



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**



DHÉBORA ALBUQUERQUE DIAS

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOSÍDEO
TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLÁSICA (E-NTPDASE; EC 3.6.1.5) EM
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C**

CAMPO GRANDE - MS

2017

DHÉBORA ALBUQUERQUE DIAS

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOSÍDEO
TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLÁSICA (E-NTPDASE; EC 3.6.1.5) EM
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

CAMPO GRANDE - MS

2017

DHÉBORA ALBUQUERQUE DIAS

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOSÍDEO
TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLÁSICA (E-NTPDASE; EC 3.6.1.5) EM
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques (Presidente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / UFMS

Prof. Dr.^a Giovana Cristina Giannesi
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / UFMS

Prof. Dr.^a Fabiana Fonseca Zanoelo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / UFMS

Prof. Dr.^a Carla Santos Oliveira (Suplente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / UFMS

CAMPO GRANDE - MS

2017

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Jeandre Jaques, meu orientador por todos os anos de convivência, todos os ensinamentos, atenção e dedicação: a minha gratidão.
- À minha família, principalmente meus pais Ruth e João, meu irmão Iago, pelo amor, apoio e carinho em todos os momentos. Amo vocês.
- Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro de todas as horas, Márcio Sergio Arimura, pelo carinho, compreensão, amor e solidariedade inefável. Sendo assim, agradeço também a minha sogra Marlene Valejo Arimura, por ter me acolhido e muitas vezes me tratado como sua própria filha. A minha cunhada Márcia Nara Arimura e os meus sobrinhos, por fazerem parte dessa história.
- Aos alunos de iniciação científica Bruna de Barros, Pedro Mendes dos Santos, pela dedicação na realização deste trabalho.
- Aos amigos e colegas do Laboratório de pesquisa da Bioquímica, pelos momentos compartilhados, pela amizade e ajuda em todos os momentos necessitados.
- Aos meus colegas e grandes amigos Professora Dr^a Alice Maria Derbocio, Lucas Derbocio, Sandriane Soares, Elton Raul Loio, Marcela Nogueira Rabelo Alves e Ângela Akimi pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pela amizade durante todos esses anos.
- À CAPES, pela bolsa concedida.
- Á FUNDECT, pelo fomento para execução desta pesquisa.
- Aos amigos e a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho; a minha gratidão.

RESUMO

DIAS, DA. Caracterização da atividade ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolásica (E-NTPDASE; EC 3.6.1.5) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Campo Grande; 2016.

[Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A enzima ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) hidrolisa os nucleotídeos extracelulares ATP em ADP e este em AMP. Desta forma, ela regula os níveis dos agonistas dos receptores P2X e P2Y. Este estudo propôs a caracterização da atividade da E-NTPDase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Após a investigação da viabilidade celular foi realizada a caracterização enzimática que envolveu a análise do intervalo de linearidade da atividade enzimática em relação ao conteúdo de enzima (proteína) e tempo de reação, o efeito dos íons cálcio e magnésio, os valores ótimos de pH e temperatura, as constantes cinéticas K_m e V_{max} , efeito dos inibidores de ATPases e fosfatases e a especificidade da enzima por outros substratos. Após 12 horas, 90% das células mantiveram a viabilidade da membrana celular preservada. Para a hidrólise de ambos os substratos (ATP e ADP) foi observado linearidade no intervalo de 0,2 a 0,8 μg de proteína por reação e no intervalo de 5 a 80 minutos. Foi observado que há ativação da catálise na presença de íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} na concentração de 1.5 mM, no entanto o cálcio permitiu um aumento mais acentuado na atividade enzimática. Esta foi máxima em meio alcalino (pH 8.5) e à temperatura de 37 °C. Os valores de K_m aparente foram de 0.51 e 0.66 mM para a hidrólise de ATP e ADP, respectivamente. Os valores de V_{max} foram de 136.4 e 120.8 nmol de P_i /min/mg de proteína para a atividade ATPásica e ADPásica, respectivamente. A hidrólise dos nucleotídeos foi inibida na presença de azida de sódio (20mM; ATP: $p < 0.05$; ADP < 0.001), fluoreto de sódio (20mM; ATP e ADP: $p < 0.001$) e suramina (0.3mM; ATP: $p < 0.01$; ADP: $p < 0.05$). Os inibidores oligomicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ortovanadato (0.5 mM), Ap5A (0.01 mM), oubaína (0.1 e 1 mM), NEM (1 mM), levamisol (1 mM), tetramisol, e azida de sódio (1.0, 5.0 e 10 mM), não apresentaram efeito inibitório sobre a hidrólise de ATP e ADP. Isso mostra que outras enzimas que hidrolisam moléculas fosfatadas não estão participando da catálise durante o tempo de incubação. Quanto à especificidade por substrato, embora a enzima seja capaz de hidrolisar outros nucleotídeos tri e difosfatos, ela apresenta maior afinidade por nucleotídeos de adenina. Além disso, um comportamento paralelo de inibição, com relação à hidrólise dos substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP, constituiu uma importante evidência que estes são hidrolisados por uma mesma enzima, uma ATP-difosfohidrolase. Finalmente, o conhecimento das propriedades catalíticas da E-NTPDase em macrófagos é imprescindível para determinar apropriadamente a sua atividade e para compreender de uma forma mais completa o perfil de resposta imune em animais saudáveis e em condições patológicas.

Palavras-chave: E-NTPDase, CD39, macrófagos, caracterização, ectonucleotidasas.

ABSTRACT

DIAS, DA. Characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity (E-NTPDase) in peritoneal macrophages of BALB/c mice. Campo Grande; 2016. [Dissertation - Federal University of Mato Grosso do Sul].

The enzyme ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase; EC 3.6.1.5; CD39) hydrolyzes extracellular nucleotides ATP and ADP and thereby modulates the activity of P2X and P2Y receptors. This study aimed to characterize the activity of this enzyme in peritoneal macrophages from BALB/c mice. After the investigation of cell viability it was carried out the enzymatic characterization involving the analysis of enzymatic activity linearity range compared to enzyme content (protein) and reaction time, the influence of calcium and magnesium ions, the optimum pH value and temperature, kinetic constants V_{max} and K_m . the effect of ATPase inhibitors and phosphatases and the specificity of the enzyme by other substrates. After 12 hours, 90% of the cells maintained viability of the cell membrane preserved. For hydrolysis of both substrates (ATP and ADP) it was observed linearity in the range 0.2 to 0.8 μg of protein per reaction and in the range of 5 to 80 minutes. It was observed that activation of catalysis in the presence of Ca^{2+} or Mg^{2+} ions at a concentration of 1.5 mM, however calcium ion has allowed a more pronounced increase in the enzymatic activity. It was maximal in alkaline medium (pH 8.5) and at 37 ° C. The apparent K_m values were 0.51 and 0.66 mM for the hydrolysis of ATP and ADP, respectively. The V_{max} values were 136.4 and 120.8 nmol Pi / min / mg protein for ATPase and ADPase activity, respectively. The hydrolysis of the nucleotides was inhibited in the presence of sodium azide (20mM; ATP: $p < 0.05$; ADP < 0.001), sodium fluoride (20mM, ATP and ADP: $p < 0.001$) and suramin (0.3mM; ATP: $p < 0.01$; ADP: $p < 0.05$). The other inhibitors were oligomycin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), orthovanadate (0.5 mM), Ap5A (0.01 mM), ouabain (0.1 and 1 mM), NEM (1 mM), levamisole (1 mM), Tetramisole, sodium azide (1.0, 5.0 and 10 mM), had no inhibitory effect on the hydrolysis of ATP and ADP. This shows that other enzymes that hydrolyze phosphate molecules are not participating in the catalysis during the incubation time. As for substrate specificity, although the enzyme is capable of hydrolyzing other tri and diphosphate nucleotides, it has a higher affinity for adenine nucleotides. Furthermore, a parallel inhibition behavior with respect to hydrolysis of substrates Ca^{2+} -ATP and Ca^{2+} -ADP constituted an important evidence that these are hydrolyzed by the same enzyme, an ATP-diphosphohydrolase. Finally, knowledge of the catalytic properties of E-NTPDase in macrophages is imperative to appropriately determine its activity and to more fully understand the immune response profile in healthy animals and pathological conditions.

Keywords: E-NTPDase, CD39, macrophages, characterization, ectonucleotidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Figura 1 – Componentes da sinalização purinérgica..... 16
- Figura 2 – Estrutura dos nucleotídeos púricos ATP, ADP e AMP.....17
- Figura 3 – Funções do ATP extracelular em baixas e altas concentrações na modulação da resposta imune.....18
- Figura 4 – Estrutura dos receptores P1, P2X e P2Y.....21
- Figura 5 – Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina.....22
- Figura 6 – Árvore filogenética hipotética para os membros da família das NTPDases (NTPDase1 a NTPDase8) de ratos (r), seres humanos (h) e camundongos (m), após o alinhamento da sequência de aminoácidos.....23
- Figura 7 – Membros da família das NTPDases, suas localizações na membrana e propriedades catalíticas.....24
- Figura 8 – Representação da enzima ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana plasmática.....26
- Figura 9 – Sítios de hidrólise catalisada pelas enzimas, NTPDase, E-5'NT, AP e NPP1, NPP2, NPP3.....28
- Figura 10 – Comparação entre a maturação das células dendríticas através da via canônica ou clássica e via alternativa na presença do ATP extracelular.....31

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 - Effects of inhibitors on ATP and ADP hydrolysis by mice macrophages...48

Table 2 - Substrate specificity of E-NTPDase from mice peritoneal macrophages....49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MANUSCRITO

- Figure 1 - Effect of temperature on E-NTPDase activity from mice peritoneal macrophages with ATP or ADP as substrate50
- Figure 2 - Effect of pH on the ATP-diphosphohydrolase activity.....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	nucleosídeo difosfato de adenosina
AMP	nucleosídeo monofosfato de adenosina
Ap3A	diadenosina trifosfato
ATP	nucleosídeo trifosfato de adenosina
CD	grupo de diferenciação (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
CD40L	CD40 ligante
CaCl ₂	cloreto de cálcio
E-5'-NT	ecto-5'-nucleotidase
E-NPP	ecto-nucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDase	ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
K ⁺	cátion potássio
KCl	cloreto de potássio
mg	miligramas
Mg ²⁺	cátion magnésio
mM	milimolar
Na ⁺	íon sódio
Pi	fosfato inorgânico
Treg	células T regulatórias
TCA	ácido tricloroacético (do inglês, <i>trichloroacetic acid</i>)
μL	microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Nucleotídeos extracelulares	16
3.1.1 ATP	18
3.1.2 ADP	19
3.1.3 AMP e adenosina	20
3.2 Receptores purinérgicos	21
3.3 Ectonucleotidasas	22
3.3.1 Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase)	22
3.3.2 Ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT)	26
3.3.3 Fosfatase alcalina.....	27
3.3.4 Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP).....	28
3.4 Funções da E-NTPDase em macrófagos	29

**4 ARTIGO - CHARACTERIZATION OF ECTONUCLEOSIDE
TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE (E-NTPDase; CD 39; EC
3.6.1.5) ACTIVITY IN MICE MACROPHAGES**

Abstract.....	34
Introduction.....	35
Materials and methods.....	36
Results.....	38
Discussion.....	40
References.....	44
Figures.....	47
5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICES	66
ANEXO.....	68

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta Dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo. A seção Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio artigo e representa a íntegra deste estudo.

A seção Referências contém as referências das citações que aparecem nos itens Introdução e Revisão de Literatura.

O artigo está estruturado de acordo com as normas da revista *Cell Biochemistry and Function*.

1 INTRODUÇÃO

Os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e o seu nucleosídeo derivado, a adenosina, atuam no meio extracelular como moléculas sinalizadoras (ZIMMERMANN, 2001) envolvidas em diversas funções fisiológicas, como por exemplo: na tromborregulação e homeostasia e na função plaquetária (ZIMMERMANN, 1999); na regulação do tônus vascular (CROWLEY et al. 1994; DUBEY, GILLESPIE, JACKSON, 1999), no desenvolvimento sináptico (BRAUN et al. 1995; SCHOEN, KREUTZBERG, 1994), na neurogênese (ZIMMERMANN, 2006), na neurotransmissão (ZIMMERMANN, 2008), no pré-condicionamento isquêmico e adaptação à hipóxia (SCHETINGER et al. 1998a; 1998b); na função cardíaca (FORRESTER, WILLIAMS, 1977; PADDLE, BURNSTOCK, 1974); na contração muscular (BUCHTHAL, FOLKOW, 1944, 1948; BURNSTOCK, ARNETT, ORRISS, 2013); na adesividade celular (DZHANDZHUGAZYAN; BOCK, 1993); e na complexa orquestra de eventos que modula a resposta imune (BOURS et al. 2006; JUNGER, 2011). Estas moléculas sinalizadoras, juntamente com os seus receptores de membrana (ILLES, ALEXANDRE, 2004) e enzimas envolvidas em sua degradação (ZIGANSHIN et al. 1994) compõem o chamado sistema purinérgico.

Os receptores purinérgicos para nucleotídeos podem ser divididos em duas subclasses: acoplados a proteína G, chamados de P2Y, e os ligados a canais iônicos, designados P2X (RALEVIC, BURNSTOCK, 1998). Através destes receptores, os nucleotídeos desencadeiam uma amplitude de respostas fisiológicas, como mencionado anteriormente. No entanto, depois de transmitida, esta sinalização precisa ser terminada e para isto existe um grupo de enzimas envolvidas na regulação dos níveis extracelulares destes nucleotídeos e do nucleosídeo adenosina (ZIMMERMANN, ZEBISCH, STRÄTER, 2012).

Dentre as enzimas do sistema purinérgico, as ectonucleotidases atuam na regulação dos níveis extracelulares dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina. Dentre elas destacam-se as famílias ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5) e ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT, EC 3.1.3.5) por representarem as principais enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos que participam da sinalização purinérgica (ZIMMERMANN, ZEBISCH, STRÄTER, 2012). E-NTPDases é o termo genérico para designar uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados como o ATP e o ADP, respectivamente (PAPANIKOLAOU et al. 2005). O produto da hidrólise do ADP, o AMP, é subsequentemente convertido à adenosina pela E-5'-NT, com a liberação de fosfato

inorgânico (Pi) (ROBSON, SEVIGNY, ZIMMERMANN, 2006). Estas enzimas possuem características como a dependência de cátions divalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) para a catálise e de forma geral são insensíveis à inibidores específicos de ATPases do tipo P-, F- e V- (ZIGANSHIN et al. 1994).

Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza e já foram estudadas em bactérias (IVANENKOV, MURPHY-PIEDMONTE, KIRLEY 2003), protozoários (MEYER-FERNANDES et al. 1997; BERRÊDO-PINHO et al. 2001), platelmintos (TORRES et al. 1998, DEMARCO et al. 2003; FARIA-PINTO et al. 2004), fungos (BERNINSONE et al. 1994; GAO et al. 1999; JUNIOR et al. 2005), plantas (HANDA, GUIDOTTI, 1996), insetos (SARKIS et al. 1986), peixes (SARKIS, SALTO, 1991; MARTÍ et al. 1997; SCHETINGER et al. 2001; RICO et al. 2003; SENGER et al. 2004), aves (STROBEL et al. 1996; KNOWLES, NAGY, 1999; SCHETINGER et al. 2001) e em vários tecidos e células de mamíferos como, por exemplo, em córtex cerebral (BATTASTINI et al. 1991), linfócitos (LEAL et al. 2005), células endoteliais (KACZMAREK et al. 1996) e plaquetas (PILLA et al. 1996).

São encontrados na literatura estudos que apresentam a quantificação da atividade da enzima E-NTPDase e E-5'-NT em macrófagos peritoneais estimulados com LPS ou IL-4 e se diferenciaram nos fenótipos M1 e M2. Foi observado que há um aumento da expressão da NTPDase1 nos macrófagos que adquirem o fenótipo M2, associado com a imunossupressão, e também um aumento na hidrólise de ATP, ADP e, conseqüentemente, um aumento na formação de adenosina (ZANIN et al. 2012, 2013). No entanto, não há disponível na literatura estudos que apresentem a caracterização detalhada da atividade desta enzima nessas células. Considerando esta necessidade, a caracterização da hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP e ADP pela enzima E-NTPDase em macrófagos peritoneais proporcionará a investigação apropriada da atividade desta enzima em doenças nas quais estas células possuam uma participação importante.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterização da atividade da enzima ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Objetivos específicos

- Investigar a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais no período de 24 horas;
- Padronizar as condições ótimas de tempo e concentração de proteína para a hidrólise dos substratos ATP e ADP;
- Determinar as propriedades bioquímicas da enzima, tais como a temperatura ótima, o pH ótimo, e a influência de cátions divalentes sobre a atividade enzimática;
- Determinar as constantes cinéticas como a constante de Michaelis e Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) para os respectivos substratos;
- Investigar a associação de outras atividades enzimáticas utilizando inibidores clássicos de ATPases e fosfatases;
- Analisar a especificidade da enzima para os seus substratos através da análise da atividade enzimática relativa para outros nucleotídeos tri e difosfatados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O sistema purinérgico é composto por receptores purinérgicos, por enzimas como a E-NTPDase e a E-5'-NT, e moléculas sinalizadoras extracelulares representadas pelos nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e o seu nucleosídeo derivado, a adenosina (Figura 1) (YEGUTKIN, 2008).

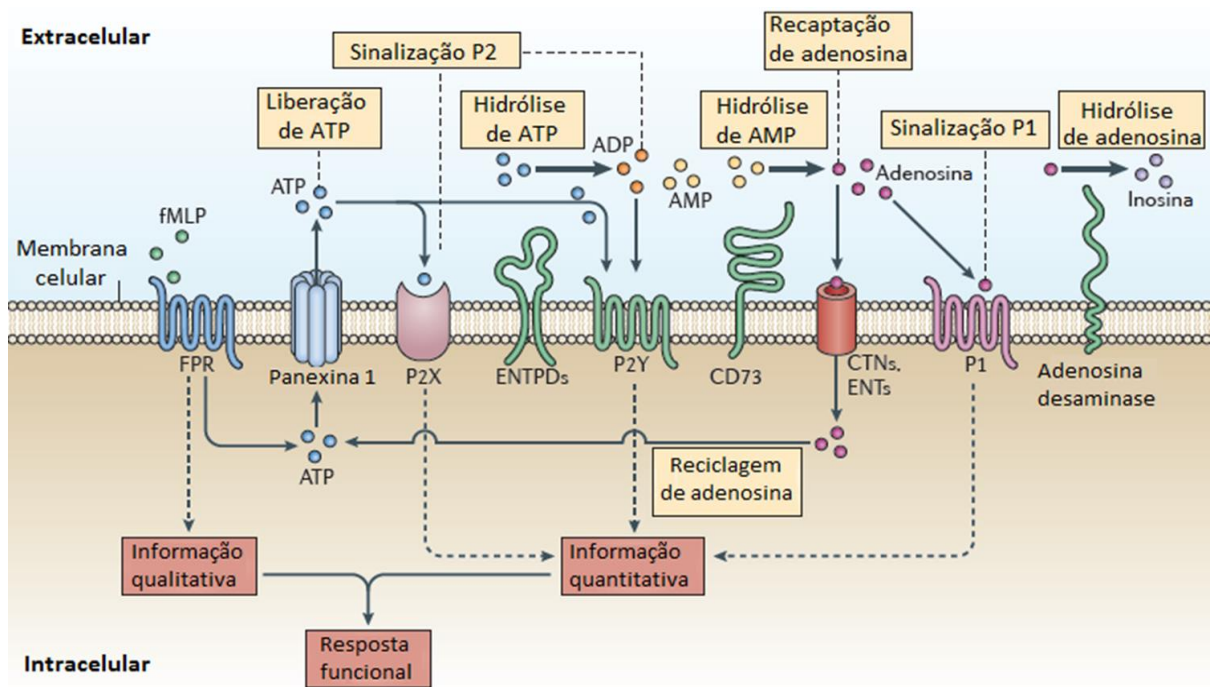


Figura 1 – Componentes da sinalização purinérgica. A ativação e estimulação do receptor formil-peptídeo (FPRs) pelo receptor N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) leva a abertura de hemicanais panexina 1 e a liberação de ATP que promove a ativação autócrina de receptores P2. As ectonucleotidasas ENTPDs e CD73 promovem a hidrólise de ATP e a formação de adenosina que ativa os receptores P1. A adenosina pode ser convertida à inosina pela enzima adenosina desaminase ou pode ser recaptada através de transportadores de nucleosídeos (ENTs). Fonte: Junger (2011).

3.1 Nucleotídeos extracelulares

Os nucleotídeos e os nucleosídeos são encontrados em todos os sistemas orgânicos animais, onde são capazes de produzir efeitos tanto por mecanismos intracelulares, quanto extracelulares. O ATP intracelular é primordialmente utilizado como molécula energética, em processos como o transporte ativo, a motilidade celular e a biossíntese, enquanto o ATP extracelular é considerado uma importante molécula sinalizadora (YEGUTKIN, 2008).

O conceito de neurotransmissão purinérgica foi proposto por Geoffrey Burnstock há mais de quatro décadas (BURNSTOCK, 1972) e, desde então, nucleotídeos púricos (e.g.,

ATP, ADP e AMP) e pirimídicos (e.g., UTP e UDP) são considerados moléculas sinalizadoras importantes (Figura 2). Estas moléculas modulam várias funções teciduais, incluindo a neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC), a contração não colinérgica e não adrenérgica em músculo liso e interações neurônio-glia (RALEVIC, BURNSTOCK, 1998), efeitos ionotrópicos, cronotrópicos e arritmogênicos no miocárdio (VASSORT, 2001), funções gastrointestinais e hepáticas (ROMAN, FITZ, 1999), regulação da resposta inflamatória em células epiteliais (SCHWIEBERT, ZSEMBERY, 2003), regulação do fluxo sanguíneo (GONZALEZ-ALONSO, OLSEN, SALTIN, 2002), resposta imune e inflamação (BOURS et al. 2006), agregação plaquetária em sítios de injúria vascular (GACHET, 2006; MARCUS et al. 2003), regulação do sono, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2006).

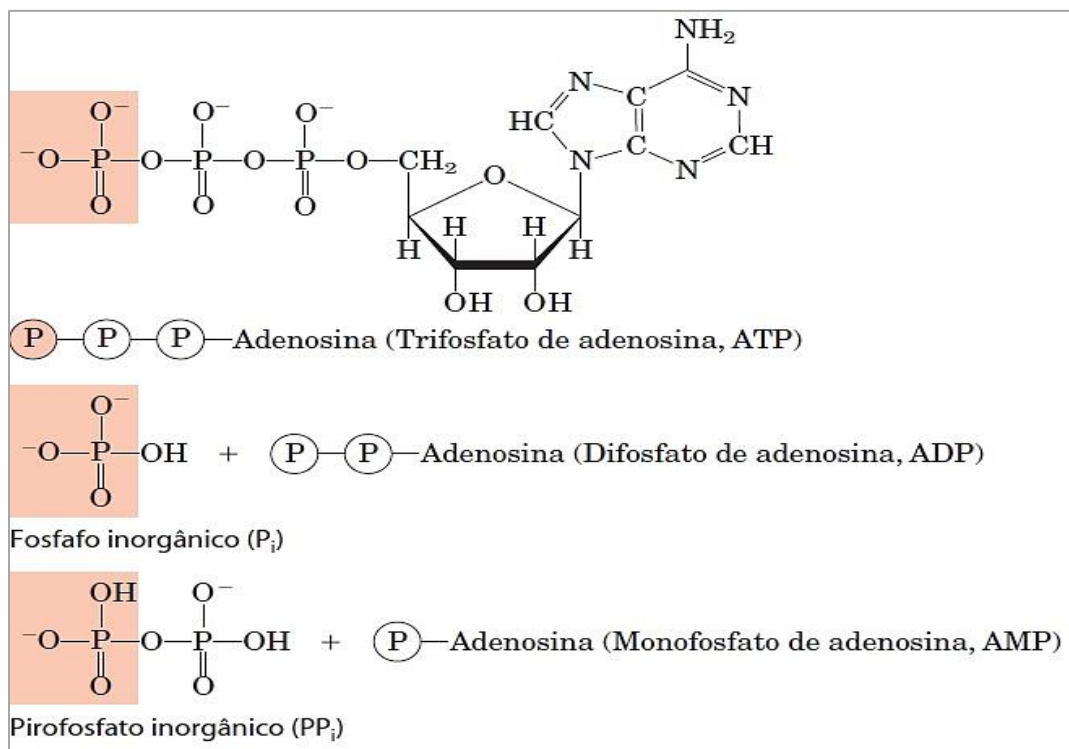


Figura 2 – Estrutura dos nucleotídeos purínicos ATP, ADP e AMP. Fonte: Nelson e Cox (2014).

A sinalização purinérgica apresenta papéis importantes na proliferação celular (BURNSTOCK, 2006), na indução de apoptose e na atividade anticâncer (BOURS et al. 2006; WHITE, BURNSTOCK, 2006), na formação da placa aterosclerótica (DI VIRGILIO, SOLONI, 2002), na cicatrização, na formação e reabsorção óssea (HOEBERTZ, ARNETT, BURNSTOCK, 2003) e nas alterações vasculares que ocorrem no diabetes (SOLINI et al. 2004).

3.1.1 ATP

A adenosina 5'-trifosfato (ATP) é um nucleotídeo existente em todas as células e é considerada a principal molécula energética no metabolismo intracelular. No entanto, é especialmente no meio extracelular que o ATP está envolvido na regulação de vários processos fisiológicos e patológicos (BOURS et al. 2006).

A concentração de ATP intracelular é muito alta, na faixa de 3 a 10 mM, enquanto que a concentração de ATP extracelular é muito baixa, entre 400 a 700 nM (BOURS et al. 2006). Considerado um neurotransmissor, o ATP é estocado em vesículas intracelulares e, após um estímulo neuronal, ele é liberado pelas terminações nervosas na fenda sináptica, onde irá se ligar a receptores específicos do tipo P2 (KUKULSKI, KOMOSZYŃSKI, 2003).

O ATP extracelular tem papel fundamental na inflamação, agindo como um “sinal de perigo” ou como um padrão molecular associado a dano celular (DAMPs), liberado em resposta a lesões, infecções ou outros estímulos inflamatórios (SEONG, MATZINGER, 2004, BOURS et al. 2006). Além disso, o ATP participa na regulação de outros processos biológicos como a função cardíaca e a contração muscular (JAMES, BUTT, 1999; TORRES et al. 2002; ZIMMERMANN, 1999). Estudos também mostram que o ATP exerce um papel pró-inflamatório através da ativação de receptores P2X7, induzindo a produção de citocinas como interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (BOURS et al. 2006; SOLLE et al. 2001) (Figura 3).

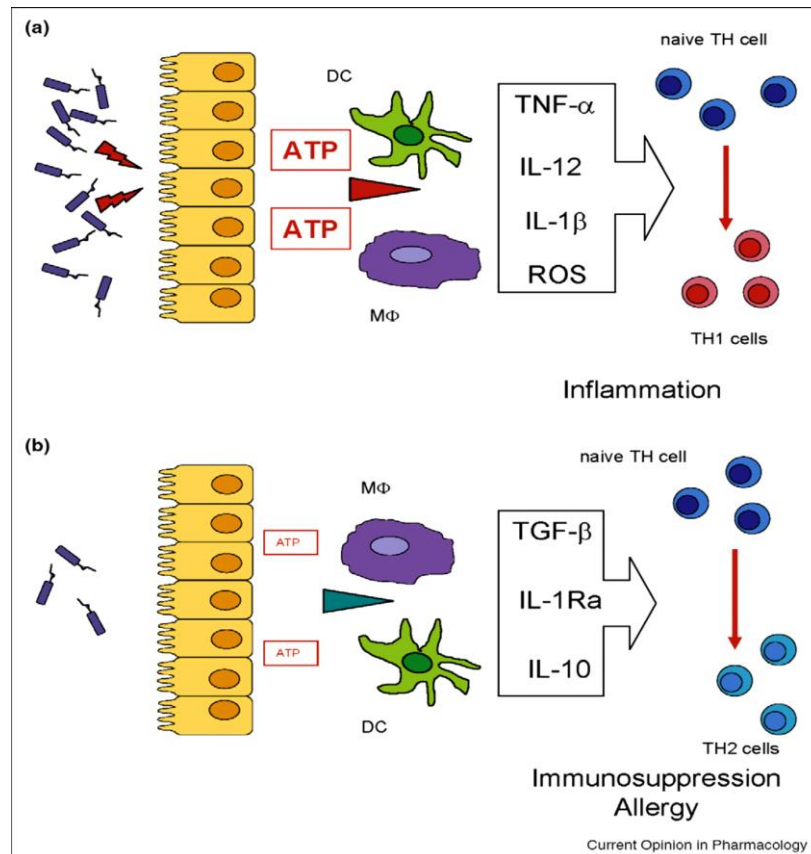


Figura 3 - Funções do ATP extracelular em baixas e altas concentrações na modulação da resposta imune.

a) As células teciduais liberam grandes quantidades de ATP em resposta ao aumento no número de patógenos, o que estimula a diferenciação das células dendríticas (DC) e de macrófagos que é acompanhado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina 12 (IL-12), a interleucina-1 beta (IL-1 β), e espécies reativas de oxigênio (ROS), e também a diferenciação de linfócitos T helper (Th) naïve, ou não diferenciados, em linfócitos Th 1 e, conseqüentemente a iniciação da inflamação. b) Em resposta a diminuição de patógenos as células teciduais liberam pouco ATP, o que provoca a modulação negativa das citocinas pró-inflamatórias, liberação preferencial de citocinas imunossupressoras como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), o receptor antagonista da IL-1 (IL-1Ra), e a interleucina-10 (IL-10), e também a diferenciação de células Th naïve em linfócitos Th 2 e um estado de imunossupressão. Fonte: Di Virgílio (2009).

3.1.2 ADP

A adenosina 5'-difosfato é o primeiro produto gerado na hidrólise do ATP. Dentre outras funções, este nucleotídeo é conhecido por induzir mudanças no formato das plaquetas, o que acelera o processo de agregação destas células. Em situações de injúria vascular, o ADP é liberado do interior de grânulos existentes nas plaquetas, sendo considerado o agonista mais importante do recrutamento plaquetário e indutor da formação de trombos no interior de

vasos (LUNKES et al. 2003; MARCUS et al. 2003).

3.1.3 AMP e adenosina

A adenosina 5'-monofosfato (AMP) é um intermediário na hidrólise do ATP (BARSOTTI, IPATA, 2004) que exerce a função de sinalizador intracelular, especialmente como um sinal para a ativação de vias catabólicas (NELSON, COX 2014). O aumento das concentrações de AMP intracelulares além de regular a atividade de inúmeras enzimas de forma alostérica, também ativa quinases dependentes de AMP, envolvidas na mediação do consumo de combustível celular em situações de grande necessidade de ATP e no controle do apetite e na sua capacidade de estimular (KEMP et al. 1999; STEIN et al. 2000). Alguns hormônios tais como o glucagon e a adrenalina têm como segundo mensageiro a molécula de nucleotídeo de adenina na forma cíclica, o AMP cíclico (AMPc) (NELSON, COX 2014). O AMPc é o principal ativador de proteínas quinases, e inibidor das fosfoproteínas fosfatases (DANIEL, WALKER, HABENER, 1998; CHIN et al. 2002).

O AMPc, atua como um segundo mensageiro em vias de transdução de sinal e, dentre outras funções, está envolvido na ativação da proteína quinase A (PKA) (CUNHA, 2001; LATINI, PEDATA, 2001). O AMP produzido pela atividade das enzimas NTPDases, é posteriormente, hidrolisado a adenosina pela enzima E-5'-NT (ROBSON, SEVIGNY, ZIMMERMANN, 2006).

Durante muitos anos o AMP não possuía um receptor alvo conhecido, mas em 2012 foi demonstrado que ele atua como agonista do receptor A1 e alguns dos seus efeitos fisiológicos podem ser desencadeados de forma indireta via formação de adenosina, que ocorre através da hidrólise dos nucleotídeos catalisada pelas ectonucleotidases (RITTNER et al. 2012).

A adenosina é um nucleosídeo púrico endógeno, produzido principalmente pela hidrólise do ATP (BARSOTTI, IPATA, 2004) e liberado por vários tecidos e órgãos além de ser considerada molécula sinalizadora de dano celular, exercendo em geral ações contrárias as do ATP extracelular (FRANTZ et al. 2005; BOURS et al. 2006). Além de ser considerado um poderoso agente anticonvulsivante (GUIDOTTI, WANG, 1998), no SNC a adenosina suprime o metabolismo celular em condições adversas como isquemia, hipóxia e hipoglicemia. A adenosina também possui um papel importante na inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP (LUNKES et al. 2003).

3.2 Receptores purinérgicos

Os receptores purinérgicos, responsáveis pela transdução do sinal representado pelos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, são divididos em duas famílias: P1 e P2. Os receptores P2 são subdivididos em P2X e P2Y (BURNSTOCK, KENNEDY, 1985; BURNSTOCK, FOUNTAIN, 2012).

A Figura 4 ilustra as estruturas dos receptores P2X, P2Y e P1. O receptor P2X possui sete isoformas, as quais se ligam ao ATP e são todos receptores ionotrópicos, ou seja, canais iônicos. Os receptores P2Y e P1 também possuem diversas isoformas e ambos são receptores acoplados à proteína G.

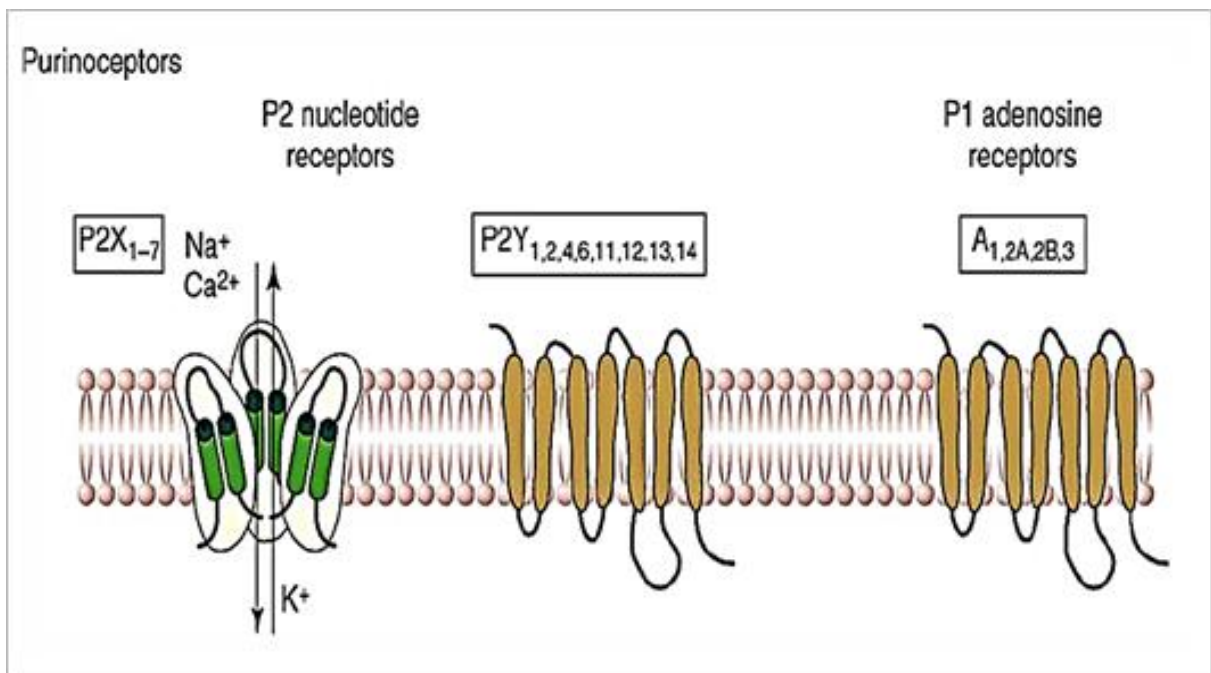


Figura 4 - Estrutura dos receptores P1, P2X e P2Y. Fonte: Adaptado de Abbracchio et al. (2006).

3.3 Ectonucleotidases

As ectonucleotidases são enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e localizam-se ancoradas na membrana celular, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Elas também podem estar presentes de forma solúvel no meio intersticial ou intracelular (ZIMMERMANN, 2001).

Diversas enzimas fazem parte do grupo das ectonucleotidases e são divididas na família das ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), das ectonucleosídeo pirofosfatases/fosfodiesterases (E-NPPs), das ecto-5'-nucleotidases (E-5'-NTs) ou das fosfatases alcalinas (APs) (Figura 5) (ZIMMERMANN, 2001).

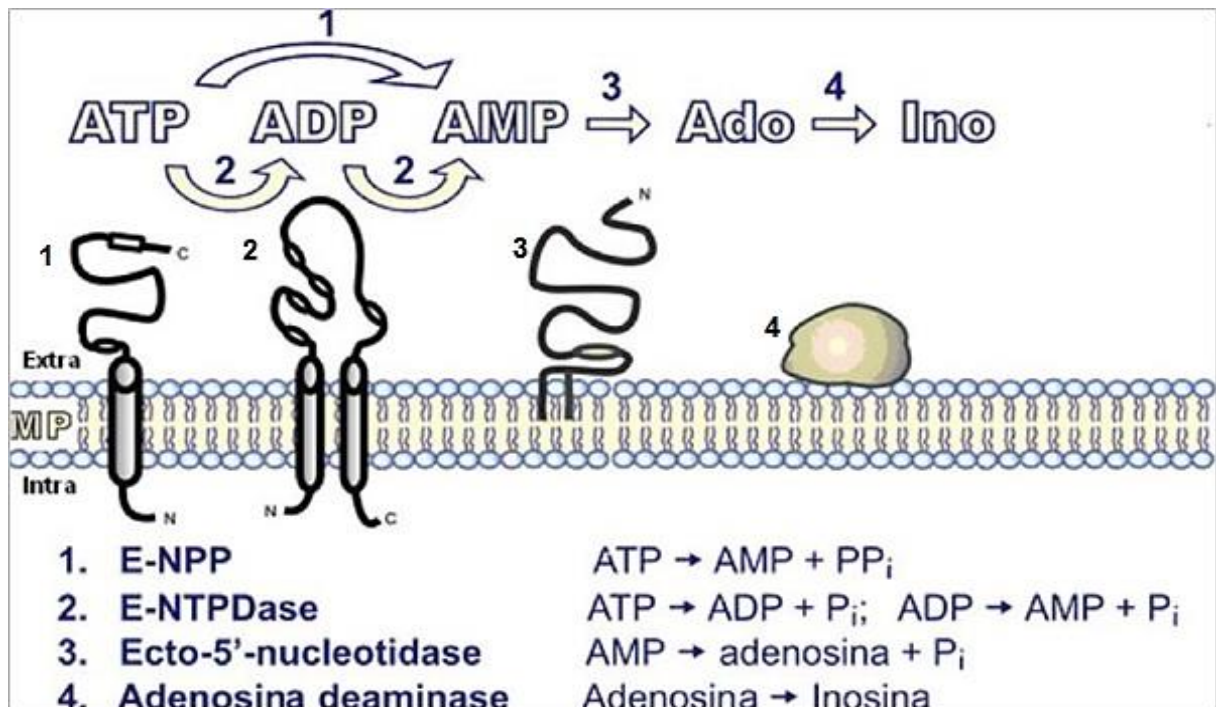


Figura 5 – Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina. Fonte: Adaptado de Yegutkin (2008).

3.3.1 Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase)

A família das E-NTPDases (ATP difosfohidrolase, apirase) hidrolisam os nucleotídeos difosfatos e trifosfatos que são convertidos em sua forma monofosfatada. Estas enzimas possuem características como a dependência de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) para a catálise e são insensíveis à inibidores específicos de ATPases do tipo P-, F- e V. Possuem cinco regiões altamente conservadas entre as espécies denominadas ACRs (do inglês, *apyrase conserved regions*) que são regiões importantes para que ocorra a atividade catalítica destas enzimas. (HANDA, GUIDOTTI, 1996; ZIMMERMANN, 2000; ZIGANSHIN, HOYLE, BURNSTOCK, 1994).

Oito genes diferentes codificam os membros desta família de enzimas (Figura 6). Sabe-se que quatro isoformas são expressas na superfície celular (NTPDase1, 2, 3, e 8) (ROBSON, SEVIGNY, ZIMMERMANN, 2006). Como a maior parte dessas enzimas são

encontradas ligadas à membrana celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular, elas são denominadas ecto-NTPDases. No entanto, nem todos os representantes dessa família de enzimas são ectoenzimas. Algumas são intracelulares encontradas no lúmen de organelas como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático. Estudos demonstram que as enzimas desta família podem hidrolisar tanto o ATP quanto o ADP (SEVIGNY et al. 1997; ZIMMERMANN, 1996).

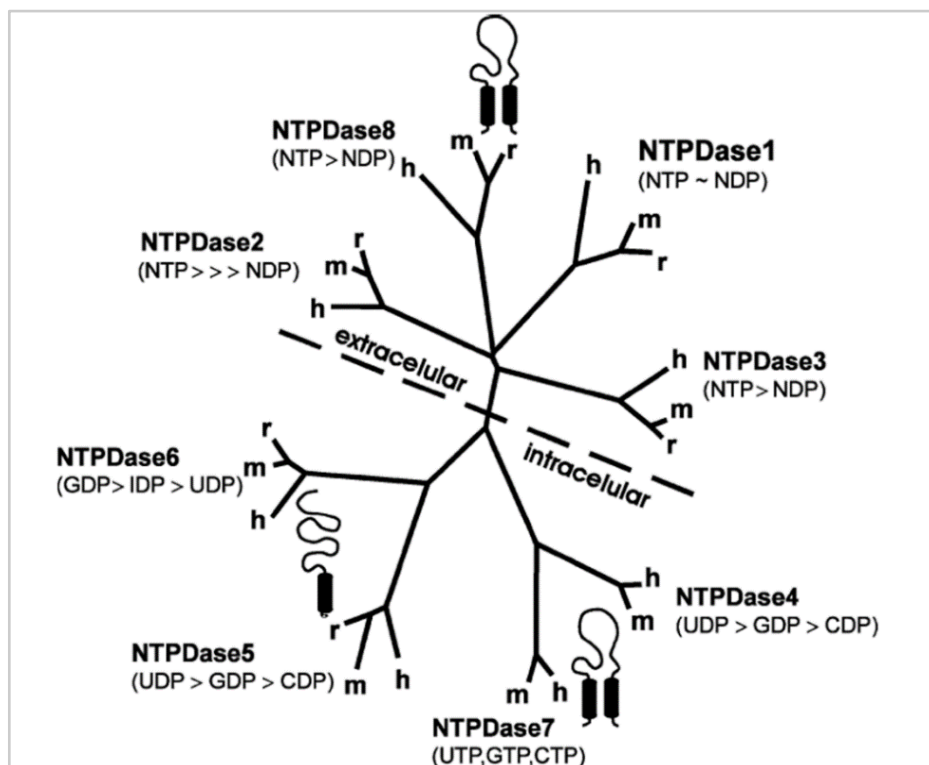


Figura 6 – Árvore filogenética hipotética para os membros da família das NTPDases (NTPDase1 a NTPDase8) de ratos (r), seres humanos (h) e camundongos (m), após o alinhamento da sequência de aminoácidos. Fonte: Robson, Sevigny e Zimmermann (2006).

A família NTPDase1 foi identificada como o antígeno de superfície CD39 sendo que o aumento de sua expressão está relacionado com a ativação dos receptores P2 e concomitantemente há um aumento nas atividades ATPásicas e ADPásicas (KACSMARECK et al. 1996; KUKULSKI, LÉVESQUE, SÉVIGNY, 2011; KUMALISZEWSKI et al. 1994). Estudos revelaram a expressão abundante de CD39 no endotélio vascular (ENJYOJI et al. 1999; MARCUS et al. 2003; ROBSON et al. 2005), em células dendríticas (MIZUMOTO et al. 2002), linfócitos, plaquetas (COPPOLA et al. 2005; DEAGLIO et al. 2007) monócitos e macrófagos (HYMAN et al. 2009; LÉVESQUE et al. 2010; MARTÍN-SATUÉ et al. 2009).

Estudos demonstram que a expressão da E-NTPDase em células T reguladoras (Treg) de ratos pode aumentar a sua atividade supressora através de duplo mecanismo.

Primeiro, através da diminuição da concentração do ATP extracelular, que geralmente exerce um efeito pró-inflamatório (BORSELLINO et al. 2007). Segundo, pois a atividade desta enzima promove, em conjunto com a atividade da enzima E-5'-NT, a formação de adenosina, associada à imunossupressão via ativação subsequente de receptores A2 (DEAGLIO et al. 2007).

Estudos realizados com camundongos deficientes da enzima NTPDase1, confirmaram que esta ectoenzima têm papel importante no controle da hemostasia, na reatividade de plaquetas, nas reações trombóticas e no crescimento vascular *in vivo* (ENJYOJI et al. 1999). Também foi demonstrado o seu potencial terapêutico em doenças vasculares e durante o transplante (ENJYOJI et al. 1999; ROBSON et al. 2005). Além disso, os estudos em camundongos demonstraram que a família E-NTPDase tem um importante papel na prevenção de inflamações exacerbadas na pele, desencadeadas por produtos químicos irritantes (MIZUMOTO et al. 2002).

As NTPDases 1 e 2 são localizadas na superfície celular ligadas à membrana (ROBSON, SEVIGNY, ZIMMERMANN, 2006), conforme ilustrado na Figura 7. A NTPDase2 é expressa principalmente na superfície adventícia de vasos sanguíneos onde contribui para a homeostasia vascular, pois promove a agregação de plaquetas na presença de ATP e facilita ainda mais a agregação na presença de ADP (SEVIGNY et al. 2002). Recentes estudos imuno-histoquímicos realizados em ratos revelaram que a NTPDase2, juntamente com a fosfatase alcalina, desempenha um papel importante no controle purinérgico embrionário, pós-natal e na neurogênese adulta (LANGER et al. 2007).

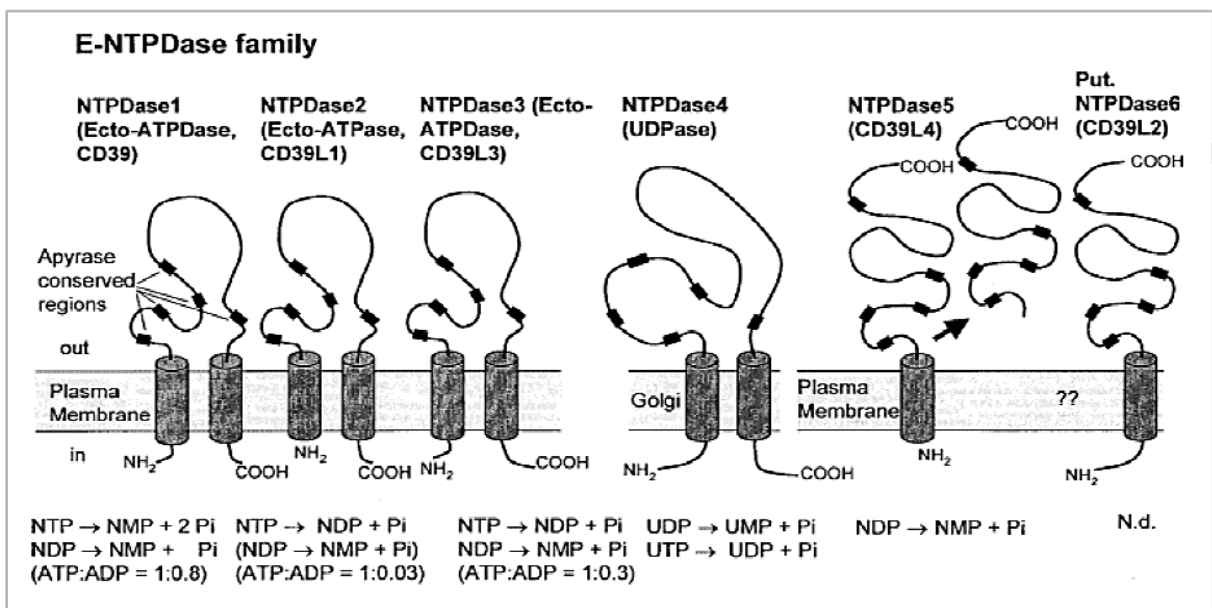


Figura 7 - Membros da família das NTPDases, suas localizações na membrana e propriedades catalíticas. Nucleotídeo trifosfato (NTP), Nucleotídeo difosfato (NDP), Nucleotídeo monofosfato (NMP) e Nucleotídeos desconhecido (N.d). Fonte: Zimmermann et al. (2000).

A expressão de NTPDase3 ocorre principalmente em estruturas neuronais, onde pode atuar na pré-sinapse como um regulador dos níveis de ATP extracelular, e coordena vários sistemas homeostáticos, incluindo a alimentação, comportamentos de sono e vigília (BELCHER et al. 2006). As NTPDases 5 e 6 podem ser secretadas para o meio extracelular (YEGUTKIN, 2008). A NTPDase5 quando expressa em células COS-7, é secretada e possui preferência nucleosídeos 5'-difosfatados (MULERO, et. al. 1999), enquanto que as NTPDases 4 e 7 estão localizadas no meio intracelular, voltadas para o lúmen de organelas citoplasmáticas (ZIMMERMANN, 2000).

A NTPDase 8 está associada à membrana plasmática de células de mamíferos, e apresenta expressão abundante no jejuno e no rim (BIGONNESSE et al. 2004). A expressão abundante de NTPDase8 em canalículos biliares e grandes vasos sanguíneos do fígado sugere o envolvimento desta ecto-nucleotidase na regulação da secreção biliar (FAUSTHER et al. 2007).

3.3.2 Ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT)

A ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT, EC 3.1.3.5) representa uma das principais enzimas envolvidas na hidrólise dos nucleotídeos que participam da sinalização purinérgica. Esta ectoenzima é conhecida também como CD73, que é um marcador de superfície celular expresso em linfócitos T e B (CHRISTENSEN, 1997; ZIMMERMANN et al. 2012). A E-5'-NT é responsável pela hidrólise do AMP e a formação do nucleosídeo adenosina concomitante com a liberação de fosfato inorgânico (Pi) (ROBSON, SEVIGNY, ZIMMERMANN, 2006). Esta ectoenzima é co-expressa com a E-NTPDase na superfície de células Treg, sendo consideradas componentes importantes na autoimunidade e também nos mecanismos de supressão da resposta imune, através da conversão dos nucleotídeos ATP e ADP em AMP e na subsequente produção de adenosina, que atua como um mediador anti-inflamatório inibindo a proliferação de células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (DEAGLIO et al. 2007).

A família E-5'-NT possui sete membros, sendo que seis são citosólicos, ancorados à membrana plasmática por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) localizada no carbono C terminal (AIRAS et al. 1997; YEGUTKIN, 2008) conforme mostra a Figura 8. Esta ectoenzima se liga a íons Zn^{2+} e outros cátions divalentes, que são necessários para a sua atividade enzimática. Possui uma ampla especificidade por nucleosídeos monofosfatos com um K_m na faixa de 3 a 50 mM (ZIMMERMANN, 1992). São encontradas em diferentes

tecidos com expressão abundante no cólon, rim, cérebro, fígado, coração e pulmão (MORIWAKI, YAMAMOTO, HIGASHINO, 1999; THOMPSON et al. 2004; ZIMMERMANN, 1992, 2001).

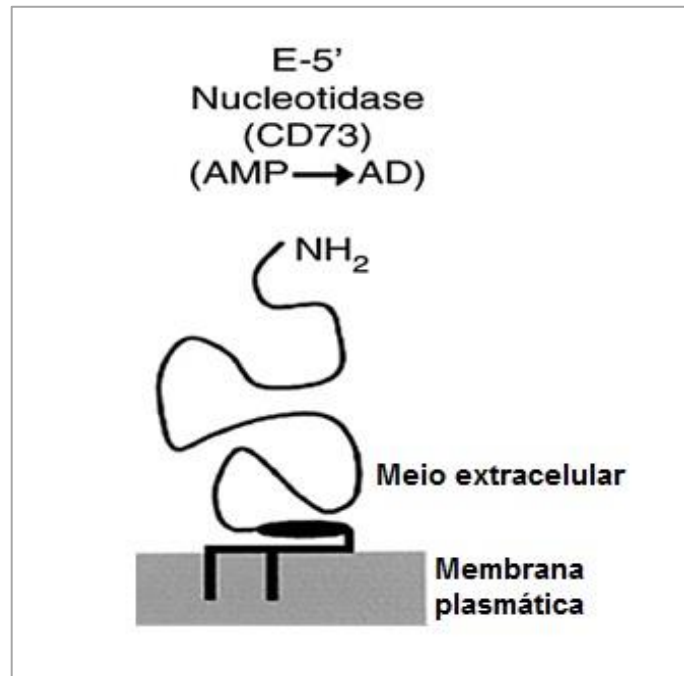


Figura 8 – Representação da enzima ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana plasmática. Fonte: Adaptado de Zimmermann (2000).

3.3.3 Fosfatase alcalina

A enzima fosfatase alcalina (APs; EC 3.1.3.1), é uma fosfomonohidrolase ubíqua, presente em quase todos os tecidos. No homem esta enzima possui três isoformas que estão distribuídas em todos os tecidos: a do intestino, a da placenta denominada de tecido-específica, e a isoforma do fígado-osso-rim que é encontrada em quase todos os tecidos, sendo denominada de fosfatase alcalina tecido não específica (TNAP) (WUTHIER, REGISTER, 1985; NAKAMURA T, NAKAMURA K, STINSON, 1988; HSU, ANDERSON 1995). Um papel importante da (TNAP) é a capacidade de hidrolisar o PPi no tecido ósseo, que promove a calcificação através deste potente inibidor de mineralização (HESSLE et al. 2002; JOHNSON et al. 2000).

A família das APs é formada por enzimas homodiméricas e cada sítio catalítico contém três íons metálicos, dois íons de Zn^{2+} e um íon de Mg^{2+} . Estes íons são necessários para a sua atividade enzimática (MILLÁN, 2006) pois estimulam a degradação dos nucleotídeos de adenina (FIELDS, BURNSTOCK, 2006). Esta enzima é semelhante a E-5'-

NT, pois é ancorada à membrana plasmática (ZIMMERMANN, 2001) de mamíferos e podem exibir uma ampla especificidade por diferentes substratos fosfomonoésteres e outros compostos, incluindo os nucleotídeos de adenina, pirofosfato, fosfatidatos com várias cadeias de ácidos graxos, polifosfatos inorgânicos, glicose-fosfato, β -glicerolfosfato e bis-p-nitrofenil-fosfato (SAY et al. 1991).

A evidência mais clara, é que a AP tem grande influência para os organismos in vivo, que está associada no processo da cartilagem mal mineralizada (raquitismo), nos ossos (osteomalacia) e também em fraturas ósseas espontâneas (MILLÁN, 2006).

3.3.4 Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs)

A família E-NPP é composta por sete ectoenzimas (NPP1 a NPP7) que são expressas em vertebrados, numeradas de acordo com a sua ordem de descoberta, e são capazes de hidrolisar nucleotídeos (STEFAN, JANSEN, BOLLEN, 2006). No entanto, devido à sua ampla especificidade por substratos, algumas NPPs podem desfosforilar o ATP a ADP e Pi, ADP a AMP e Pi, ou NAD^+ a AMP (Figura 9) (ZIMMERMANN, ZEBISCH, STRÄTER, 2012).

Somente três membros desta família (NPP1 a NPP3) são capazes de hidrolisar nucleotídeos difosfatos, nucleotídeos trifosfatos, ácidos nucleicos, açúcares de nucleotídeos, assim como nos ésteres de fosfato de colina e fosfolipídios. As famílias NPP2, NPP6 e NPP7 hidrolisam fosfolipídios e fosfodiésteres de colina. (STEFAN, JANSEN, BOLLEN, 2006).

A família NPP1 é expressa no tecido adiposo, bexiga, coração, rim, fígado, pulmão, timo. Esta enzima desempenha um papel importante na mineralização óssea e na regulação dos níveis de pirofosfato inorgânico. (GODING, GROBBEN, SLEGGERS, 2003; HARMEY et al. 2004). Nos leucócitos, a NPP1 está presente em macrófagos alveolares e em linfócitos B e T (GODING, GROBBEN, SLEGGERS, 2003; TAKAHASHI, OLD, BOYSE, 1970). As famílias NPP1 a NPP3 tem uma ampla distribuição, e podem ser encontradas em roedores e humanos (STEFAN, JANSEN, BOLLEN, 2006). A NPP3 está presente na parte superior das células das vias respiratórias, hepatócitos e basófilos de humanos (BUHRING et al. 2001). A NPP4 é uma potente hidrolase do substrato diadenosina trifosfato (Ap_3A), gerando os produtos ADP e AMP. O aumento da atividade desta enzima em sítios de lesão no endotélio vascular causa um aumento dos níveis locais de ADP, que possui conhecido efeito pró-coagulante, levando à formação de trombos e desencadeando uma resposta que mantém a

hemostasia na agregação plaquetária (Albright et al. 2012).

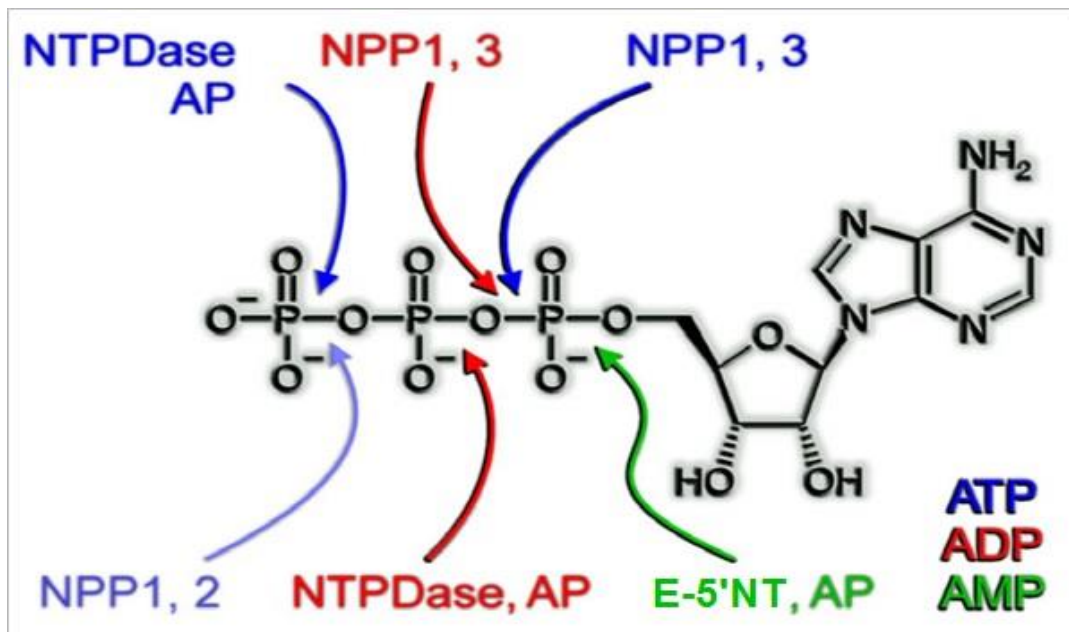


Figura 9 – Sítios de hidrólise catalisada pelas enzimas, NTPDase, E-5'NT, AP e NPP1, NPP2, NPP3. As enzimas mostradas em azul, vermelho e verde reconhecem, respectivamente, ATP, ADP e AMP como substratos. A remoção do fosfato a partir de ATP pela NPP1 e NPP2 (azul claro). Em verde a remoção do fosfato a partir do AMP pela E-5'NT e AP. Fonte: Adaptado de Strater, Zebisch, Zimmermann, (2012).

3.4 Funções da E-NTPDase em macrófagos

Os macrófagos desempenham um papel importante na iniciação e na regulação da resposta imune inata e adaptativa, pois apresentam receptores de superfície que reconhecem diversos tipos de antígenos. Quando os macrófagos entram nos tecidos inflamados ocorre a produção de fenótipos distintos durante a resposta inflamatória (BOURS, et al. 2006).

Dependendo do perfil do estímulo os macrófagos podem ser ativados e diferenciados através das vias clássica ou alternativa. Os macrófagos que são ativados pela via clássica (M1) recebem estímulos de citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF- α , receptores do tipo Toll (TLR) e lipopolissacarídeos (LPS) no tecido lesado. Já os macrófagos que são ativados pela via alternativa (M2) recebem estímulos pela IL-4 e IL-13, estão basicamente envolvidos no reparo tecidual, estimulando fibroblastos, promovendo deposição de matriz extracelular e a liberação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória que exerce atividade reguladora. (MOSSER, EDWARDS, 2008; FUJIWARA, KOBAYASHI, 2005).

No trabalho de Zanin em 2012 e 2013, foram observados que os macrófagos estimulados por LPS ou pela IL4, podem ativar os macrófagos através da via clássica M1 ou pela via alternativa M2. Os resultados mostraram que os macrófagos M1 não apresentaram

aumento na atividade ATPásica e ADPásica que conseqüentemente diminui a expressão da NTPDase1. Os macrófagos M2 obtiveram aumento na atividade ATPásica e ADPásica e também na expressão da NTPDase1, isto indica que nos macrófagos M2 são conduzidas pela via nucleotídica para gerar adenosina.

Estas células também podem reagir diretamente ao dano tecidual através do reconhecimento de “sinais de perigo” (DI VIRGILIO, 1995; GALLUCCI, MATZINGER, 2001), assim como aos nucleotídeos extracelulares, pois além de induzirem as células apresentadoras de antígenos (APCs) como por exemplo os macrófagos na inflamação, que provocam a liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 e IL-6 e expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) através da geração de superóxido, que favorece a morte dos patógenos (KUSNER, BARTON, 2001; AGA et al. 2002; la SALA et al. 2003) (Figura 10).

Para que as moléculas constitutivas atuem como sinal de perigo elas devem ser reconhecidas pelas APCs e os nucleotídeos possuem estes quesitos, pois apresentam altas concentrações nas faixas entre 5 a 10 mM no citoplasma de todas as células, enquanto que no meio extracelular, a sua concentração chega a faixas nanomolares. Portanto o aumento da concentração dos nucleotídeos extracelulares está relacionado com a lesão celular. Pois o ATP, pode ser secretado por diversos tipos de células em situações de estresse ou em locais de agregação plaquetária, que são reconhecidos pelos receptores purinérgicos do tipo P2, que são expressas na membrana celular de diversos tecidos, assim quando este receptor estiver ativado pode ter um profundo impacto sobre as funções das células imunes (FERRARI et al. 1997, MITCHELL et al. 1998, la SALA et al. 2003).

Após a infecção, as células do sistema imune, como os linfócitos, produzem citocinas, que podem direcionar o combate ou facilitar a proliferação do parasita. Quando ocorre a produção de citocinas como a IL-2, a IL-12, o TNF- α e o IFN γ , predomina a resposta imune do tipo Th1, com características pró-inflamatórias. Por outro lado, quando são produzidas as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-10, há uma modulação negativa na liberação de moduladores pró-inflamatórios, produção preferencial de moléculas imunossupressoras e a transformação de células T indiferenciadas em células do tipo Th2, predominando um estado de imunossupressão (DI VIRGILIO et al. 2009).

As células fagocitárias como os macrófagos, os neutrófilos e as células dendríticas são as principais células hospedeiras para a infecção e a proliferação de parasitas do gênero *Leishmania*, cuja doença é a segunda maior causa de mortes por infecções parasitárias no mundo, com uma estimativa de mais de 15 milhões de casos de humanos infectados (BERN, MAGUIRE, ALVAR, 2008; WHO, 2010). Em Mato Grosso do Sul, a leishmaniose é

endêmica e é uma ameaça significativa para a saúde pública (MENEZES et al. 1986; NUNES et al. 1995), onde 42,9 dos casos foram notificados por 100.000 habitantes de 2010 a 2013 para a leishmaniose visceral (LV), e 21,6 casos por 100.000 habitantes para leishmaniose cutânea (LC) no mesmo período (DORVAL et al. 2006; LIMA et al. 2009; NUNES et al. 1995).

As células em condições de injúria podem liberar substâncias que estão confinadas no seu interior, e a sua concentração extracelular aumentada, conseqüentemente poderá ocorrer um sinal de lesão celular, que está associada a alterações na atividade ou expressão das ectoenzimas E-NTPDase que hidrolisam o ATP em ADP até AMP, e a E-5'NT converte o AMP em adenosina (FERRARI et al. 1997, MITCHELL et al. 1998, la SALA et al. 2003). Sendo a liberação de ATP extracelular um dos mecanismos criados para subverter a infecção, que induz a morte da *Leishmania amazonensis* através da ativação do receptor P2X7 (CHAVES et al. 2009).

Vários estudos associaram a expressão da E-NTPDase à virulência de diferentes espécies de *Leishmania*, isto foi observado em pacientes com Leishmaniose visceral que obtiveram níveis elevados de adenosina no soro (BERRÊDO-PINHO et al. 2001; MARQUES-DA-SILVA et al. 2008; SOUZA et al. 2010; VIEIRA et al. 2011; GOMES et al. 2015). Recentemente um estudo observou que a infecção por *Leishmania* está relacionada com o equilíbrio de vários fatores, e que os nucleotídeos podem modular o equilíbrio de respostas pró inflamatórias, com a liberação de LTs e na resposta anti-inflamatória, com a liberação de prostaglandinas (PGs) (CHAVES, CANETTI, COUTINHO-SILVA, 2016).

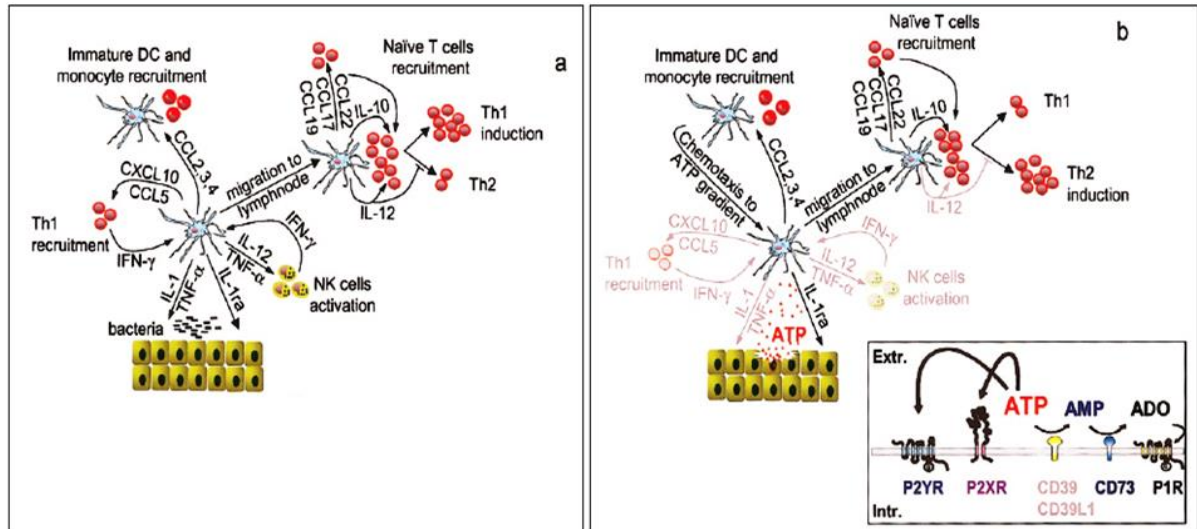


Figura 10 – Comparação entre a maturação das células dendríticas através da via canônica ou clássica e via alternativa na presença do ATP extracelular. a) Os sinais de ativação como por exemplo LPS, que desencadeiam a liberação de CCL2, CCL3, CCL4, CXCL10 e CCL5 recrutando monócitos circulantes e outros DC imaturos. Os DCs maduros liberam TNF- α e IL-12, que promovem a inflamação e a ativação de células natural killer (NK). IFN- γ produzido pela infiltração de linfócitos Th1 e células NK atuam como feedback positivo para a produção de IL-12. As DCs mielóides que maturam neste ambiente migram para os nódulos linfáticos e auxiliam na iniciação de células T do tipo 1. b) O ATP extracelular liberado pelas células danificadas atua como quimiotático para as células DC imaturas que bloqueiam a produção de IL-1, TNF- α e IL-12, CXCL10 e CCL5, mas não bloqueia a liberação de IL-10 na fase de maturação. A produção de IL-12 favorece respostas de Th2. O ATP é hidrolisado para ADP e subseqüente convertido em AMP pela CD39. Por sua vez, o AMP é substrato para a CD73 conduzindo a geração de adenosina (ADO) que se liga a receptores purinérgicos P1 receptores de adenosina (la SALA, 2003).

A atividade da enzima E-NTPDase já foi descrita em diversos estudos de tecidos como coração, placenta, pulmão, fígado, músculo esquelético, timo, rim, pâncreas, testículos, ovários, próstata, cólon e encéfalo. (LECLERC et al. 2000; PLESNER, 1995; VIEIRA et al. 2001). Recentemente, alguns autores publicaram estudos, onde apresentaram a quantificação da atividade desta enzima nos macrófagos peritoneais em diferentes contextos (ZANIN et al. 2012, 2013). Entretanto, esta atividade não foi estudada detalhadamente de forma a auxiliar o seu entendimento na função na resposta imune.

O sistema purinérgico, apresentado anteriormente, é um dos diversos sistemas envolvidos na modulação dos padrões de resposta imune (DI VIRGILIO, BOEYNAEMS, ROBSON, 2009). Desta forma, a investigação da atividade das enzimas E-NTPDase e E-5'-NT em macrófagos pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas frente a diversas funções fisiológicas e imunitárias.

ARTIGO**CHARACTERIZATION OF ECTONUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE
DIPHOSPHOHYDROLASE (E-NTPDase; CD 39; EC 3.6.1.5) ACTIVITY IN
MICE MACROPHAGES**

**Characterization of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase;
EC 3.6.1.5) activity in mice macrophages**

Short title: Characterization of E-NTPDase activity in mice macrophages

Dhébora Albuquerque Dias ^{1,2}, Bruna de Barros Penteado ^{1,2}, Lucas Derbocio Dos Santos ^{1,2},
Pedro Mendes Dos Santos ³, Carla Cardozo Pinto Arruda ^{2,4}, Maria Rosa Chitolina
Schetinger⁵, Daniela Bitencourt Rosa Leal ⁶; Jeandre Augusto dos Santos Jaques ^{1,2*}

1 Instituto de Biociências, Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

2 Faculdade de Farmácia, Alimentos e Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

3 Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

4 Instituto de Biociências, Laboratório de Parasitologia Humana, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

5 Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Enzimologia Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

6 Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*** Corresponding author:**

Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

Phone: +55.67.3345.7958

Email: jeandreaugusto@hotmail.com or jeandre.jaques@ufms.br

Abstract

This study aimed to characterize the activity of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase; EC 3.6.1.5; CD39) in peritoneal macrophages from BALB/c. The enzyme was activated in the presence of both calcium (1.5 mM) and magnesium (1.5 mM) ions. However the activity was higher in the presence of Ca^{2+} . The pH 8.5 and temperature of 37°C represented the optimum conditions for catalysis. The apparent K_m values were 0.51 and 0.66 mM for the hydrolysis of ATP and ADP, respectively. The V_{max} values were 136.4 and 120.8 nmol Pi/ min/ mg of protein for ATPase and ADPase activity, respectively. Nucleotide hydrolysis was inhibited in the presence of sodium azide (20 mM, ATP: $p < 0.05$; ADP: $p < 0.001$), sodium fluoride (20 mM; ATP and ADP: $p < 0,001$), and suramin (0.3 mM; ATP: $p < 0,01$; ADP: $p < 0, 05$), which is an already described profile for NTPDase inhibition. Although all di- and triphosphate nucleotides tested were hydrolyzed, enzyme activity was increased when adenine nucleotides were used as substrates. Finally, we stress the importance that the knowledge of these biochemical properties of E-NTPDase catalysis in mice macrophages is indispensable to determine properly its activity and to understand more deeply the immune response profile in healthy and in sickness.

Keywords: E-NTPDase, CD39, macrophages, characterization, ectonucleotidase, apyrase, purinergic system.

Introduction

Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDase; EC 3.6.1.5) is the generic term to appoint a family of enzymes responsible for the hydrolysis of tri and diphosphate nucleotides such as ATP and ADP, respectively.¹

The members of NTPDase family are codificated by eight different genes. Four members of this enzyme family are surface-located, with an extracellular catalytic site, namely NTPDases 1, 2, 3 and 8 and are usually referred as ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). Other two members, NTPDases 5 and 6 exhibit intracellular location and are secreted after heterologous expression.^{2,3,4} NTPDases 4 and 7 exhibit intracellular location with the active site faced to the lumen of cytoplasmic organelles.^{5,6}

E-NTPDases play an important role in the control of important biological functions such as thromboregulation,^{7,8} maintenance of vascular tone^{9,10} neurogenesis¹¹ neurotransmission¹² and regulation of immune cell function of diverse cell types including neutrophils, dendritic cells, lymphocytes, and of special interest for this study, monocytes and macrophages.^{13,14,15}

These enzymes are widely distributed in nature, have been studied in bacteria¹⁶ protozoa,¹⁷ fishes^{18,19} and many mammal tissues and cells.^{20,21,22} Recently, some studies presented the activity of these enzymes in peritoneal macrophages^{23,24} However, there is no study showing the biochemical characterization of E-NTPDase activity in the surface of these cells.

Considering this need, the aim of this study was to characterize the E-NTPDase activity in peritoneal macrophages of mice and to describe the appropriate assay conditions for further investigation of this enzyme in diseases in which macrophages might have a particular interest.

Materials and methods

Reagents

ATP (A6419), ADP (A2754), GTP (G8877), GDP (G7127), UTP (U6625), UDP (U4125), bovine serum albumin (A2153), trichloroacetic acid (T4885), L-histidine (H8000), HEPES (H7006), oligomycin A (75351), sodium orthovanadate (4502423), P¹P⁵-di(adenosine-5'-)pentaphosphate (Ap5A, D4022), ouabain (O3125), N-ethylmaleimide (NEM, E38776), suramin (S2671), levamisole (31742), tetramisole (T1512) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

Experimental animals

They were used 60 BALB/c mice, 12- weeks old, from the Central Animal Facility of Instituto de Biociências (INBIO) of Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). The Animal Ethics Committee of UFMS (Campo Grande, MS, Brazil) approved the study under the protocol number 587/2014.

Isolation of peritoneal macrophages

In order to obtain the peritoneal macrophages, each mouse was euthanized by cervical dislocation. The abdomen was rinsed with ethyl alcohol 70% and then 5-10 mL of 0.9% saline solution at 0 °C was injected into the peritoneum with a syringe coupled to a 13 x 4,5 mm needle. Following this procedure, the area was massaged and, at the end of 60 seconds, the macrophage-rich solution was drained. The macrophages were kept on ice during the experiments. This procedure was reproduced for each day of the experiment.

Cell viability

Cell viability was determined by trypan blue dye exclusion,²⁵ as previously detailed in.⁸

Enzyme activity

The reaction medium consisted of 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 10 mM glucose and 50 mM Tris/His buffer (pH 8.5) in a final volume of 200 µL. In tubes containing 160 µL of the system it was added 20 µL of the suspended preparation of peritoneal macrophages (4-16 µg) and pre-incubated for 10 minutes at 37 °C. The reaction was initiated

by addition of 20 μL of substrate (ATP or ADP or another as indicated) at a final concentration of 2.0 mM. All reactions were stopped with 200 μL of trichloroacetic acid (TCA) 10% to provide a final concentration of 5%. The concentration of protein (enzyme) and the incubation time was selected in order to ensure the linearity of the reactions. The enzymatic activities were measured by the amount of inorganic phosphate (Pi) released during the reactions. This amount was quantified by the method described by ²⁶ using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. All samples were analyzed in triplicates and the specific activity is expressed as nanomol of released Pi / min / mg of protein.

Protein determination

The protein content of the samples was determined according to the method described by ²⁷ using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Student's T test or Mann Whitney test. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference.

Results

Cellular integrity

A viability curve was performed to determine the cell membrane integrity of peritoneal macrophages kept at 4 - 8 °C²⁵. Results demonstrated that after 12 h, 90% of cells were viable and even after 24 h, the majority of cells (85%) still preserved the cell membrane structure (data not shown).

Conditions for incubation

Quantification of enzyme activity was performed at the temperatures of 15, 25, 37 and 45 °C. The maximal activity was obtained at 37 °C for both ATP and ADP (Figure 1). We investigated the effect of pH 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 and 9.0 on substrate hydrolysis and pH curve revealed that both ATP and ADP hydrolysis were higher at pH 8.5 (Figure 2). The range of protein concentration in which the enzyme activity was linear was of 0.2 to 0.8 µg of protein per reaction. The catalysis of both substrates was linear in the interval of 5 to 80 minutes in the presence of 1.5 mM calcium and 2 mM of ATP or ADP. The intermediate time point of 40 minutes was selected for the assays (data not shown).

Cation dependence

Calcium and magnesium dependence for substrate hydrolysis was tested in the range of 0.1 to 3 mM. The maximum enzyme activity was obtained in a concentration of 1.5 mM of calcium and 1.5 mM of magnesium. However, the activity was higher in the presence of calcium. All the experiments for nucleotide hydrolysis were developed with 1.5 mM of calcium.

Kinetic parameters

ATP and ADP hydrolysis were determined in the range of 30 to 3000 µM in the presence of 1.5 mM calcium. Enzyme activity increased with increasing substrate concentrations up to 2 mM, when enzyme became saturated by substrate. Lineweaver-Burk plot was used to determine the kinetic parameters K_m (Michaelis constant) and V_{max} (maximum velocity). The apparent K_m for ATP and ADP hydrolysis was 0.51 and 0.66 mM, respectively. The calculated V_{max} values were 136.4 and 120.8 nmol of Pi/ min/ mg of protein for ATP and ADP hydrolysis, respectively.

Exclusion of enzymatic associations

The enzymatic association was eliminated employing commonly used ATPases inhibitors in the enzyme reaction containing 1.5 mM of calcium (Table 1). Oligomycin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; inhibitor of mitochondrial ATPases), orthovanadate (0.5 mM; inhibitor of transport ATPases, acid phosphatases and phosphotyrosine phosphatases), Ap5A (0.01 mM; inhibitor of adenylate kinase), ouabain (0.1 and 1 mM; classic inhibitor of Na^+ , K^+ -ATPase), NEM (1 mM; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases; adenylate kinase and sulfhydryl groups modifier), Levamisole (1 mM; inhibitor of alkaline phosphatase), tetramisole (1 mM; inhibitor of alkaline phosphatase) and sodium azide (1.0, 5.0 and 10 mM; inhibitor of mitochondrial ATPases) did not show any inhibitory effect on ATP and ADP hydrolysis. Nucleotide hydrolysis was inhibited in the presence of sodium azide (20 mM, ATP: $p < 0.05$; ADP: $p < 0.001$), sodium fluoride (20 mM; ATP and ADP: $p < 0,001$), and suramin (0.3 mM; ATP: $p < 0, 01$; ADP: $p < 0, 05$).

Substrate specificity

All nucleotides tested were hydrolyzed by mouse peritoneal macrophages (Table 2). Enzyme showed preference for ATP and ADP as triphosphate and diphosphate nucleotides, respectively. The relative activity for GTP and UTP hydrolysis was higher than half of the ATP rate. However, the GDP and UDP hydrolysis were close to 50% of the ADP rate of catalysis.

Discussion

E-NTPDase activity was described in many tissues such as heart, placenta, lung, liver, skeletal muscle, thymus, kidney, pancreas, testis, ovaries, prostate, colon and brain.^{28,29} Recently, studies were published showing the quantification of this enzyme activity in peritoneal macrophages^{23,24} However, this activity has not been studied in detail. In this context, this research characterized the biochemical properties of E-NTPDase expressed in peritoneal macrophages of BALB/c mice.

Macrophages play an important role in the immune response, because they can participate in the destruction of tumors, virus and bacteria (*Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*), process and present antigen to lymphocytes, secrete cytokines that modulate and drive the development and function of lymphocytes, and participate in autoimmune responses. Macrophages are essential effector cells in the elimination of intracellular microorganisms and they are under the control of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12, and anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-10 and TGF- β .^{30,31}

The dependence of calcium and magnesium ions was observed in the hydrolysis of ATP and ADP.^{32,33} In this study, both ions allowed a maximum activity at a concentration of 1.5 mM. However, Ca²⁺-ATP and Ca²⁺-ADP hydrolysis was superior compared to Mg²⁺-ATP and Mg²⁺-ADP as substrates. Other studies have also noted that calcium is the best activator for this ectoenzyme activity such as, for example, in synaptosomes of cerebral cortex (1.5 mM)²⁰ *Trichomonas vaginalis* (1 mM), in human lymphocytes (5 mM), and in zebrafish brain membranes (5 mM).^{20,21,34,35} In this context, we can discard the influence of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP), another ectonucleotidase, which would mimic the ATP-diphosphohydrolytic activity of E-NTPDase because a final concentration of 1.5 mM have inhibitory effect on E-NPP isoforms.³⁶

The influence of temperature on Ca²⁺-ATPase and Ca²⁺-ADPase activities was investigated at 15, 25, 37 and 45 °C. The higher activity was at 37 °C for both Ca²⁺-ATP and Ca²⁺-ADP hydrolysis, which is close to the average body temperature of this strain of mice. Our results are also corroborated by other authors, which found 37 °C as the optimum temperature for NTPDase activity of zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes, human lymphocytes and synaptosomes from cerebral cortex of adult rats.^{20,21,35}

NTPDase family has different optimal pH but are quite active in the pH range of 7.0

to 8.5³² The pH curve showed that its enzymatic activity was maximal at the alkaline pH 8.5. Our study is in agreement with³⁷ which showed a peak in the pH 8.5 for the parasite strain *Leishmania tropica*. Other studies described similar pH values, such as in zebrafish brain membranes (pH 8.0), in human lymphocytes (pH 8.0), in and synaptosomes of cerebral cortex of adult rats (pH 8.0) and in *Trichomonas vaginalis* (pH 8.0).^{20,21,34,35}

As expected, Ca²⁺-ATP and Ca²⁺-ADP were the preferred tri and diphosphate substrates, respectively. The other nucleotides (GTP, UTP, GDP and UDP) were also hydrolyzed when added to the reaction instead of ATP or ADP, which demonstrates a broad substrate specificity for E-NTPDase expressed in the surface of peritoneal macrophages. Corroborating our results, other authors also reported that this enzyme possess specificity for other nucleotides.^{32,21,33}

The apparent values of Km for Ca²⁺-ATP and Ca²⁺-ADP were 510 μ M and 660 μ M, respectively. The maximum speed values (Vmax) for Ca²⁺-ATP and Ca²⁺-ADP were 136.4 and 120.8 nmol of Pi/ min/ mg of protein, respectively. The Km values obtained are in the micromolar range, similar to the values found in synaptosomes of cerebral cortex of adults rats, which were found to be 80 μ M for Ca²⁺-ATP and 45 μ M for Ca²⁺-ADP. In the same study, the Vmax for Ca²⁺-ATP and Ca²⁺-ADP was 150 and 62 nmol of Pi/ min/ mg of protein, respectively.²⁰ The Km values found in our study, in the micromolar range, influence the control of signal transduction, by the efficient hydrolysis of ATP and ADP in a way that terminate the activation of P2X and P2Y receptors, when extracellular levels of nucleotides are increased.^{38,32}

The exclusion of enzymatic associations was performed using inhibitors of ATPases and phosphatases. The inhibitors oligomycin (2 μ g/mL; inhibitor of mitochondrial ATPases), orthovanadate (0.5 mM; inhibitor of transport ATPases, acid phosphatases and phosphotyrosine phosphatases), Ap5A (0.01 mM; inhibitor of adenylate kinase), ouabain (0.1 and 1 mM; classic inhibitor of Na⁺, K⁺-ATPase), NEM (1 mM; Ca²⁺,Mg²⁺-ATPases; adenylate kinase and sulfhydryl groups modifier), levamisole (1 mM; inhibitor of alkaline phosphatase), tetramisole (1 mM; inhibitor of alkaline phosphatase) and sodium azide (1.0, 5.0 and 10 mM; inhibitor of mitochondrial ATPases) did not affect the hydrolysis of ATP and ADP.

The absence of inhibition in both ATP and ADP hydrolysis in the presence of Ap5A, an inhibitor of adenylate kinase (AK), indicates that this enzyme, which consumes ADP, is not an influence to our result. Furthermore, adenylate kinase is more active in the presence of Mg²⁺ ions. So in the presence of Ca²⁺ ions it is excluded the possible enzymatic association of

AK.

Sodium azide inhibited enzyme activity for both substrates only at 20 mM. Converging with our results,²⁰ in a study with synaptosomes obtained from cerebral cortex of adult rats did not observe inhibition in the presence of 1 and 5 mM of sodium azide. However, in their study sodium azide 20 mM inhibited the hydrolysis of both substrates. Another study with the larvae *Pachymerus nucleorum*³⁹ demonstrated that sodium azide at concentrations of 1 mM and 10 mM did not achieve any inhibition in relation to ATP hydrolysis, similar to our results.

Suramin, a non-specific inhibitor of NTPDase, showed inhibitory effect on the hydrolysis of ATP and ADP in the concentration of 0.3 mM, which corroborates with the study conducted by,²¹ with human lymphocytes. Sodium fluoride, an inhibitor of NTPDase activity,²¹ was the main inhibitor of ATP and ADP hydrolysis at 20 mM. The same result was described by²⁰ in synaptosomes of cerebral cortex of adult rats.

Recent studies showed that CD39 is the predominantly expressed ectonucleotidase on the surface of peritoneal macrophages from mice and its expression may also be governed by the P2X7 receptor in response to IL-1 secretion.⁴⁰ The purinergic system is involved in innate immune responses, and it is assumed that ectonucleotidases can participate in macrophage differentiation by modulating P2 and P1 receptors.²³ The ATP released in the extracellular medium such as, for example, in stress situations or cell damage, can act by accelerating the process of chemotaxis by immature dendritic cells.⁴¹

Thus, the quantification of E-NTPDase activity in peritoneal macrophages of mice can help in understanding the mechanisms involved in immune response, physiological and pathological conditions. We stress the importance of knowing these characteristics to the appropriate quantification of enzyme activity in peritoneal macrophages of mice. Finally, in this study, we described the biochemical conditions to the proper quantification of E-NTPDase activity in peritoneal macrophages of BALB/c mice. The parallel behavior with respect to hydrolysis of Ca^{2+} -ATP and Ca^{2+} -ADP, in different conditions and in the presence of inhibitors, constituted an important evidence that both ATP and ADP are hydrolyzed by the same enzyme, an ATP-diphosphohydrolase.

Acknowledgements

We would like to thank the scholarships awarded by the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CNPq.

Disclosure of interests

The authors declare no competing interests relating to the content of this manuscript.

Funding

This study was sponsored by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant number 454060/2014-9), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência, e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT; grant number 171/2014), Brazil.

References

1. Papanikolaou A, Papafotika A, Murphy C, et al. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *J Biol Chem* 2005;280:26406-26414.
2. Braun N, Fengler S, Ebeling C, Servos J, Zimmermann H. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem J* 2000;351:639-647.
3. Trombetta ES, Helenius A. Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 1999;18:3282-3292.
4. Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST, Ford JE. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J Biol Chem* 1999;274:20064-20067.
5. Biederbick A, Kosan C, Kunz J, Elsässer HP. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. *J Biol Chem* 2000;275:19018-19024.
6. Shi JD1, Kukar T, Wang CY, et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J Biol Chem*. 2001;276:17474-17478.
7. Zimmermann H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. *Nat Med*. 1999 Sep; 5 (9): 987-8.
8. Jaques JA, Ruchel JB, Schlemmer KB, et al. Effects of curcumin on the activities of the enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from cigarette smoke-exposed rats. *Cell Biochem Funct* 2011;29(8):630-635.
9. Crowley ST, Dempsey CE, Horwitz KB, Horwitz LD. Platelet-induced vascular smooth muscle cell proliferation is modulated by the growth amplification factors serotonin and adenosine diphosphate. *Circulation* 1994;90:1908-1918.
10. Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK. Adenosine inhibits collagen and total protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999;33:190-194.
11. Zimmermann H. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflügers Archiv: Pflugers Arch* 2006;452:573-588.
12. Zimmermann H. ATP and acetylcholine: equal brethren. *Neurochem Int* 2008;52:634-648.
13. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006;112:358-404.

14. Bach BC, Leal DBR, Jaques JAS, et al. E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. *Cell Biochem Funct* 2013;31:476-481.
15. Jaques JAS, Becker LV, Souza VCG, et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 2013;31:395-399.
16. Ivanenkov VV, Murphy-Piedmonte DM, Kirley TL. Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function. *Biochemistry* 2003;42:11726-11735.
17. Berrêdo-Pinho M, Peres-Sampaio CE, Chrispim PP, et al. The Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch Biochem Biophys* 2001;391:16-24.
18. Sarkis JJ, Salto C. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res Bull* 1991;26:871-876.
19. Schetinger MR, Vieira VL, Morsch VM, Balz D. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001;128:731-741.
20. Battastini AM, da Rocha JB, Barcellos CK, Dias RD, Sarkis JJ. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res* 1991;16:1303-1310.
21. Leal DB, Streher CA, Neu TN, et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1721:9-15.
22. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ. ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996;7:225-230.
23. Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, et al. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One* 2012;7:e31205.
24. Zanin RF, Bergamin LS, Braganhol E, Sévigny J, de Souza Wyse AT, Battastini AM. Homocysteine modifies extracellular ATP availability in macrophages. *Toxicol in Vitro* 2013;27:2273-2278.
25. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 2001;A.3B.1-A.3B.2.
26. Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for the Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375-380.
27. Bradford M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem* 1976;248-254.

28. Leclerc MC, Grondin G, Gendron FP, Sévigny J, Beaudoin AR. Identification, characterization, and immunolocalization of a nucleoside triphosphate diphosphohydrolase in pig liver. *Arch. Biochem Biophys* 2000;377:372–378.
29. Plesner L. Ecto-ATPases: Identities and Functions. *Int Rev Cytol* 1995;158:141-214.
30. Dan LL. Hematologia e Oncologia de Harrison. Editora AMGH, 2 ed. 2015.
31. Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:507-513.
32. Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal*. 2005; 1(2): 193,204.
33. Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note of nomenclature. *Drug Dev. Res* 2001;52:44-56.
34. Matos JAA, Borges FP, Tasca T, et al. Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 2001;31:770-775.
35. Rico EP, Senger MR, Fauth Mda G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci* 2003;73:2071-20782.
36. Bailey K, Webb EC. Purification and properties of yeast pyrophosphatase. *Biochem J* 1944;38:394–398.
37. Meyer-Fernandes JR, Dutra PM, Rodrigues CO, Saad-Nehme J, Lopes AH. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch Biochem Biophys* 1997;341:40-46.
38. Cruz, GCN, Coelho MV. Characterization of the Ca²⁺-ATPase Activity of *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) Larvae. *Neotrop Entomol* 2007;36:65-69.
39. Failer BU, Aschrafi A, Schmalzing G, Zimmermann H. Determination of native oligomeric state and substrate specificity of rat NTPDase1 and NTPDase2 after heterologous expression in *Xenopus* oocytes. *Eur J Biochem* 2003;270:1802-1809.
40. Lévesque SA, Kukulski F, Enjyoji K, Robson SC, Sévigny J. NTPDase1 governs 92X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur J Immunol* 2010;40:1473-1485.
41. La Sala A, Ferrari D, Di Virgilio, et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol* 2003;73:339-343.

Table 1. Effects of inhibitors on ATP and ADP hydrolysis by mice macrophages^b

Inhibitor	Concentration (mM)	% Control enzyme activity	
		ATPase	ADPase
Oligomycin ^a	2 µg/mL	98 ± 8,5	95 ± 10
Orthovanadate	0.5	94 ± 14	97 ± 14
Fluoride	20	25,8 ± 6 ###	26,8 ± 8 ***
Ap5A	0.01	99 ± 9	99 ± 9
Ouabain	0.1	100 ± 8	93 ± 15
	1	100 ± 16	98 ± 10
NEM	1	92 ± 10	88 ± 10
Azide	1	99 ± 14	86 ± 9
	5	72,3 ± 8	76 ± 16
	10	74,5 ± 8	59,4 ± 9
	20	56,4 ± 8 *	40,5 ± 3 ###
Suramin	0.3	42,5 ± 8 **	51,1 ± 8 #
Levamisole	1	75,4 ± 13	90 ± 15
Tetramisole	1	75,8 ± 10	92,8 ± 19

^a The concentration used was 2 µg/mL. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). ^b Data were analyzed statistically by the Student's t test and significant difference is indicated by * (p < 0.05), ** (p < 0.01) or *** (p < 0.001); or by the Mann Whitney test and significant difference is indicated by # (p < 0.05) or ### (p < 0.001).

Table 2. Substrate specificity of E-NTPDase from mice peritoneal macrophages.

Substrate	Relative activity
ATP	1.00
GTP	0.74 ± 0.12
UTP	0.65 ± 0.10
ADP	1.00
GDP	0.56 ± 0.11
UDP	0.51 ± 0.11

The results of two experiments (n = 6) were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). All substrates were used in concentration of 2 mM (1.5 mM Ca²⁺). The control activity of the E-NTPDase was 127.75 ± 15.30 (ATP hydrolysis) and 65.80 ± 8.18 (ADP hydrolysis) nmol Pi /min/mg protein. The results are expressed in relative activity of control (ATP or ADP).

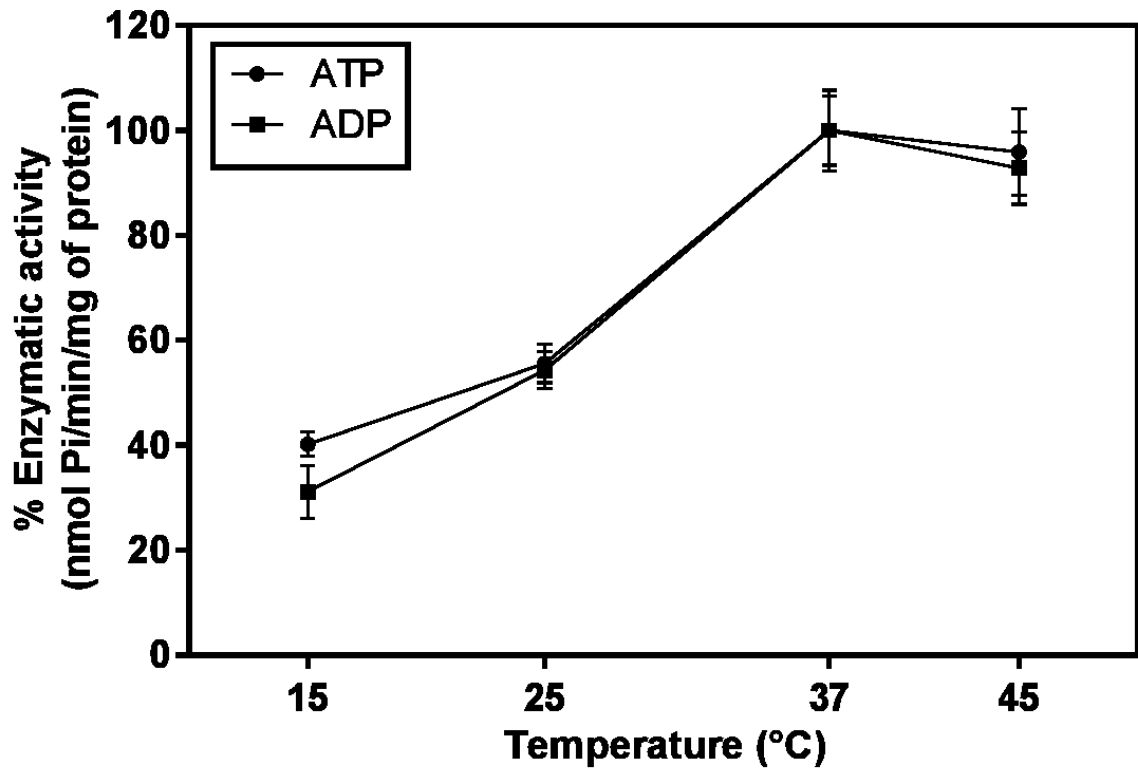
Figure 1

Figure 1. Effect of temperature on E-NTPDase activity from mice peritoneal macrophages with ATP (A) or ADP (B) as substrate. Ca^{2+} -ATP and Ca^{2+} -ADP hydrolysis were determined as described in Material and Methods and the temperatures tested were 15, 25, 37 and 45 °C. Data represent the values of the mean \pm standard error of the mean (SEM) of two different experiments with different macrophage preparations ($n = 4$).

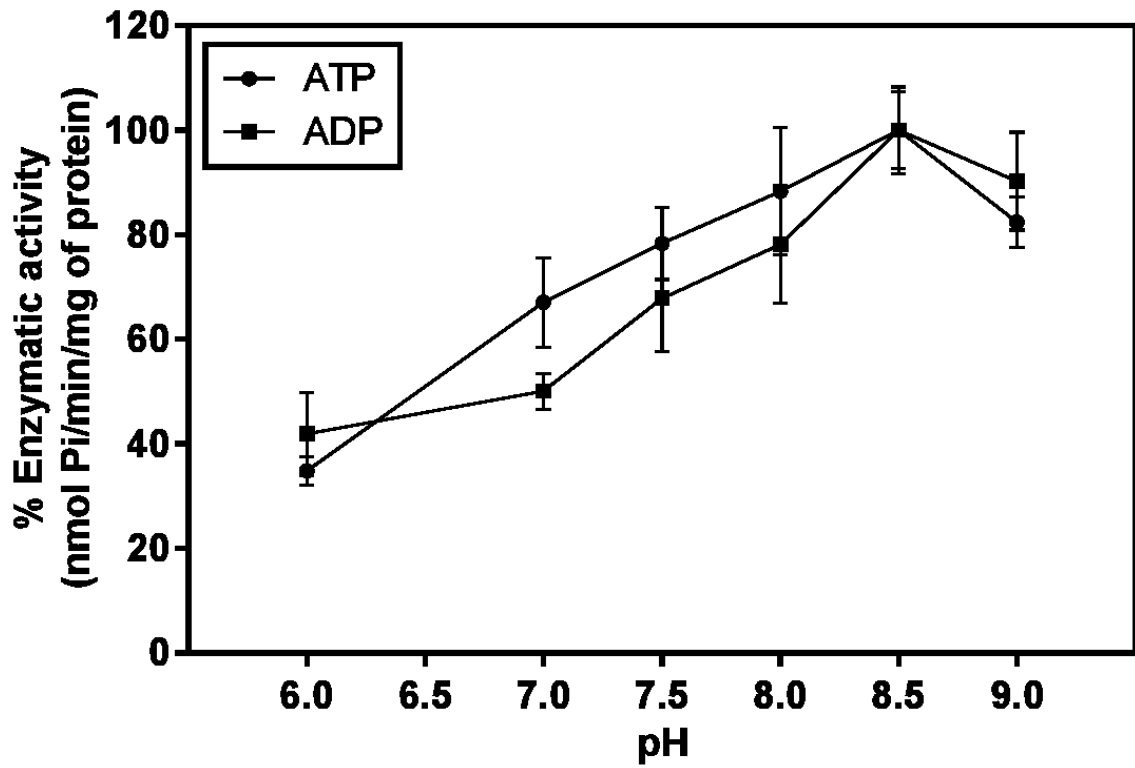
Figure 2

Figure 2. Effect of pH on the ATP-diphosphohydrolase activity. The Ca^{2+} -ATP (B) and Ca^{2+} -ADP (D) activities were determined as described in Material and Methods. The results correspond to the mean \pm standard error of the mean (SEM) of two different experiments with different macrophage preparations ($n = 4$).

4 CONCLUSÕES

- Após 12 horas, 90 % das células estavam viáveis e mesmo após 24 horas, 85 % mantiveram a viabilidade da membrana celular preservada.
- A hidrólise de ambos os substratos, ATP e ADP, foi linear no intervalo de 0,2 a 0,8 μg de proteína por reação e a catálise de ambos os substratos foi linear num intervalo de 5 a 80 minutos.
- Há ativação máxima da catálise na presença de íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} na concentração de 1.5 mM, no entanto o íon Ca^{2+} permitiu um aumento mais acentuado na atividade enzimática.
- A atividade enzimática máxima foi em meio alcalino com pH 8.5 e a temperatura ótima foi de 37 °C.
- Os valores de K_m aparente foram de 0.51 mM para a hidrólise de ATP e 0.66 mM para a hidrólise de ADP. Os valores de V_{max} calculada foram de 136.4 e 120.8 nmol de Pi /min/ mg de proteína para a atividade ATPásica e ADPásica, respectivamente.
- O uso de inibidores clássicos de ATPases e fosfatases permite concluir que não há efeito significativo na atividade de hidrólise por outras fosfatases.
- Embora a enzima seja capaz de hidrolisar outros nucleotídeos tri e difosfatos, ela apresenta maior afinidade por nucleotídeos de adenina.

REFERÊNCIAS

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 2006 Sep; 58(3):281-341.

Aga M, Johnson, CJ, Hart AP, Guadarrama AG, Suresh M, Svaren J et al. Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X7. *J Leukoc Biol.* 2002 Jul;72(1):222-32.

Albright RA, Chang WC, Robert D, Ornstein DL, Cao W, Liu L et al. NPP4 is a procoagulant enzyme on the surface of vascular endothelium. *Blood.* 2012 Nov 22;120(22):4432-40.

Airas L, Niemelä J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol- linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol.* 1997 Jan 27; 136(2):421-31.

Barsotti C, Ipata P. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Nov;36(11):2214-25.

Battastini AM, da Rocha JB, Barcellos CK, Dias RD, Sarkis JJ. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res.* 1991 Dec; 16(12):1303-10.

Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis, *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(10):e313.

Berninsone P, Miret JJ, Hirschberg CB. The Golgi guanosine diphosphatase is required for transport of GDP-mannose into the lumen of *Saccharomyces cerevisiae* Golgi vesicles. *J Biol Chem.* 1994 Jan 7; 269(1):207-11.

Berrêdo-Pinho M, Peres-Sampaio CE, Chrispim PP, et al. The Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch Biochem Biophys.* 2001 Jul 1; 391(1):16-24.

Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry.* 2004 May 11; 43(18):5511-9.

Bombara CJ, Taylor RL Jr. Signal transduction events in chicken interleukin-1 production. *Poult Sci.* 1991 Jun; 70(6):1372-80.

Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007 Aug 15; 110(4):1225-32.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006 Nov; 112(2):358-404.

Braun N, Brendel P, Zimmermann H. Distribution of 5'-nucleotidase in the developing mouse retina. *Dev. brain res.* 1995, n.1, p.79-86.

Buchthal F, Folkow B. Close arterial injection of adenosine triphosphate into frog muscle. *Acta Physiol. Scand.* 1944 Dez; 8 (4): 312-16.

Buchthal F, Folkow B. Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol. Scand.* 1948 Apr; 15(2):150-160.

Buhring HJ, Seiffert M, Giesert C, et al. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase. *Blood.* 2001; 97:3303-05.

Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 1972 Sep; 24(3):509-81.

Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?. *Gen Pharmacol.* 1985;16(5):433-40.

Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev.* 2006 Mar;58(1):58-86.

Burnstock G, Arnett TR, Orriss IR. Purinergic signaling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal.* 2013 Dec; 9(4): 541-572.

Chaves MM, Canetti C, Coutinho-Silva R. Crosstalk between purinergic receptors and lipid mediators in leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2016 Sep 5;9(1):489.

Chaves SP, Torres-Santos EC, Marques C et al. Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes Infect.* 2009;11(10-11):842–9.

Chin KV, Yang WL, Ravatn R et al. Reinventing the wheel of cyclic AMP; novel mechanisms of cAMP signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun; 968:49-64.

Christensen LD. 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 Suppl.* 1997; 73:1-28.

Cieszynski JA, Qureshi MA, Taylor RL Jr. Calcium dependency of interleukin-1 secretion by a chicken macrophage cell line. *Poult Sci.* 1999 Jan; 78(1):70-4.

Coppola A, Coppola L, dalla Mora L, Limongelli FM, Grassia A, Mastrolorenzo L et al. Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. *J Appl Physiol* 2005; 98:1414-19.

Crowley ST, Dempsey CE, Horwitz KB, Horwitz LD. Platelet-induced vascular smooth muscle cell proliferation is modulated by the growth amplification factors serotonin and adenosine diphosphate. *Circulation.* 1994 Oct; 90 (4): 1908-18.

Cruvinel WM, Júnior DM, Araújo JA et al. Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev. Bras. Reumatol.* 2010; 50 (4)434-447.

Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int.* 2001 Feb;38(2):107-25.

Daniel PB, Walker WH, Habener JF. Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr.* 1998;18:353-83.

De Marco R, Kowaltowski AT, Mortara RA, Verjovski-Almeida S. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Aug 8; 307(4):831-8.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007 Jun 11;204(6):1257-65.

Di Virgilio F. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol.* 1995. 16, 524–528.

Di Virgilio F, Soloni A. P2 receptors: new potential players in the atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 2002 Feb; 135(4): 831–842.

Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Aug; 9(4):507-13.

Dorval MEMC, Oshiro ET , Cupollilo E, Castro ACC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado Mato Grosso do Sul associada à infecção por (*Leishmania amazonensis*). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39: p. 43-46.

Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK. Adenosine inhibits collagen and total protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999 Jan; 33(1 Pt 2):190-4.

Dzhandzhugazyan K, Bock E. Demonstration of (Ca, Mg)-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett.* 1993 Dec 27; 336(2):279-83.

Enjyoji K, Sévigny J, Lin Y et al. Targeted disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med.* 1999 Sep; 5(9):1010-7.

Faria-Pinto P, Meirelles MN, Lenzi HL, et al. ATP-diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. *Parasitology.* 2004 Jul; 129 (1):51-7.

Fausther M, Lecka J, Kukulski F, et al. Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase 8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Mar; 292(3): 785-95.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F. Purinergic modulation of interleukin-1_β release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.* 1997 185, 579–582.

Fields RD, Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jun; 7(6):423-36. *Nature Reviews Neuroscience*, v.7, p.423-436.

Forrester T, Williams Ca. Release of adenosine triphosphate from isolated adult heart cells in response to hypoxia. *J Physiol*. 1977 Jun; 268(2): 371–390.

Fountain SJ, Burnstock G. A. Evolution of P2X receptors. *Purinergic Signal*. 2009 Sep; 5(3): 269–272.

Frantz S, Vincent, KA, Feron O, Kelly RA. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* 2005; 96:15–56.

Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:281-8.

Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006; 46: 277-300.

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2001 Feb;13(1):114-9.

Gao XD, Kaigorodov V, Jigami Y. YND1, a homologue of GDA1, encodes membrane-bound apyrase required for Golgi N- and O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1999 Jul 23; 274(30): 21450-6.

Goding JW, Grobber B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1638: 1-19.

Gonzalez-Alonso, Olsen DB, Saltin B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. *Circ Res*. 2002 Nov 29; 91(11):1046-55.

Gomes RS, de Carvalho LC, de S V, Fietto JL, Afonso LC. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. *Microbes Infect*. 2015;17(4): 295–303.

Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jan 26; 218(3):916-23.

Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*. 2001 Dec;23(12):1112-9.

Harmey D, Hesse L, Narisawa, S, et al. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank. *Am. J. Pathol.* 2004;164: 1199-209.

Hesse L, Johnson KA, Anderson, HC, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 9445-9.

Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Jun; 24(6):290-7.

Hsu, HHT, Anderson, HC. A role for ATPase in the mechanisms of ATP dependent Ca and phosphate deposition by Isolated rachitic matrix vesicles. *Int. J. Biochem.* 1995; 27:1349-56.

Hussain I, Qureshi MA. The expression and regulation of inducible nitric oxide synthase gene differ in macrophages from chickens of different genetic background. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998 Feb 27; 61(2-4):317-29.

Hyman, M. C., Petrovic-Djergovic, D., Visovatti, S. H., et al. (2009). Self-regulation of inflammatory cell trafficking in mice by the leukocyte surface apyrase CD39. *J Clin Invest.* 2009 May; 119(5):1136-49.

Illes P, Alexandre RJ. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jan 1; 483(1):5-17.

Ivanenkov VV, Murphy-Piedmonte DM, Kirley TL. Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function. *Biochemistry.* 2003 Oct 14; 42(40):11726-35.

James G, Butt AM. Adenosine 5' triphosphate evoked mobilization of intracellular calcium in central nervous system white matter of adult mouse optic nerve. *Neurosci Lett.* 1999 Jun 11; 268(1):53-6.

Johnson KA, Hesse L, Vaingankar S, et al. Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000; 279: 1365-1377.

Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. *Nat Rev Immunol.* 2011 Mar; 11(3):201-12.

Junior IC1, Rodrigues ML, Alviano CS, Travassos LR, Meyer-Fernandes JR. Characterization of an ecto-ATPase activity in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 2005 Jul; 5 (10):899-907.

Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem.* 1996 Dec 20; 271(51):33116-22.

Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci.* 1999 Jan;24(1):22-5.

Knowles AF, Nagy AK. Inhibition of an ecto ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur J Biochem.* 1999 Jun; 262(2):349-57.

Kukulski F, Komoszyński M. Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *Eur J Biochem.* 2003 Aug; 270(16):3447-54.

Kukulski F, Lévesque SA, Sévigny J. Impact of ectoenzymes on P2 and P1 receptor signaling. *Advances in Pharmacology.* 2011; 61: 263–99.

Kusner DJ, Barton JA. ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent *Mycobacterium tuberculosis* via calciumdependent phagosome-lysosome fusion. *J Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3308-15.

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

Langer D, Ikehara Y, Takebayashi H, Hawkes R, Zimmermann H. The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal and adult neurogenic zones. *Neuroscience.* 2007 Dec 19; 150(4):863-879.

Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 2001 Nov; 79(3):463-484.

Leal DB, Streher CA, Neu TN, et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 18; 1721(1-3):9-15.

Leclerc MC, Grondin G, Gendron FP, Sévigny J, Beaudoin AR. Identification, characterization, and immunolocalization of a nucleoside triphosphate diphosphohydrolase in pig liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000 May; 377(2): 372–8,

Lévesque SA, Kukulski F, Enjyoji K, Robson SC, Sévigny J. NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur J Immunol.* 2010 May; 40(5):1473-85.

Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, et al. Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res.* 2003 Feb 15; 109(4):189-94.

Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* 1994; 153:3574-83.

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost.* 2003 Dec; 1(12):2497-509.

Marques-da-Silva EdA, de Oliveira JC, Figueiredo AB, Lima Jr DdS, Carneiro CM, Fietto JLR, et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microb Infect* 2008;10:850e7.

Marques-da-Silva C, Chaves MM, Chaves SP, et al. Infection with *Leishmania amazonensis* upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. *Cell Microbiol.* 2011;13(9):1410–28.

Martí E, Gómez de Aranda I, Solsona C. 8-Azido-nucleotides as substrates of Torpedo electric organ apyrase. Effect of photoactivation on apyrase activity. *Brain Res Bull.* 1997; 44(6):695-9.

Martín-Satué, M., Lavoie, E. G., Pelletier, J., et al. Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol.* 2009 May; 131(5):615-28.

Menezes Filho JF, Barros RMG, Silva AL, Mambelli M, Silva PG. Leishmaniose cutâneo mucosa ou tegumentar americana - Revisão da literatura e caso clínico. *Odontol. mod.* 1986; 13:32-42.

Meyer-Fernandes JR, Dutra PM, Rodrigues CO, et al. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch Biochem Biophys*. 1997 May 1; 341(1):40-6.

Millán JL. Alkaline phosphatases. Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal*. 2006 Jun; 2(2):335-41.

Mitchell CH, Carre DA, McGlinn AM, Stone RA, Civan MM. A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. 1998 USA* **95**, 7174–7178.

Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, et al. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med*. 2002 Apr; 8(4):358-65.

Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K. Enzymes involved in purine metabolism: a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol*. 1999 Oct; 14(4):1321-40.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:958-69.

Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST, Ford JE. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J Biol Chem*. 1999 Jul 16; 274(29):20064-7.

Nakamura T, Nakamura K. and Stinson, R.A. Release of alkaline phosphatase from human osteosarcoma cell by phosphatidylinositol phospholipase C: effect of tunicamycin. *Arch. Biochem. Biophys*. 1988; 265: 190-6.

Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6a ed., Porto Alegre: Artmed; 2014.

Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, et al. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - estudos na população humana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 1995 Jul-Set; 28(3):185-193.

Paddle BM, Burnstock G. Release of ATP from perfused heart during coronary vasodilatation. *Blood Vessels*. 1974; 11(3):110-9.

Papanikolaou A, Papafotika A, Murphy C, et al. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *J Biol Chem*. 2005 Jul 15; 280(28):26406-14.

Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ. ATP diphosphohydrolase (APIRASE, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets*. 1996; 7(4):225-30.

Plesner L. Ecto-ATPases: Identities and Functions. *Int Rev Cytol*. 1995; 158:141-214.

Qureshi MA, Marsh JA, Dietert RR, et al. Profiles of chicken macrophage effector functions. *Poult Sci*. 1994 Jul; 73(7):1027-34.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998 Sep; 50(3):413-92.

Rico EP, Senger MR, Fauth Mda G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci*. 2003 Sep 5; 73(16):2071-82.

Rittiner JE, Korboukh I, Hull-Ryde EA, et al. AMP Is an Adenosine A1 Receptor Agonist. *J Biol Chem*. 2012 Feb 17; 287(8):5301-9.

Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost*. 2005 Apr; 31(2):217-33.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006 Jun; 2(2): 409-430.

Roman RM, Fitz JG. Emerging roles of purinergic signalling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function. *Gastroenterol*. 1999 Apr; 116(4):964-79.

Santos RF, Possa MA, Bastos MS, et al. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on trypanosoma cruzi infectivity and virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e387.

Sarkis JJ, Guimarães JA, Ribeiro JM. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*: kinetics and purification. *Biochem J.* 1986 Feb 1; 233(3):885-91.

Sarkis JJ, Salto C. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res Bull.* 1991 Jun; 26(6):871-6.

Say JC, Ciuffi K, Furriel RPM, et al. Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1074: 256-62.

Souza MC, Assis EA, Gomes RS, Marques-da-Silva EA, Melo MN, Fietto JL, et al. The influence of ecto-nucleotidases biomedical journal 39 (2016) 244 e250 249 on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop* 2010;115:262 e 9.

Schetinger MR, Falquembach F, Michelot F, Mezzomo A, Rocha JB. Heparin modulates adenine nucleotide hydrolysis by synaptosomes from cerebral cortex. *Neurochem Int.* 1998a setembro; 33 (3): 243-9.

Schetinger, MRC, Bonan CD, Schierholt RC, et al. Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: a possible link between preconditioning and adenosine production. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 1998b Sep-Oct; 7(5):281-6.

Schetinger MR, Vieira VL, Morsch VM, Balz D. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2001 Apr;128(4):731-41.

Schoen SW, Kreutzberg GW. Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult rat dentate gyrus. *Exp. neurol.* 1994; 127(1) p.106-118.

Schwiebert EM, Zsembery A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Sep 2; 1615(1-2):7-32.

Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004 Oct; 139(2):203-7.

Seong, SY, Matzinger, P. Hydrophobicity: an ancient damage associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4:469-478.

Sévigny J, Levesque FP, Grondin G, Beaudoin AR. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Feb 11; 1334(1):73-88.

Sévigny J, Sundberg C, Braun N, et al. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood*. 2002 Apr 15; 99(8):2801-9.

Snijdewint FG, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol*. 1993;150(12):5321-9.

Solini A, Chiozzi P, Morelli A, et al. Enhanced P2X7 activity in human fibroblasts from diabetic patient - A possible pathogenic mechanism for vascular damage in diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jul; 24(7):1240-5.

Solle M, Labasi J, Perregaux DG, et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X (7) receptors. *J Biol Chem*. 2001 Jan 5;276(1):125-32.

Stefan C1, Jansen S, Bollen M. Modulation of purinergic signaling by NPPtype ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal*. 2006 Jun; 2(2):361-70.

Stein SC, Woods A, Jones NA et al. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J*. 2000; 345: 437-443. 345(3)437-443.

Strobel RS, Nagy AK, Knowles AF, Buegel J, Rosenberg MD. Chicken oviductal ecto-ATP diphosphohydrolase: purification and characterization. *J Biol Chem*. 1996 Jul 5; 271(27):16323-31. *The Journal of Biological Chemistry*.1996; 271 (27) :16323-16331.

Takahashi T, Old LJ, Boyse EA. Surface alloantigens of plasma cells. *J Exp Med*. 1970; 131:1325-1341.

Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, et al. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med*. 2004 Dec 6; 200(11):1395-405.

Torres CR, Vasconcelos EG, Ferreira ST, Verjovski-Almeida S. Divalent cation dependence and inhibition of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase by fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *Eur J Biochem*. 1998 Jan 15; 251(1-2):516-21.

Torres IL, Buffon A, Dantas G, et al. Chronic stress effects adenine nucleotide hydrolysis in the blood, serum and brain structures of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002 Dec; 74(1):181-6.

Vassort G. Adenosine 5-triphosphate: a P₂-purinergic agonist in the myocardium. *Physiol Rev.* 2001 Apr; 81(2):767-806.

Vieira VP, Rocha JB, Stefanello FM, Balz D, Morsch VM, Schetinger MR. Heparin and chondroitin sulfate inhibit adenine nucleotide hydrolysis in liver and kidney membrane enriched fractions. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Dec;33(12):1193-201.

Wang TF, Guidotti G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 1998 Apr 20; 790(1-2):318-22.

White N, Burnstock G. P₂ receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Apr;27(4):211-7.

World Health Organization (Who). Special program for research and training in tropical diseases (TDR). Research to support the elimination of visceral leishmaniasis. Annual report 2009. TDR/BL10.10 Geneva; 2010.

Wuthier R.E, Register TC. Role of alkaline phosphatase, a polifunctional in mineralizing tissues. In: "The chemistry and biology of mineralized tissues". (Butler, W.T. ed) EBSCO Média Inc. Birgmingham. 1958: 113-124.

Yegutkin G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta.* 2008 May;1783(5):673-94.

Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, et al. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One.* 2012; 7(2):e31205.

Zanin RF, Bergamin LS, Braganhol E, Sévigny J, de Souza Wyse AT, Battastini AM. Homocysteine modifies extracellular ATP availability in macrophages. *Toxicol in Vitro.* 2013 Dec; 27(8):2273-8.

Ziganshin AU, Hoyle C, Burnstock, G. Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. *Drug dev. res.* 1994; 32: 134-146.

Zimmermann H. 5'-Nucleotidase molecular structure and functional aspects. *Biochem.* 1992; 285:345-365.

Zimmermann H. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev. Res.* 1996; 39:337–352.

Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. neurobiol.* 1996; 49 (6): 589-618.

Zimmermann H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. *Nat Med.* 1999 Sep; 5 (9): 987-8.

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000; 362:299–309.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note of nomenclature. *Drug Dev. Res.* 2001; 52: 44-56.

Zimmermann H. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflügers Archiv: Pflugers Arch.* 2006 Aug; 452(5):573-88.

Zimmermann H. ATP and acetylcholine: equal brethren. *Neurochemistry International, Neurochem Int.* 2008; Mar-Apr; 52(4-5):634-48.

Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* 2012 Sep; 8(3):437-502.

APÊNDICES
FIGURAS E TABELAS

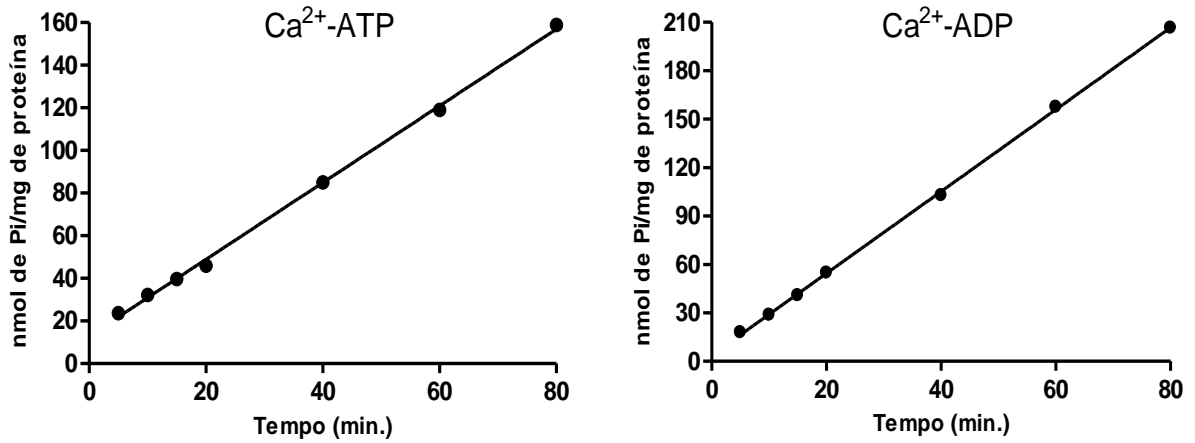


Figura 1. Curva de tempo. As atividades ATPásica (Ca²⁺-ATP) e ADPásica (Ca²⁺-ADP) em relação ao tempo foram determinadas como descrito em Material e Métodos com modificações no tempo de incubação. Cada ponto representa a média de ensaios em triplicata. Os resultados correspondem a média de três experimentos com diferentes preparações de macrófagos (n=3).

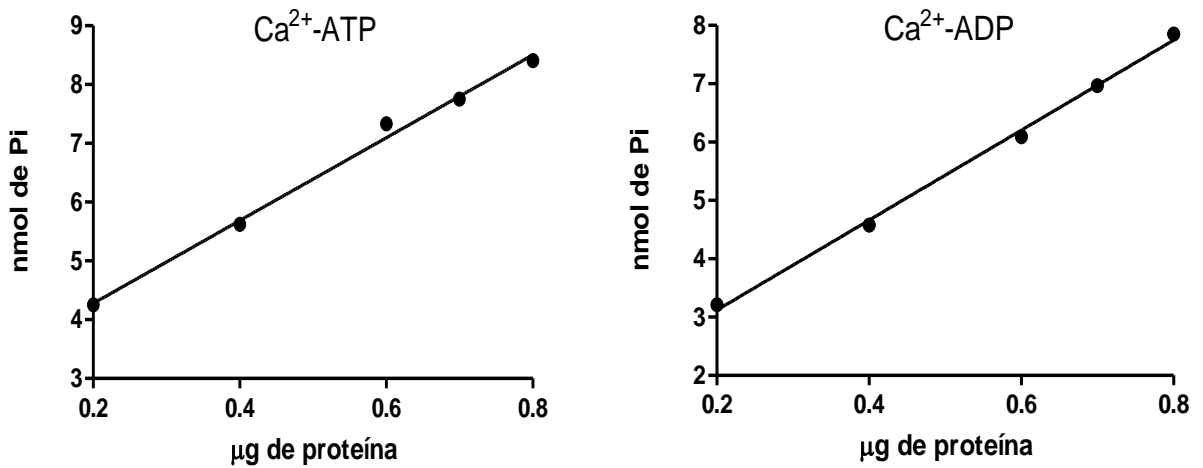


Figura 2. A dependência da concentração de proteína para as atividades ATPásica (Ca²⁺-ATP) e ADPásica (Ca²⁺-ADP) foram determinadas como descrito em material e métodos com modificações na concentração de proteína. Cada ponto representa a média de ensaios em triplicata. Os resultados correspondem a média de três experimentos com diferentes preparações de macrófagos (n=3).

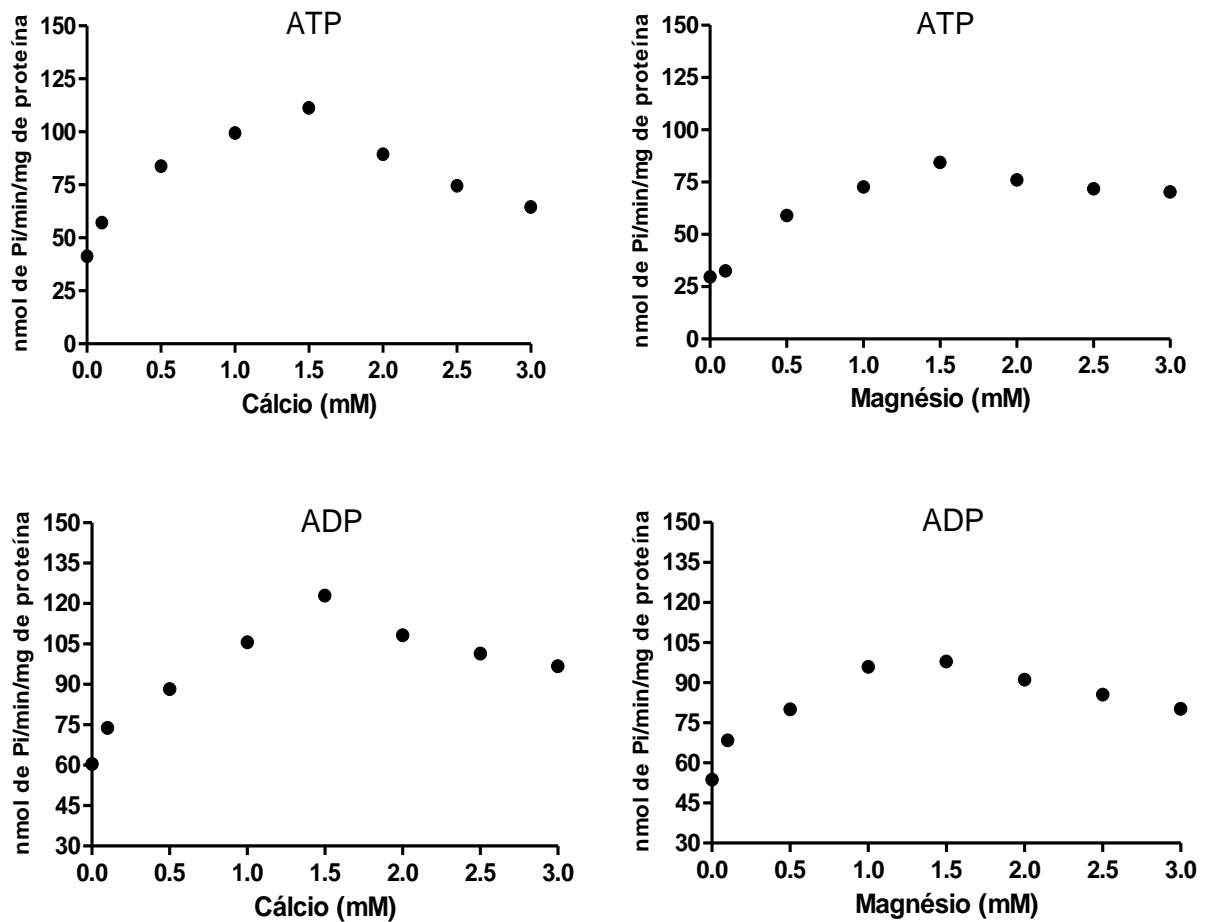


Figura 3. Variação das atividades ATPásica e ADPásica com a concentração de cálcio e magnésio. O meio de incubação foi descrito em material e métodos com variação nas concentrações de cálcio e magnésio (0,1 a 3 mM) na presença de 2 mM de nucleotídeo. Cada ponto representa a média de triplicatas. Os resultados correspondem a média de dois experimentos com diferentes preparações de macrófagos (n=4).

Tabela 1. Constantes cinéticas E-NTPDase de macrófagos peritoneais.

Constantes cinéticas	
Ca^{2+} - ATP	Ca^{2+} -ADP
Km: 0.51 mM	Km: 0.66 mM
Vmáx: 136.4 nmol de Pi/min/mg de proteína	Vmáx: 120.8 nmol de Pi/min/mg de proteína

ANEXO 1 – Cell Biochemistry and Function: Author Guidelines

NIH Public Access Mandate

For those interested in Wiley policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#)

For additional tools visit [Author Resources](#) - an enhanced suite of online tools for Wiley Online Library journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

Author Guidelines

Cell Biochemistry and Function is an online journal that publishes original research articles and reviews on the mechanisms whereby molecular and biochemical processes control cellular activity. This should have a particular emphasis on the **integration of molecular and cell biology, biochemistry and physiology in the regulation of tissue function in health and disease**.

The primary remit of the journal is on mammalian biology both *in vivo* and *in vitro*, but **studies of cells *in situ* are especially encouraged**. Observational and pathological studies will be considered providing they include a rational discussion of the possible molecular and biochemical mechanisms behind them **and the immediate impact of these observations to our understanding of mammalian biology**.

Areas of particular interest include:

- Dysregulation of cellular function in disease
- Cell cycle control with respect to cell proliferation, differentiation and death
- DNA and RNA processing and the effects on cellular activity
- The regulation of stem cells and regenerative medicine
- Intra-cellular organelles, metabolism and the control of cell function
- Local niches and cell function.

Types of contribution. The editors welcome original research papers, rapid communications, commentaries and letters. Reviews are usually commissioned but unsolicited, high quality reviews on the integration of cellular function and suggestions for future topics will also be welcomed after discussion with the review editor. There are no restrictions on length but papers may be subject to editorial amendment if accepted.

Submissions will be placed in one of the following sections

- Cell Cycle/Nucleic Acids/Protein Synthesis
- Cardiovascular Science
- Cell Signalling
- Connective Tissues
- Endocrinology and Cell Metabolism
- Infection and Immunity
- Neuroscience
- Nutrition/Toxicology/Free Radical

Refereeing. All manuscripts are subject to a confidential reviewing process. Referees' comments will be made available to authors to ensure openness of the review process.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Cell Biochemistry and Function operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then visit <http://mc.manuscriptcentral.com/cbf> and navigate to the *Cell Biochemistry and Function* online submission site.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created.

All papers must be submitted via the online system.

Required information

Failure to supply the following information may result in immediate rejection.

- 1) Manuscripts must be accompanied by a Submission Letter confirming that all authors have agreed to the submission and that it has not been submitted elsewhere.

- 2) Authors are required to upload a paragraph detailing the significance of their paper in the context of current knowledge. This will be published as part of the final manuscript.

- 3) Authors are required to supply with every submitted manuscript the names and contact details of 4 possible reviewers. These should NOT be members of the Editorial Board with at least 2 currently working outside the country from which the paper is submitted. Authors should indicate which Editorial Board member is most appropriate for reviewing the submission, although the Editor-in-Chief may choose another for reasons of speed.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .docx, .rtf, .ppt, .xls. **LaTeX** files may be submitted provided that an .eps or .pdf file is provided **in addition** to the source files. Figures may be provided in .tiff or .jpeg format.

NEW MANUSCRIPT

Non-LaTeX users. Upload your manuscript files. At this stage, further source files do not need to be uploaded.

LaTeX users. For reviewing purposes you should upload a single .pdf that you have generated from your source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box.

REVISED MANUSCRIPT

Non-LaTeX users. Editable source files must be uploaded at this stage. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

LaTeX users. When submitting your revision you must still upload a single .pdf that you have generated from your revised source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box. In addition you must upload your TeX source files. For all your source files you must use the File Designation "Supplemental Material not for review". Previous versions of uploaded documents must be deleted. If your manuscript is accepted for publication we will use the files you upload to typeset your article within a totally digital workflow.

Electronic Enhancement/Supporting Information. Data that are (i) not amenable to presentation in a traditional print format, (ii) of interest primarily to specialists and do not require Journal page space, or (iii) particularly useful to the community in electronic (downloadable) form can be published online as supporting information hosted within Wiley Online Library.

ONLINE OPEN

OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

COPYRIGHT AND PERMISSIONS

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp.

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQ hosted on [Wiley Author Services](#) and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>. **Note to NIH Grantees** Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant

holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information see <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

COPE Membership

Cell Biochemistry and Function endorses the COPE (Committee on Publication Ethics) guidelines and will pursue cases of suspected research and publication misconduct (e.g. falsification, fabrication, plagiarism, inappropriate image manipulation, redundant publication). In such cases, the journal will follow the processes set out by COPE. For more information about COPE, please visit the COPE website at

<http://www.publicationethics.org.uk>.

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. Submitted material will not be returned to the author.

MANUSCRIPT STYLE

The language of the journal is English. 12-point type in one of the standard fonts: Times, Helvetica, or Courier is preferred. It is not necessary to double-line space your manuscript. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

- During the submission process you must enter the full title, short title of up to 70 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address (department, institute, city, country [if the affiliation is in foreign language, country name should always be in English]; ZIP code, street address and PO Box not allowed), as well as the corresponding author's full postal address, include email address (Email, not E-mail, followed by colon; Email should not be broken, start a new line if space is not enough, no full stop at end) who will check the proofs (Do not include any e-mail addresses other than the corresponding author's).
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)**.
- Enter an **abstract** of up to 200 words for all articles [except book reviews]. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include a **Significance of the Study** consisting of a single paragraph of no more than 100 words. The main goal of the Significance paragraph is to explain the significance of the findings and their relevance in the context of cellular biochemistry and function to a broad readership, from basic to clinical research scientists. No references should be included. Please note that a paragraph on significance is not required for review articles.
- Include at least four and up to maximum of eight **keywords**, separated by commas, that describe your paper for indexing purposes.
- The remainder should be presented as: text - including suppliers of materials and an introduction which does not recapitulate the results and conclusions; acknowledgements; references; tables; figure captions (these last three supplied separately) and illustrations.
- **Rapid communications** should be less than 4 printed pages (approximately 1000 words excluding references) and contain only a single figure. They should have the same style as for full research articles.
- Units, abbreviations and nomenclature. In general, the IUPAC-IUB commissions convention, e.g. as used by the *Biochemical Journal* will be followed. It is preferable to use SI units, but other, more generally used units can be used, preferably with the equivalent values in SI units in parentheses.

Reference style. References should be listed at the end of the manuscript in alphabetical order according to the name of the first author and chronologically where several papers by the same author are listed. References should be cited by superior numbers. All references must be complete and

accurate. Use Medline abbreviations for journal names. They can be found at:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>. Online citations should include date of access. If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. Where possible the DOI* for the reference should be included at the end of the reference. References should be listed in the following style:

1. Nanni G, Canepa C, Casu A. Dolichol and vitamin A content in rat liver Ito (perisinusoidal) cells. *Life Sci.* 1997;**60**:21-28. DOI: 10.1002/ls.258
2. Chayen J, Bitensky L. *Cell Biology in Medicine*. 2nd ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Ltd; 1973.
3. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. In: Colowick SP, Kaplan ON, eds. *Methods in Enzymology*. 10th ed. San Diego, CA: Academic Press; 1984:114-121.
4. The Oncology Website. Cancer Facts & Figures 1998. <http://www.mit.com/oncology/>. Accessed April 24, 1999.

*The Digital Object Identifier (DOI) is an identification system for intellectual property in the digital environment. Developed by the International DOI Foundation on behalf of the publishing industry, its goals are to provide a framework for managing intellectual content, link customers with publishers, facilitate electronic commerce, and enable automated copyright management.

Illustrations. Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. The artwork must be sized to the text width of 75 mm one column, 156 mm two column. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings etc - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi
- Tables should be part of the main document and should be placed after the references. If the table is created in Excel, the file should be uploaded separately.
- Please set in the following order, if present:
 1. Acknowledgments
 2. Appendix
 3. How To Cite
 4. Disclosure/Conflict of Interest
 5. End notes
 6. References

Colour illustrations supplied electronically in either .tiff or .jpeg format will be used in the online and .pdf versions of the article at no cost to the author or which will appear on the *Wiley Online Library site*.

POST ACCEPTANCE

Further information. For accepted manuscripts the publisher will supply proofs to the corresponding author prior to publication. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimize the risk of the paper being held over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only (unless otherwise stated). Please sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Reprints of your article and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

Contact Information

Should the need arise, the Editor-in-Chief can be contacted as follows: Dr Nigel Loveridge, Orthopaedic Research, University of Cambridge Clinical School, Addenbrookes Hospital (Box 180), Cambridge CB2 2QQ, UK. Tel. +44 (0) 1223 748733; Fax: +44 (0) 1223 214094; e-mail: nl10003@cam.ac.uk

Author Resources. Manuscript now accepted for publication?

If so, visit our suite of tools and services for [authors](#) and sign up for:

- Article Tracking
- E-mail Publication Alerts
- Personalization Tools

Cite EarlyView articles. To link to an article from the author's homepage, take the DOI (digital object identifier) and append it to "http://dx.doi.org/" as per following example:

DOI 10.1002/hep.20941, becomes <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20941>.

Publishing and the Ecology of European Research (PEER)

This journal is participating in the PEER Project, an EU-funded initiative to examine the impact on scholarly journals of depositing accepted manuscripts in web-based repositories. If the corresponding author is based in an EU country, we will deposit the accepted manuscript into the central project repository (DRIVER). The article's availability will be subject to a post-publication embargo. This project has no effect on your rights or obligations under the terms of the copyright agreement pertaining to this journal.

Pre-Submission English Language Editing. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.com.jp/journals/editcontribute.html> All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. **Conflict of Interest.** All authors must declare financial/commercial conflicts of interest. Even if there is none, this should be stated in a separate paragraph following on from the Acknowledgements section. This is a mandatory requirement for **all** articles.