases mostra a existência de cinco regiões conservadas as quais foram chamadas de “regiões conservadas da apirase” (ACR) e estão envolvidas na formação do sítio catalítico da enzima, para que ocorra a hidrólise dos nucleotídeos tri e difosfato (ZIMMERMAN, 2001; ROBSON et al., 2006). Vuaden et al. (2007) demonstraram uma alteração na atividade das nucleotidases de linfócitos e soros de ratos na presença de lipopolissacarídeos. Os autores sugerem que as mudanças na atividade da enzima agem na regulação dos nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares no modelo, iniciando o processo inflamatório. Foi observado por Leal e colaboradores (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 dessas células.

Através da determinação da atividade da NTPDase em linfócitos de pacientes HIV-positivos, verificou-se um aumento em sua atividade, acompanhada

por uma maior expressão de CD39 na superfície dessas células (LEAL et al., 2005a), sugerindo um importante desempenho da enzima no controle da função dos linfócitos. Neste trabalho, teve-se como objetivo principal a caracterização da NTPDase em linfócitos de pacientes HIV-positivos, os quais possuem grandes alterações em relação à resposta imune, como diminuição no número de linfócitos T, bem como alterações funcionais nessas células. Uma vez que a enzima está relacionada a funções exercidas por células que são responsáveis pelo sistema imune, há uma necessidade de se estudar as condições ideais para a atividade dessa ecto-enzima em linfócitos humanos, durante patologias relacionadas à imunidade, como a infecção pelo HIV.

MATERIAIS E MÉTODO

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Nanociências no Centro Universitário Franciscano. As amostras utilizadas foram provenientes de pacientes HIV-positivos atendidos no ambulatório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Santa Maria (Santa Maria-RS) e obtidas através de punção venosa.

Os linfócitos foram isolados de sangue total coletado com EDTA e separados em Ficoll-Hystopaque em gradientes de densidade, conforme Böyum (1968). A concentração de proteína foi determinada através de método colorimétrico com Comassie Blue, conforme Bradford (1976). A hidrólise dos nucleotídeos foi determinada pela medida de fosfato inorgânico liberado na reação usando o método colorimétrico de Chan et al. (1986) e padronizada em linfócitos por Leal e et al. (2005b). As amostras foram incubadas tendo ATP e ADP como substratos por 70 minutos, utilizando reagente verde de malaquita.

Após foram analisadas em triplicatas para avaliar a atividade específica em nmol de Pi/ min/mg de proteína. As condições ideais para incubação foram determinadas testando-se uma faixa de pH de 6 a 9 com tampões TRIS e MES a temperaturas de 15, 25, 37 e 45°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os mediadores capazes de modular as ações dos linfócitos destacam-se os nucleosídeos e nucleotídeos da adenina, em especial o ATP extracelular, que é capaz de regular as interações célula-célula, sendo importante nos processos de ativação, diferenciação, desenvolvimento, proliferação, morte

celular e respostas efetoras dos linfócitos (REDEGELD et al., 1997; BURNSTOCK, 1997; DI VIRGILIO, 2000). Os nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares agem como moléculas sinalizadoras e estão envolvidos em um amplo espectro de efeitos biológicos (SCHETINGER et al., 2007). A atividade da NTPDase em linfócitos foi caracterizada por Leal et al. (2005) e esta enzima tem sido reportada como um marcador de ativação necessário para a função efetora dos linfócitos, participando também dos processos de reconhecimento de antígeno (DOMBROWSKI et al., 1998; MUSI et al., 2007). A CD39 desempenha também um papel imunoregulador celular pela a hidrólise de ATP (e talvez de ADP), liberados pela célula T durante a apresentação antigênica, gerando adenosina, uma molécula imunossupressora (DWYER et al., 2007).

Verificou-se que a atividade máxima da enzima, tanto na hidrólise de ATP como de ADP, ocorreu em pH 8 (Figura 1). Observaram-se as seguintes atividades enzimáticas na temperatura de 37°C, para hidrólise de ATP e ADP, respectivamente: $95,33 \pm 7,23$ e $82,60 \pm 29,75$ nmol de Pi/min/mg de proteína (média \pm EPM; n=3).

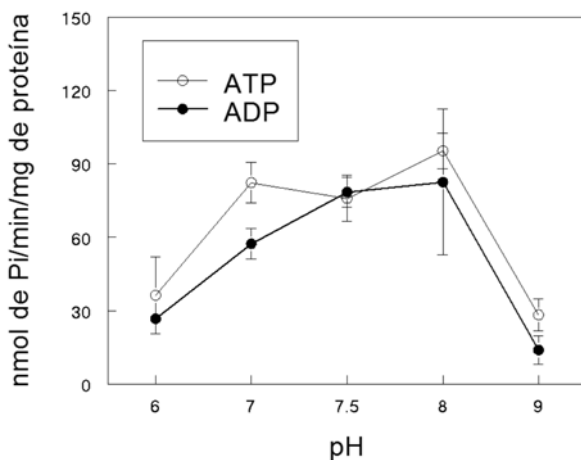


Figura 1 - Hidrólise de ATP e ADP em linfócitos de pacientes HIV-positivos em diferentes pHs.

Em relação à atividade da enzima com a temperatura, observou-se que tanto na hidrólise de ATP como de ADP a melhor atividade foi encontrada na temperatura de 37°C (Figura 2). Ainda, verificaram-se as seguintes atividades enzimáticas em pH 8 e temperatura de 37°C, para hidrólise de ATP e ADP,

respectivamente: $44,03 \pm 4,03$ e $69,66 \pm 22,18$ nmol de Pi/min/mg de proteína (média \pm EPM; n=3).

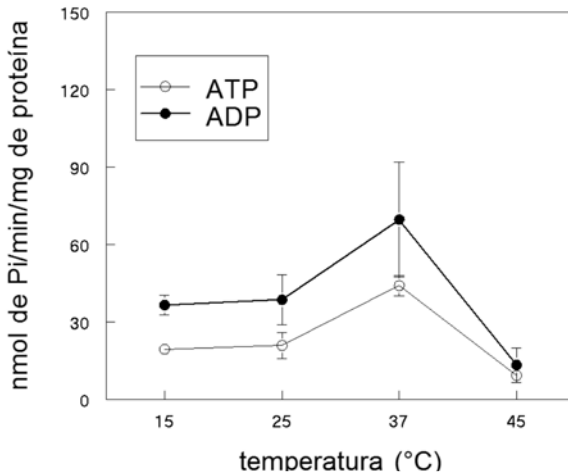


Figura 2 - Hidrólise de ATP e ADP em linfócitos de pacientes HIV-positivos em diferentes temperaturas.

Os resultados encontrados estão de acordo com caracterizações anteriores de NTPDases em outros tecidos, como, por exemplo, em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos e pâncreas de porcos (BATTASTINI et al., 1991; LEBEL et al., 1980), em plaquetas humanas (PILLA et al., 1996) e, também, em linfócitos de pacientes imunocompetentes (LEAL et al., 2005b), que as condições ótimas de incubação foram estabelecidas com pH alcalino de 8.0 e temperatura de incubação de 37°C.

CONCLUSÃO

Ser portador do HIV não altera os linfócitos a ponto de modificar as condições de temperatura e pH, nas quais a enzima NTPDase apresenta maior atividade. Para caracterização completa dessa enzima é necessário realizar novos experimentos relacionados a concentrações de cálcio e magnésio, parâmetros cinéticos, especificidade de substrato e exclusão de associações enzimáticas. A alteração na atividade da enzima NTPDase em linfócitos de pacientes com HIV confirma o importante papel das ecto-nucleotidases na regulação dos níveis de ATP e ADP, os quais atuam como moléculas sinalizadores em várias células sanguíneas, como os

linfócitos. Apesar dos avanços em direção à compreensão da estrutura molecular das ectonucleotidases mais investigações serão necessárias para compreender inteiramente o seu papel em condições fisiológicas e patológicas.

REFERÊNCIAS

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

BAILER, R. et al. IL-13 and INF-gamma secretion by activated T cells in HIV-infection associated with viral suppression and a lack of disease progression. **J Immunol**, v. 162, p. 7534-7542, 1999.

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

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

BURNSTOK, G. The past, present and future of purine nucleotides as signaling molecules. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 1127-1139, 1997.

CHAN, K. M.; DEIFERT, D.; JUNGER. K. D. A direct colorimetric assay for the Ca₂ ATPase activity. **Anal Biochem**, v. 157, n. 2, p. 375-380, 1986.

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

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

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

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**, v. 87, p. 8267-8271, 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**, v. 146, p. 2235-2244, 1991.

LEAL, D. B. R. et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1746, p. 129-134, 2005a.

_____. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E. C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9-11, 2005b.

LEBEL, D. et al. Characterization and purification of calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. **Journal Biol Chem**, v. 255, p. 1227-1233, 1980.

MUSI, E.; ISLAM, N.; DROSOPOULOS, J. H. Constraints imposed by transmembrane do-mains affect enzymatic activity of membrane-associated human CD39/NTPDase1 mutants. **Arch Biochem Biophys**, v. 461, p. 30–39, 2007.

REDEGELD, F. A.; SMITH, P.; APASOV, S.; SITKOVSKY, M. V. Phosphorylation of T-lymphocyte plasma membrane-associated proteins by ectoprotein kinases: implications for a possible role for ectophosphorylation in T-cell effector functions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1328, n. 2, p. 151-165, 1997.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 6, p. 225-230, 1996.

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

SAMUELSSON, A. et al. Apoptosis of CD4+and CD19+Cells during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection— Correlation with Clinical Progression, Viral Load, and Loss of Humoral Immunity. **Virology**, v. 238, p. 180-188, 1997.

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**, v. 30, p. 1-22, 2007.

STURM, J. HIV serology: a review. **Rev Bra Pat Clin**, v. 24, p. 127-141, 1988.

VUADEN, F. C. et al. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. **Life Sci**, v. 80, p. 1784-1791, 2007.

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

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

