

## **AValiação DO METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM SORO DE RATOS SUBMETIDOS A MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE**

Leonardo L. da Silveira<sup>1\*</sup>, Karine L. da Silveira<sup>2</sup>, Fernanda L. Cabral<sup>2</sup>, Pedro H. Doleski<sup>2</sup>, Daniela B. R. Leal<sup>3</sup>

1. Estudante de IC do Curso de Medicina do Centro de Ciências da Saúde da UFSM

2. Pesquisador do Centro de Ciências da Saúde da UFSM

3. UFSM - Departamento de Microbiologia e Parasitologia / Orientadora

### **Resumo:**

O modelo experimental de artrite induzida por adjuvante (AIA) é empregado na investigação de artropatias como a artrite reumatoide (AR). A sinalização purinérgica atua modulando respostas inflamatórias e imunes. Suas biomoléculas extracelulares têm as concentrações controladas por ectoenzimas.

Avaliamos o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina. Os resultados demonstraram aumento da hidrólise do ATP e do ADP na atividade da E-NTPDase, do AMP na atividade da E-5'-nucleotidase e da atividade da E-ADA.

O aumento da atividade da E-NTPDase faz com que os valores retornem a níveis basais, uma vez que altas concentrações de ATP e ADP contribuem para dano tecidual. A E-5'-nucleotidase hidrolisa esse excesso de ATP e ADP aumentando a concentração de adenosina que é desaminada pela E-ADA.

Os resultados reforçam a participação do sistema purinérgico na AR. A queda da concentração de adenosina na corrente sanguínea pode ser o fator que leva a inflamações sistêmicas nos pacientes.

**Autorização legal:** Os cuidados e manipulação com os animais foram realizados de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL, 2009) em conformidade com as diretrizes internacionais e foram aprovados pela Comissão de Uso e Cuidados de Animais de Laboratório da UFSM sob o número 019/2013.

**Palavras-chave:** E-NTPDase; E-ADA; artrite.

**Apoio financeiro:** PIBIC-CNPq e CAPES-CNPq

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UFSM.

### **Introdução:**

A artrite reumatoide (AR) é uma doença multifatorial, autoimune, inflamatória, sistêmica, crônica e progressiva, que afeta cerca de 1% da população. Ela cursa com dano articular irreversível, já que acomete preferencialmente a membrana sinovial, podendo levar à destruição das articulações por erosão do osso e da cartilagem, impondo limitação e incapacidade de movimentos, além de significativo aumento da taxa de morbidade devido a complicações por processos inflamatórios.

As primeiras manifestações da resposta inflamatória devem-se a um excesso de sinais decorrentes das respostas dos linfócitos Th1 e Th17 e de suas citocinas tais como IL 1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . Esses mediadores recrutam macrófagos e fibroblastos que se exacerbam na membrana sinovial, tornando-a um espaço hiper celular e formando uma camada conhecida como *pannus*.

Para realização de estudos desta doença, utilizamos modelo experimental de artrite induzida por adjuvante (AIA) completo de Freund (CFA), uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis*. A resposta imunológica frente a essa bactéria produz anticorpos contra a proteína HSP de sua superfície, desencadeando uma reação inflamatória cruzada semelhante ao da AR. Há a ativação da resposta imune na qual o sistema purinérgico é uma importante via de sinalização.

Esse sistema é composto por sinalizadores purínicos que consequentemente interagem com receptores específicos denominados purinoreceptores, como também por enzimas que controlam a concentração dos sinalizadores. Entre estes estão os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídeo adenosina que são secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas.

Por isso, torna-se de interesse científico a avaliação da atividade das ectonucleotidases participantes da degradação

de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina, que têm as concentrações extracelulares controladas por ação de ectoenzimas como E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA. Elas medeiam muitos aspectos da função celular, desde eventos pró-inflamatórios até a ocorrência extra-articular da doença.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina através da atividade dessas ectoenzimas: E-NTPDase para a hidrólise do ATP e do ADP, E-5'-nucleotidase para a hidrólise do AMP e E-ADA em soro de ratos submetidos ao modelo experimental de AR, com o intuito de conhecer seus mecanismos e avaliar sua metabolização sistemicamente.

### Metodologia:

Neste estudo foram utilizados 14 ratos *Wistar* fêmeas adultas, com idade entre 8 e 12 semanas, pesando aproximadamente 250g, provenientes do Biotério Central e mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM. Os animais foram distribuídos randomicamente em dois grupos: controle (CN), sem indução de AR e grupo com AIA.

Para o modelo experimental utilizamos 50µl de CFA (1mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, SIGMA) na indução por injeção intraplantar direita. O grupo CN foi induzido com soro fisiológico 0,9%. Para confirmar, foram feitos testes de medição de pata, usando paquímetro digital para avaliar edema, e hiperalgesia térmica em imersão, para avaliar a hipersensibilidade.

Após 15 dias, os animais foram anestesiados com isoflurano e submetidos à toracotomia com coleta de sangue por punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 3500rpm por 15 minutos. O soro resultante foi aliqotado em eppendorfs e mantido em gelo à -80°C até as determinações enzimáticas. A dosagem de proteína foi determinada pelo método de Comassie Brilliant Blue usando albumina sérica bovina como padrão.

O ensaio enzimático foi determinado em um meio reacional contendo tampão Tris-HCl 205mM, pH 8,0, para a atividade da E-NTPDase, responsável pela hidrólise de ATP e ADP; e tampão Tris-HCl 182mM, pH 7,5, para a atividade da E-5'-nucleotidase responsável pela hidrólise de AMP. Foram adicionados 30µl de amostra ao sistema e a pré-incubação se deu por um período de 10 minutos a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 60µl de substrato, ATP e ADP numa concentração final de 3,0mM e AMP numa concentração final de 2mM. Os ensaios foram interrompidos após 40

min pela adição de 200µl de TCA 10% para proporcionar uma concentração final de 5% e volume final de 400µl. Todas as amostras foram centrifugadas a 3500rpm por 15 minutos para eliminar proteínas precipitadas e o sobrenadante foi usado para a determinação. O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinado utilizando verde de malaquita como reagente colorimétrico e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como padrão.

A atividade da E-ADA foi determinada espectrofotometricamente e se baseia na medição direta da formação de amoníaco produzido, quando E-ADA atua em excesso de adenosina. Incubou-se 25µL da amostra com adenosina 21 mM, pH 6,5, durante 60 min a 37 °C, parando-a pela adição de fenol 106,2 mM, nitroprussiato de sódio 167,8 mM e solução de hipoclorito.

Todas as amostras foram realizadas em triplicata no Laboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada (LABIBIO - UFSM). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student. Um  $P < 0,05$  foi considerado para representar diferença significativa em todas as análises.

### Resultados e Discussão:

Como pode ser observado na Figura 1A, a hidrólise do ATP extracelular foi alterada em ratos com AR, estando aumentada em 55,76%, além de um aumento de 78% na hidrólise de ADP extracelular (Figura 1B) no grupo AR, quando comparados com o grupo controle.

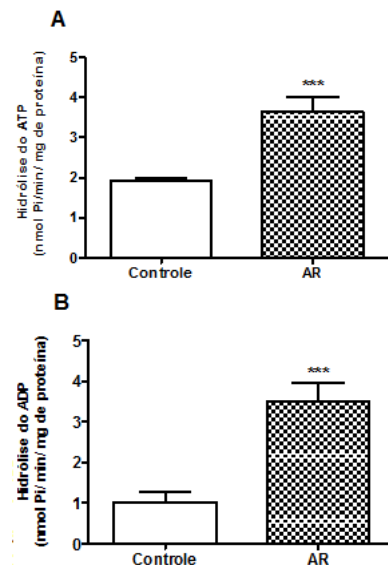


Figura 1 – Atividade da E-NTPDase em soro de ratos submetidos a modelo experimental de artrite: 5A) hidrólise do ATP e 5B) hidrólise do ADP. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média estão indicados para cada grupo (n=7).  $P < 0,0005$  representa diferença estatística entre os grupos.

Em relação à hidrólise de AMP extracelular pela E-5'-nucleotidase, houve

aumento no grupo AIA em 76% (Figura 2).

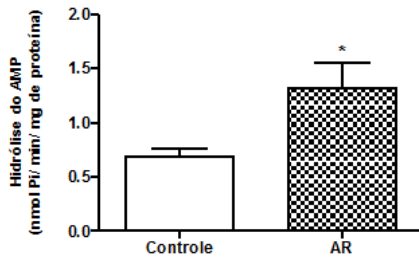


Figura 2 – Atividade da E-5'-nucleotidase (hidrólise do AMP) em soro de ratos submetidos a modelo experimental de artrite. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=7). \* (P<0,01) representa diferença estatística entre os grupos.

Os resultados do presente trabalho demonstraram um aumento na atividade da E-NTPDase com ATP e ADP como substrato em ratos com AR quando comparados aos animais controle. Este aumento na atividade hidrolítica para ATP também foi observado por Becker et al. (2010), em seu estudo com pacientes artríticos, o qual encontrou um aumento na atividade da E-NTPDase em plaquetas e linfócitos. De acordo com Becker et al. (2010), é bem documentado que o ATP é frequentemente encontrado no fluido sinovial de pacientes acometidos com a doença. Ainda, o ATP atua via receptores P2 e assim induz níveis significativamente mais elevados de IL-1 $\beta$  em pacientes com artrite sugerindo que células mononucleares destes pacientes são mais sensíveis à estimulação do ATP do que aquelas de indivíduos saudáveis.

Desse modo, o aumento da atividade da E-NTPDase no soro de ratos com AR provoca um aumento da hidrólise de ATP e ADP e, como um mecanismo de compensação, conduz à manutenção dos seus níveis adequados basais, uma vez que altas concentrações de ATP e ADP no meio extracelular ativam mecanismos pró-inflamatórios e contribuem para dano tecidual e inflamação. Esse aumento da hidrólise de ATP gera baixas concentrações extracelulares nas quais age como anti-inflamatório.

Também houve um aumento de 231% na desaminação da adenosina (Figura 3), de 0,960 U ADA/min/mg de proteína do grupo controle para 3,178 U ADA/mg de proteína em ratos com AIA.

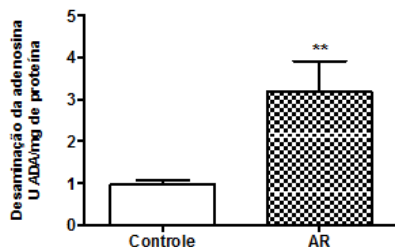


Figura 3 – Atividade da E-ADA em soro de ratos submetidos a modelo experimental de artrite. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=7). \*\* (P<0,005) representa diferença estatística entre os grupos.

Sabe-se que a E-5'-nucleotidase degrada o AMP formado pela E-NTPDase, gerando adenosina. O nucleosídeo adenosina pode ser liberado no meio extracelular como resultado da degradação do ATP e do ADP por enzimas específicas, ou através de transportadores na membrana das células que transportam a adenosina de dentro das células para o meio extracelular e é reconhecido por possuir propriedades anti-inflamatórias. A atividade da E-ADA baixa favorece um aumento da concentração de adenosina extracelular e assim, ela usaria de suas propriedades anti-inflamatórias para minimizar os danos.

Porém, o aumento da atividade da E-ADA no soro diminui a concentração de adenosina e, portanto, um efeito reverso acontece, o qual possivelmente favorece a inflamação nesses pacientes. Sugere-se então que a atividade da E-ADA tem um papel importante na patogênese da AR, e conseqüentemente, que sua atividade no soro possa predizer a atividade da doença.

Uma vez que essas enzimas atuam em cascata e constituem uma forma de manter a concentração ou levar a degradação de nucleotídeos extracelulares para hidrólise, pode-se sugerir que o aumento destas atividades reflete um aumento da degradação dos nucleotídeos mencionados como uma resposta compensatória orgânica desta patologia.

### Conclusões:

O modelo de AIA mostrou-se capaz de mimetizar um processo artrítico, no qual pode ser visto um aumento na atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA de ratos em comparação com o controle.

O aumento da atividade catalítica para o nucleotídeo ATP provavelmente está ligado ao extenso dano tecidual provocado pela patologia. Então, faz-se necessária sua degradação neste ambiente.

Por compensação, a atividade da enzima 5'-nucleotidase apresenta-se elevada para degradar o excesso de AMP formado pela enzima NTPDase formando adenosina, molécula com potencial anti-inflamatório, o qual não é de todo utilizado já que a enzima ADA com atividade elevada, nos ratos com artrite, provavelmente reduz a concentração deste nucleotídeo na corrente sanguínea.

A queda de adenosina, que tem por característica ser anti-inflamatória, pode ser o fator que leva a inflamações sistêmicas nos pacientes.

**Referências bibliográficas:**

- ASQUITH, D. L. et al. Autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 39, p.1991-2058, 2009.
- BECKER, V. L. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 1096-1100, 2010.
- BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5"-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 269-278, 2006.
- BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p.358-404, 2006.
- BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacol. Rev.**, v. 58, p. 58–86, 2006.
- CASTILHOS, L. G. et al. Effect of Uncaria tomentosa extract on purinergic enzyme activities in lymphocytes of rats submitted to experimental adjuvante arthritis model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 189, 2015.
- DETANICO, B. C. et al. Physiological level of norepinephrine increases adenine nucleotides hydrolysis in rat blood serum. **Purinergic Signalling**, v. 7, p. 373-379, 2011.
- DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, n.3, p.587-600, 2001.
- FÜRSTENAU, C. R. et al. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 41, p. 223-229, 2008.
- JAQUES, J.A.S. et al. Activities of enzymes adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochemistry & function**, v. 31 p, 395-399, 2012.
- JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201-212, 2011.
- KANNAN, K.; ORTMANN, R. A.; KIMPEL, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology**, v. 12, p. 167-181, 2005.
- LEAL, D.B. et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1746, n.2, p.129-134, 2005.
- McINNES, I.B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nature**, v.7. p, 429-442, 2007.
- McINNES, I. B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 23, p. 2205-2219, 2011.
- OLIVEIRA, P.G. et al. Subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant. **Clinical Experimental Medicine**, v.7, n.4, p.184-187, 2007.
- OSÉS, J. P. et al. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Life Sciences**, v. 74, p. 3275–3284, 2004.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signaling**, v. 2, p. 409–430, 2006.
- SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. **Cuidado e Manejo de Animais de Laboratório**. Brasil, 2009.
- SILVEIRA, K. L. et al. Free and nanoencapsulated vitamin D3: effects on E-NTPDase and E-ADA activities in an animal model with induced arthritis. **Cell Biochemistry and Function**, Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/cbf.3188, 2016.
- YEGUTKIN, G. G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673-694, 2008.
- ZIMMERMANN, H; ZEBISCH, M; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signaling**, v.8, n.3, p.437-502, 2012.