



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

**MEDIDA DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES E  
INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM  
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MARGARETE DULCE BAGATINI**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

**MEDIDA DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES E  
INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM  
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

**por**

**Margarete Dulce Bagatini**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**Orientadora: Vera Maria Morsch**  
**Co - orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger**

**SANTA MARIA, RS, BRASIL**

**2008**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de  
Mestrado

**MEDIDA DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES E INDICADORES  
DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM INFARTO AGUDO  
DO MIOCÁRDIO**

elaborada por  
**Margarete Dulce Bagatini**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**Comissão examinadora:**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vera Maria Morsch**  
(Presidente/Orientador)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marilise Escobar Bürger/UFSM**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maribel Antonello Rubin/UFSM**

Santa Maria, 07 de março de 2008

*“Sonhe como se fosse viver para sempre, viva como se fosse morrer amanhã.”*

*James Dean*

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais: Luiz e Vanisse*

*Aos meus irmãos: Márcia e Luciano*

*Ao meu namorado: Diogo*

*Pelo amor, carinho, apoio,*

*compreensão, companheirismo e*

*dedicação durante toda minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida.

A minha família pelo amor, apoio e carinho em todos os momentos.

À professora Vera, minha orientadora, por todos os ensinamentos, atenção e dedicação; a minha gratidão.

A minha co-orientadora, professora Maria Rosa, pela disponibilidade em me ajudar, contribuindo para a realização deste trabalho.

As alunas de iniciação científica Caroline e Cíntia, pela dedicação e companheirismo durante este trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório 2208, Rosélia, Roberta, Vanessa, Cinthia, Maísa, Paula, Rosilene, Denise, Lara, Naiara, Karen, Liési, Jucimara, Luciane, Jamile, Ahmed, Gustavo, Jessié... pelos momentos compartilhados e pela amizade durante o período de convívio.

Aos pacientes e seus familiares, que aceitaram participar deste projeto de pesquisa e compartilharam suas histórias de vida; meu muito obrigado.

Ao Dr. Romualdo e aos funcionários da UCI e do PA do HUSM, obrigada pela colaboração.

Aos professores e funcionários (em especial a Angélica e a Márcia) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, pelos ensinamentos, amizade e dedicação.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Aos amigos (em especial a Deise e a Sabrina) e todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### MEDIDA DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES E INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Autora: MARGARETE DULCE BAGATINI

Orientadora: VERA MARIA MORSCH

Co-Orientadora: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Data e local de Defesa: Santa Maria, 07 de março de 2008.

O Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. O principal mecanismo que leva ao IAM é a oclusão coronariana que ocorre quando uma placa aterosclerótica sofre fissura. Com o objetivo de reparação tecidual temos um aumento na agregação plaquetária e formação do trombo. Acompanhando o momento de isquemia e reperfusão que ocorre no IAM temos uma produção elevada de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Um desequilíbrio entre a produção e a degradação de EROs pode levar a geração de estresse oxidativo. Neste trabalho determinaram-se a atividade das enzimas envolvidas na tromboregulação: NTPDase e 5'-nucleotidase, e parâmetros de estresse oxidativo em pacientes que sofreram IAM e em pacientes controles. Foi realizada a avaliação do sistema oxidante através da determinação da peroxidação lipídica e da carbonilação protéica e a medida das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas do organismo, em plaquetas, sangue total, plasma e soro destes pacientes. Os resultados demonstraram um aumento na atividade da NTPDase, revelada através da hidrólise dos nucleotídeos ATP (54%) e ADP (45%), em pacientes com IAM quando comparados com o grupo controle. O mesmo ocorreu com a atividade da enzima 5'-nucleotidase. A hidrólise do AMP aumentou 46% nos pacientes com IAM em relação ao grupo controle. O aumento na atividade das ectonucleotidases pode estar relacionado a uma resposta orgânica compensatória do organismo frente ao estado patológico formado. Em relação aos níveis de oxidantes determinados, observou-se um aumento nos níveis de TBARS e proteína carbonil em soro de pacientes com IAM quando comparados com o grupo controle. Esse aumento também foi observado para as defesas antioxidantes enzimáticas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Entretanto, observou-se um decréscimo das defesas antioxidantes não enzimáticas como a vitamina C e a vitamina E no soro de pacientes com IAM. Estes dados sugerem um aumento do estresse oxidativo como resultado do momento de isquemia/reperfusão e da diminuição das defesas antioxidantes não enzimáticas. Além disso, o aumento das defesas antioxidantes enzimáticas poderiam agir como um mecanismo compensatório como consequência da superprodução de EROS após o IAM. Nenhuma interferência dos medicamentos utilizados no tratamento do IAM foram observadas sobre os parâmetros testados *in vitro*. Conclui-se então, que o IAM resulta tanto em danos oxidativos como mobilização das defesas do organismo para uma resposta compensatória.

Palavras chaves: Infarto Agudo do Miocárdio, NTPDase, 5'-Nucleotidase, Plaquetas, Estresse Oxidativo, Antioxidantes enzimáticos, Antioxidantes não enzimáticos.

**ABSTRACT**

Master Dissertation

Post-Graduate Program in Biological Sciences – Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil**MEASUREMENT OF ECTONUCLEOTIDASE ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS  
INDICATORS IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION PATIENTS**

Author: MARGARETE DULCE BAGATINI

Adviser: VERA MARIA MORSCH

Co-adviser: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Date and place of the defense: Santa Maria, March 7th, 2008.

Acute Myocardial Infarction (AMI) is one of the major public health problems in the world. Coronary occlusion, which occurs when an atherosclerotic plaque breaks, is the main mechanism that leads to AMI. With the objective of tissue reparation, there is an increase in platelet aggregation and thrombus formation. When ischemia/reperfusion occurs in AMI, Reactive Oxygen Species (ROS) are produced. The imbalance between ROS production and degradation may lead to an increase in oxidative stress. This study aimed to determine the activity of enzymes involved in thromboregulation, such as NTPDase and 5'-nucleotidase, as well as oxidative stress parameters. Evaluation of the oxidant system was carried out by lipid peroxidation and carbonyl protein determination, and the enzymatic and nonenzymatic antioxidant defense measurements were performed in platelets, total blood, plasma, and serum of AMI patients. The results demonstrated that an increase in the activity of NTPDase by ATP (54%) and ADP (45%) hydrolysis occurred in AMI patients when compared to the control group. The same occurred with 5'-nucleotidase activity. The hydrolysis of AMP increased 46% in AMI patients compared to the control group. The increase in ectonucleotidase activities could be related to a compensatory organic response to the pathologic state formed. Regarding oxidant levels, an increase in TBARS and carbonyl protein levels was observed in AMI patients when compared to the control group. The same occurred for the activities of the enzymatic antioxidants, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). However, a decrease in nonenzymatic antioxidants, such as vitamin C and vitamin E, was observed in AMI patients when compared to control. These results suggest an increase in oxidative stress in AMI, which was probably a result of the ischemic/reperfusion moment, as well as a decrease of antioxidant defenses. Furthermore, the increased antioxidant defense may act as a compensatory mechanism in consequence of the overproduction of ROS after AMI. No differences in the parameters tested were observed with the drugs utilized in AMI treatment *in vitro*. In conclusion, AMI results in oxidative damage as well as an increase in the organism's defenses as a compensatory response.

Key words: Acute Myocardial Infarction, NTPDase, 5'-Nucleotidase, Platelets, Oxidative stress, Enzymatic antioxidants, Nonenzymatic antioxidants.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 01 – Anatomia do coração.....	05
FIGURA 02 – Infarto Agudo do Miocárdio.....	06
FIGURA 03 – Eletrocardiograma representando elevação do segmento ST no IAM.....	11
FIGURA 04 – Representação de uma célula plaquetária.....	15
FIGURA 05 – Membros da família das NTPDases.....	18
FIGURA 06 – Topografia de membrana de ectonucleotídates.....	19
FIGURA 07 – Estrutura da 5'-nucleotidase ancorada a membrana.....	20
FIGURA 08 – Dano oxidativo a macromoléculas biológicas.....	22
FIGURA 09 – Mecanismo enzimático antioxidante.....	25
FIGURA 10 - Papel da GSHPx e GSH na decomposição do peróxido de hidrogênio.....	26

### MANUSCRITO I

FIGURE 1 - ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in platelets from Acute Myocardial Infarction (AMI) patients. Data are presented as means $\pm$ S.D. The symbol * represents statistical difference from the control group.....	49
--	----

### MANUSCRITO II

FIGURE 01 – Carbonil Protein content in serum of healthy control (CT), risk factors (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as means $\pm$ SEM nmol/mg protein. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: <sup>(b)</sup> $P < 0,02$ versus healthy control and <sup>(c)</sup> $P < 0,0001$ versus healthy control.....	78
--	----

- FIGURE 02 - TBARS levels in serum of healthy control (CT), risk factors (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as means  $\pm$  SEM nmol MDA/ml serum. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: (<sup>b</sup>)  $P < 0,03$  versus healthy control and (<sup>c</sup>)  $P < 0,0001$  versus healthy control.....79
- FIGURE 3 - Catalase activity in total blood of healthy control (CT), risk factors (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as means  $\pm$  SEM pmol/mg protein. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: (<sup>b</sup>)  $P < 0,001$  versus healthy control and (<sup>c</sup>)  $P < 0,0001$  versus healthy control.....80
- FIGURE 4 - Superoxide dismutase activity in total blood of healthy control (CT), risk factors (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as means  $\pm$  SEM U SOD/mg protein. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: (<sup>b</sup>)  $P < 0,03$  versus healthy control and (<sup>c</sup>)  $P < 0,0001$  versus healthy control.....81

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1 - Perfil de fatores de risco dos pacientes com IAM no Brasil e no mundo.....	08
---	----

### MANUSCRITO I

TABLE 1 - Clinical characteristics and biochemical determinations in Acute Myocardial Infarction (AMI) patients.....	47
TABLE 2 - In vitro effect of acetylsalicylic acid and clopidogrel on ATP, ADP and AMP hydrolysis in platelets of healthy subjects.....	48

### MANUSCRITO II

TABLE 1 - Clinical characteristics and cardiac biomarkers of healthy group, group with risk factors and Acute Myocardial Infarction (AMI) patients.....	76
TABLE 2 - Comparison of nonenzymatic antioxidants levels between Acute Myocardial Infarction (AMI) patients, group with risk factors and healthy control group (means $\pm$ SEM).....	77

## LISTA DE ABREVIações

AAS - Ácido Acetilsalicílico

ADP- Adenosina Difosfato

AMP- Adenosina Monofosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

CAT- Catalase

DAC – Doença Arterial Coronariana

DTNB – Ácido 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico

DNPH - Dinitrofenilidrazina

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GSH – Glutationa Reduzida

GSHPx – Glutationa Peroxidase

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

MDA – Malondialdeído

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

SH – Grupos Sulfidrilas

SOD – Superóxido Dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloroacético

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b> - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	113
<b>ANEXO B</b> - Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética.....	115

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES</b> .....	xii
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	xiii
<b>SUMÁRIO</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1. <b>Objetivos</b> .....	04
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	05
2.1. <b>Coração</b> .....	05
2.2. <b>Infarto Agudo do Miocárdio</b> .....	06
2.2.1. <b>Aterosclerose</b> .....	07
2.2.2 <b>Epidemiologia</b> .....	07
2.2.3 <b>Fatores de Risco</b> .....	08
2.2.4 <b>Diagnóstico</b> .....	10
2.2.5 <b>Tratamento Farmacológico</b> .....	12
2.3. <b>Plaquetas</b> .....	14
2.3.1 <b>Estrutura</b> .....	14
2.3.3 <b>Ativação plaquetária</b> .....	15
2.3.4 <b>Agregação plaquetária</b> .....	16
2.3.5 <b>Hemostasia</b> .....	16

<b>2.4. Nucleotídeos de Adenina</b> .....	16
<b>2.5. Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina</b> .....	17
2.5.1 NTPDase.....	18
2.5.2. 5'-Nucleotidase.....	19
<b>2.6. Estresse Oxidativo</b> .....	21
2.6.1 Indicadores pró-oxidantes.....	22
2.6.1.1 Lipoperoxidação.....	22
2.6.1.2 Oxidação protéica .....	23
2.6.2 Defesas Antioxidantes.....	24
2.6.2.1 Antioxidantes enzimáticos.....	24
2.6.2.2 Antioxidantes não-enzimáticos.....	25
<b>3. MANUSCRITOS</b> .....	29
<b>3.1. MANUSCRITO I: Hydrolisys of Adenine Nucleotides in Platelets from Acute Myocardial Infarction Patients</b> .....	30
<b>3.2. MANUSCRITO II: Oxidative Stress versus Antioxidants Defenses in Patients with Acute Myocardial Infarction</b> .....	51
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	83
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	88
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	89
<b>7. ANEXOS</b> .....	113

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos, os quais se encontram no item Manuscritos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos contidos neste trabalho.

As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão de Literatura, Discussão e Conclusões desta dissertação.

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Manuscrito I – Clinical Biochemistry

Manuscrito II – Biomedicine & Pharmacotherapy



## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares continuam sendo a primeira causa de morte no Brasil, sendo responsáveis por quase 32% de todos os óbitos no país, representando a terceira maior causa de internação (GUIMARÃES et al., 2006). Dentre estas destaca-se o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), que corresponde à lesão e a necrose celular irreversíveis em consequência da isquemia prolongada. Em geral, o IAM ocorre quando o fluxo sanguíneo coronariano diminui abruptamente depois da obstrução trombótica de uma artéria coronária previamente afetada pela aterosclerose (KASPER et al., 2006).

A aterosclerose é um processo dinâmico, evolutivo, iniciado a partir de dano endotelial de origem multifatorial, com características de reparação tecidual (ROSS, 1999). É uma doença inflamatória que está associada com a ativação da célula endotelial, com o estresse oxidativo e com o acúmulo de leucócitos e plaquetas nas paredes das artérias (HANSSON et al., 1991; SAKAI et al., 1997).

Na maioria dos casos, o IAM ocorre quando uma placa aterosclerótica sofre fissura, ruptura ou ulceração, de modo que um trombo forma-se na área de ruptura e leva à oclusão da artéria coronária. Após a formação inicial de uma monocamada de plaquetas no local da placa rota, vários agonistas (como o ADP) promovem a ativação plaquetária. Imediatamente, têm-se agregação das plaquetas e ativação da cascata de coagulação, que levam à formação do trombo (KASPER et al., 2006).

As plaquetas são um dos mais importantes componentes do sangue que participam na regulação da formação do trombo por liberação de substâncias ativas como o ADP (ALTMAN et al., 1995). É bem conhecido que concentrações micromolares de ADP são suficientes para induzir a agregação plaquetária, enquanto a adenosina (o produto final da hidrólise do ATP) pode inibir a agregação plaquetária (BAKKER et al., 1994). O ATP é considerado um inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP, embora evidências indiquem a existência de mecanismos não competitivos e demonstrem que o ATP em altas ou baixas concentrações modula diferentemente a agregação plaquetária (LÉON et al., 1997).

Vários estudos têm relatado o envolvimento das ectonucleotidases no processo de formação do trombo. As nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases (NTPDases) são uma família de ectonucleotidases, responsáveis pela hidrólise dos

nucleotídeos ATP e ADP, formando AMP, que será metabolizado pela enzima 5'-nucleotidase, formando a adenosina (SÉVIGNY et al., 2002). As enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase estão localizadas na membrana de plaquetas e exercem uma importante função na regulação do fluxo sanguíneo coronário e na trombogênese, através da regulação do catabolismo do ADP (MARCUS et al., 2003). Pode-se prever a importância dessas enzimas na trombo-regulação, já que os nucleotídeos ATP, ADP e o nucleosídeo adenosina são responsáveis pela regulação do tônus vascular e da função plaquetária (PILLA et al., 1996). Além disso, estudos realizados em nosso laboratório revelam o envolvimento das ectonucleotidases em patologias como diabetes e hipertensão (LUNKES et al., 2003), câncer (ARAÚJO et al., 2005), insuficiência renal crônica (SILVA et al. 2005), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2007), entre outras.

O infarto é secundário à oclusão coronariana, seguido por uma fase de isquemia e reperfusão (TOPOL, 2000). Nessa fase Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são produzidas (ESPAT & NELTON, 2000). A alta produção de EROs é responsável por várias ações deletérias, tais como aumento nos níveis de peroxidação de lipídios de membranas (ALESSIO, 1993), aumento na carbonilação de proteínas (DONNE et al., 2003) e até danos ao DNA (RADAK et al., 1999), o que em última instância altera e prejudica o metabolismo intracelular, podendo inclusive causar morte celular (MANOHARAN et al., 2004).

As proteínas são as primeiras moléculas biológicas a sofrer com a produção excessiva de EROs. A carbonilação protéica parece ser um fenômeno comum durante a oxidação e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão da modificação oxidativa (DONNE et al., 2003).

O aumento da peroxidação lipídica é uma consequência do estresse oxidativo o qual ocorre quando o balanço dinâmico entre o mecanismo pró-oxidante e antioxidante está em desequilíbrio (DHALLA et al., 2000).

Entretanto, o organismo possui vários sistemas de defesa antioxidante que atuam na detoxificação das EROs de formas diferenciadas. Há evidências que enzimas antioxidantes como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) podem proteger contra EROs que são produzidos durante o IAM (BOVERIS & CADENAS, 1997). O balanço entre a atividade da SOD e da CAT nas células é de fundamental importância na determinação do equilíbrio dos níveis de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. A SOD elimina radicais superóxidos por conversão desses

em peróxido de hidrogênio que podem ser transformados pela atividade da enzima CAT (MCCORD & FRIDOVICH, 1969; FARBER, 1990; MATTES, 2000).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, possuem grande relevância os antioxidantes não enzimáticos. Dentre estes antioxidantes podemos citar as vitaminas E, C e os compostos orgânicos contendo grupos sulfidril (SH), denominados tióis. A glutathiona reduzida (GSH) é um tiol de baixo peso molecular que se encontra no interior celular, sendo um tripeptídeo importante na proteção contra o dano oxidativo (SHAN et al., 1990).

A vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar limitando a lipoperoxidação (DELANTY et al., 1997). Outro mecanismo proposto para a vitamina E é sua ação na inibição da oxidação da LDL, prevenindo assim o desenvolvimento de lesão aterosclerótica (MOSCA et al., 1997). Somando-se às ações da vitamina E, o ácido ascórbico ou vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que tem a habilidade de regenerar  $\alpha$ -tocoferóis (FREI et al., 1989; CHAN, 1993) e neutralizar diretamente as EROs (ROSS & MOLDEUS, 1991).

Baseado no exposto acima e devido à alta incidência de IAM nos dias atuais, é de grande interesse clínico e científico a avaliação da atividade das ectonucleotidases e dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com diagnóstico de IAM.

## 1.1 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Medir a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase e avaliar parâmetros de estresse oxidativo e defesas antioxidantes, envolvidas no Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) em pacientes infartados provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas desses pacientes.
- Determinar os indicadores do estresse oxidativo (TBARS e carbonilação protéica) em soro da população estudada.
- Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas (SOD e CAT) e não enzimáticas (tióis não-protéicos, vitamina E e vitamina C) em sangue total, plasma e soro, desses pacientes.
- Verificar a influência dos medicamentos, utilizados no tratamento de pacientes com IAM, *in vitro* sobre as atividades da NTPDase, 5'-nucleotidase e nos indicadores do estresse oxidativo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Coração

O coração é um órgão muscular oco que se localiza no meio do peito, sob o osso esterno, ligeiramente deslocado para a esquerda. Em uma pessoa adulta, tem o tamanho aproximado de um punho fechado e pesa cerca de 400 gramas. O coração humano, como o dos demais mamíferos, apresenta quatro cavidades: duas superiores, denominadas átrios (ou aurículas) e duas inferiores, denominadas ventrículos. O átrio direito comunica-se com o ventrículo direito através da válvula tricúspide. O átrio esquerdo, por sua vez, comunica-se com o ventrículo esquerdo através da válvula bicúspide ou mitral. O coração bombeia o sangue para levar oxigênio e nutrientes às células do organismo de um lado, e, de outro, para o pulmão, que eliminará gás carbônico recebido das células. Funciona, portanto, como duas bombas em paralelo: uma bombeia sangue pobre em oxigênio e rico em gás carbônico do corpo para os pulmões; a outra, bombeia sangue rico em oxigênio e pobre em gás carbônico dos pulmões para o corpo. Para funcionar adequadamente, as células musculares do coração necessitam de nutrientes e oxigênio que chegam pelo sangue que ele próprio bombeia. A irrigação do coração é feita pelas artérias coronárias (CASTRO,1985) (Figura 1).

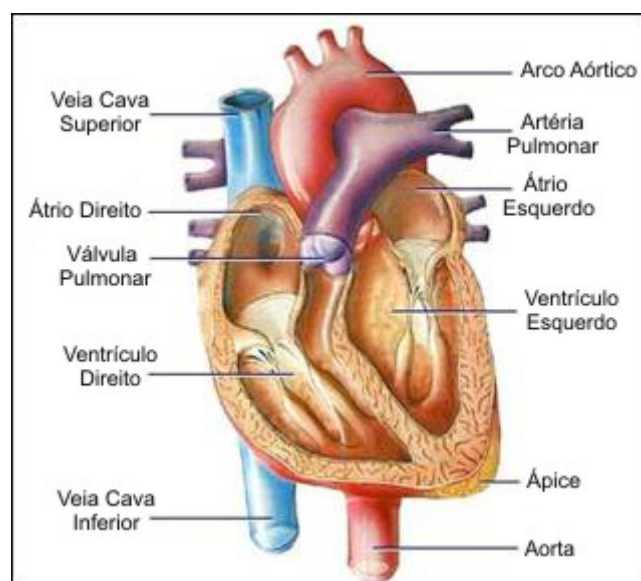


Figura 1- Anatomia do Coração (www.heart-vessels.com)

## 2.2 Infarto Agudo do Miocárdio

Em geral, o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), ocorre quando o fluxo sanguíneo coronário diminui abruptamente depois da obstrução trombótica de uma artéria coronária previamente afetada pela aterosclerose. Na maioria dos casos, o infarto ocorre quando uma placa aterosclerótica sofre fissura, ruptura ou ulceração, de modo que um trombo forma-se na área de ruptura e leva à obstrução da artéria coronária (KASPER et al., 2006). Após a formação inicial de uma monocamada de plaquetas no local da placa rota, vários agonistas (colágeno, ADP, epinefrina, serotonina) promovem a ativação plaquetária, produção e liberação de tromboxano  $A_2$ . A ativação plaquetária pelos agonistas desencadeia uma alteração da conformação da glicoproteína IIb/IIIa que desenvolve alta afinidade pelo fator de von Willebrand (FvW) e fibrinogênio. A cascata de coagulação é ativada e por fim, a artéria coronária afetada torna-se ocluída por um trombo contendo agregados plaquetários e filamentos de fibrina (AZZAZY & CHRISTENSON, 2002; SHEBUSKI, 2002; APPLE et al., 2005; WU, 2005; KASPER et al., 2006) (Figura 2).

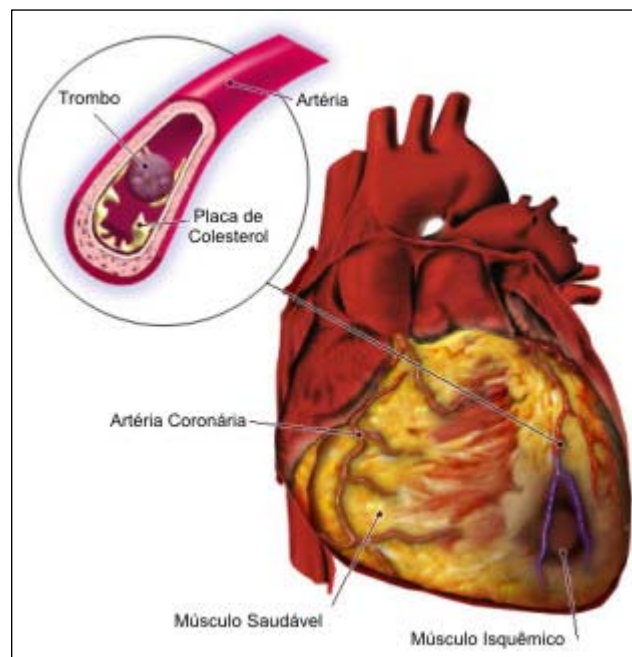


Figura 2 – Infarto Agudo do Miocárdio ([www.medicinenet.com](http://www.medicinenet.com))

### 2.2.1 Aterosclerose

A aterosclerose é um processo dinâmico, evolutivo, iniciado a partir de dano endotelial de origem multifatorial, com características de reparação tecidual (ROSS, 1999). É uma doença inflamatória que está associada com a ativação da célula endotelial, com o estresse oxidativo e com o acúmulo de leucócitos e plaquetas nas paredes das artérias (HANSSON et al., 1991; SAKAI et al., 1997).

A aterosclerose é a principal causa de morte e incapacidade nos países desenvolvidos. Embora alguns fatores de risco generalizados ou sistêmicos predisponham ao seu aparecimento, a aterosclerose afeta várias regiões da circulação e gera manifestações clínicas distintas de acordo com o leito circulatório afetado. A aterosclerose das artérias coronárias geralmente causa IAM (KASPER et al., 2006).

### 2.2.2 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade e incapacidade no Brasil e no mundo (LOPEZ, 1993; MURRAY et al., 1996). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2002 ocorreram 16,7 milhões de óbitos, dos quais 7,2 milhões foram de Doença Arterial Coronariana (DAC) (GUIMARÃES, 2006). Estima-se para 2020, que esse número possa se elevar a valores entre 35 e 40 milhões (GUIMARÃES, 2006). Seu crescimento acelerado em países em desenvolvimento representa uma das questões de saúde pública mais relevantes do momento.

O Brasil desde a década de 40 vem passando por um processo de inversão das curvas de morbidade e mortalidade em que se observa um declínio por doenças infecciosas e um concomitante aumento na mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis. Esse processo chamado de fenômeno da transição epidemiológica ocorreu em todos os países hoje desenvolvidos onde a população de idosos é cada vez mais expressiva. O IAM, no Brasil, foi responsável em 1996 por 22,4% dos óbitos. Em 1999 dos 76.310 óbitos por DAC, 75,6% foram por IAM (LESSA, 2003).

Nos Estados Unidos, anualmente, 650.000 pacientes sofrem IAM novo e 450.000, IAM recorrente. A taxa de mortalidade precoce (30 dias) do IAM é de cerca

de 30%, com mais da metade dessas mortes ocorrendo antes que o paciente infartado chegue ao hospital (KASPER et al., 2006).

### 2.2.3 Fatores de risco

Considerando o IAM um estado de emergência, a identificação e o tratamento efetivo dos principais fatores de risco podem desempenhar um importante papel na sua prevenção. Os fatores de risco para IAM são múltiplos e combinados, refletindo a heterogeneidade da doença. Esses variam desde os mais clássicos como sexo, idade, tabagismo, níveis elevados da lipoproteína de baixa densidade (LDL), diabetes mellitus, hipertensão, história familiar de DAC, obesidade, sedentarismo, ingestão de álcool, até os descobertos recentemente como alterações congênitas, lúpus eritematoso sistêmico, entre outros.

Um dos mais importantes estudos sobre fatores de risco e IAM no Brasil, foi o estudo “Avaliação dos Fatores de Risco para Infarto Agudo do Miocárdio no Brasil” (AFIMAR) (PIEGAS et al., 2003). Esse foi um estudo caso-controle, de base hospitalar, planejado para avaliar a associação de fatores de risco convencionais e primeiro IAM na população brasileira. A análise multivariada demonstrou os seguintes fatores como de risco independentes para o IAM (Tabela1):

Tabela 1 - Perfil de fatores de risco dos pacientes com IAM no Brasil e no mundo.

Váriavel	Brasil	Mundo
Número de pacientes	1.027	12.985
Idade mediana	61 anos	65 anos
Sexo masculino	726 (71%)	9.184 (71%)
Tabagismo	62%	62%
Hipertensão	58%	52%
Dislipidemia	31%	37%
<i>Diabetes mellitus</i>	22%	21%

Fonte: Guimarães, 2006

### Sexo e idade



Vários estudos têm demonstrado que a taxa de mortalidade por IAM é maior nos homens e nos indivíduos idosos do que em mulheres (DOUGLAS et al., 1991; SHAROVISKY & CÉZAR, 2002). As possíveis razões para o aumento do risco de doenças cardiovasculares com a idade incluem imobilidade, trauma, obesidade, cirurgias médicas, doenças crônicas, aterosclerose, pressão alta, dislipidemia, intolerância a glicose, aumento dos marcadores inflamatórios no sangue, terapia com estrógenos e câncer (GORDON, 2004).

### **Tabagismo**

O tabagismo associa-se a maior morbidade e mortalidade por doença coronariana aterosclerótica (KANDEL & HIGGINS, 1990), o que advém dos múltiplos efeitos deletérios causados pelo tabagismo nos mecanismos de aterogênese e trombose (SAHGER et al., 1995). Na formação e na evolução da placa aterosclerótica, o tabagismo é capaz de produzir lesões endoteliais de forma direta, levando a maior oxidação da LDL e reduzindo a produção de HDL (KASPER et al., 2006).

### **Hipertensão**

A hipertensão é um dos principais fatores de riscos para DAC, independentemente de idade, sexo ou raça. A pressão arterial sangüínea, (tanto a sistólica quanto a diastólica), está correlacionada com a incidência de doenças cardíacas e acidente vascular cerebral. Tem sido postulado que a pressão sangüínea excessivamente alta poderia danificar o endotélio e aumentar a permeabilidade do mesmo. Em adição, a hipertensão poderia estimular a proliferação de células musculares ou induzir a ruptura de placas ateroscleróticas. A presença de lesão em órgãos como o coração é acompanhado de um aumento do risco de doenças cardíacas (LAHOZ & MOSTAZA, 2007). Numerosas triagens clínicas têm demonstrado que um decréscimo na pressão arterial sistêmica está associado com uma redução significativa na incidência de acidente cerebral vascular e eventos cardíacos (NEAL et al., 2000).

## **Hipercolesterolemia**

A hipercolesterolemia é amplamente aceita como um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doença isquêmica cardíaca, angina e IAM (TAILOR & GRANGER, 2003; AL-SHAER et al., 2004; VIEIRA, 2005; BHATT et al., 2006). Estudos indicam que altos níveis de colesterol, principalmente da LDL, desempenham um papel importante na aterogênese. As distorções no transporte do colesterol podem favorecer seu depósito na parede das artérias e vasos, contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose (DIETSCHY et al., 1993; ECKARDSTEIN et al., 2001). A aterosclerose é um processo inflamatório que está associado com a ativação de células endoteliais, com o estresse oxidativo e com o acúmulo de leucócitos na parede das artérias (HANSSON et al., 1991; SAKAI et al., 1997; ROSS, 1999; LIBBY, 2000).

## ***Diabetes Mellitus***

Em relação ao *Diabetes Mellitus*, esse se constitui um importante fator para o desenvolvimento de doença cardiovascular, por interagir com outros fatores, como hipertensão e hiperlipidemia, os quais potencializam o risco. Além disso, pacientes com diabetes são conhecidos por ter alta propensão a doenças ateroscleróticas, uma das principais causas de IAM (KIP et al., 1996). O mecanismo pelo qual o diabetes aumenta o risco de doenças cardiovasculares não está totalmente entendido, mas estudos indicam que a hiperglicemia e o estado patológico criado no diabetes seriam os responsáveis pelo aumento do risco de doenças coronárias (TSCHOEPE et al., 1993; NATHAN et al., 2003).

### **2.2.4 Diagnóstico**

O diagnóstico de IAM é baseado nas manifestações clínicas apresentadas pelo paciente, mudanças no eletrocardiograma e elevações dos biomarcadores cardíacos séricos (KASPER et al., 2006).

A dor é a queixa mais comum dos pacientes com IAM. Ela é profunda e visceral; os termos comumente usados para descrevê-la são: peso, aperto, pressão, porém às vezes descrita como lascinante ou em queimação. Tipicamente, ocorre na parte central do tórax e/ou epigástrico e pode irradiar-se para os braços. Com frequência é acompanhada de fraqueza, sudorese, náuseas, vômitos e ansiedade (BERTRAND et al., 2002; VAN et al., 2003). Outras apresentações menos comuns, com ou sem dor, são perda súbita da consciência, estado confusional, sensação de fraqueza extrema, aparecimento de arritmia, evidências de embolia periférica ou apenas queda inexplicada da pressão (KASPER et al., 2006).

O exame eletrocardiográfico é a principal ferramenta, ao lado da história clínica, no diagnóstico e avaliação prognóstica do paciente com dor torácica sugestiva de IAM. Um eletrocardiograma inicial com supradesnivelamento do segmento ST (Figura 3) maior ou igual a 1 mm em duas derivações contíguas, define com alta probabilidade o diagnóstico de IAM. Em pacientes com sintomas sugestivos, a elevação do segmento ST tem especificidade de 91% e sensibilidade de 46% para diagnóstico de IAM. A mortalidade aumenta com o número de derivações no eletrocardiograma com supradesnível de ST (SAVONITTO et al., 1999; BERTRAND et al., 2002; BRAUNWALD et al., 2002;). O exame eletrocardiográfico deve ser repetido após a terapêutica inicial, 12h após a internação e diariamente até alta da unidade coronariana.

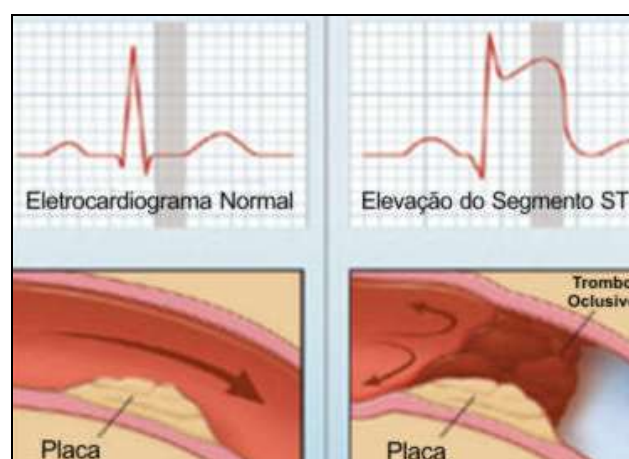


Figura 3- Eletrocardiograma representando elevação do segmento ST no IAM (Keeley & Hillis, 2007).

Certas proteínas, denominadas marcadores cardíacos séricos, são liberadas no sangue em grandes quantidades, pelo miocárdio necrótico após o IAM. As taxas

de liberação das diferentes proteínas variam segundo a sua localização intracelular e o seu peso molecular, bem como com o fluxo sanguíneo e linfático local (STEFANINI et al., 2004).

A creatinofosfocinase (CK-total) encontrada na forma de dímero é uma importante enzima reguladora da produção e da utilização do fosfato de alta energia nos tecidos contráteis. Embora seja um indicador sensível de lesão muscular, não é específico para o diagnóstico de lesão miocárdica. Os resultados anormais da atividade e da concentração da CK-total podem ocorrer em razão de: problemas intrínsecos aos testes laboratoriais; doenças associadas, que diminuem a depuração de proteínas; liberação de tecidos necróticos contendo níveis elevados da enzima; presença de lesões musculares agudas e crônicas; e uso de medicamentos e drogas ilícitas (WU, 1998).

A isoenzima MB da CK é mais vantajosa que a CK-total, pois não é encontrada em concentrações significativas nos tecidos não-cardíacos. A CK-MB eleva-se em 4 a 6h após o início dos sintomas, com pico em torno de 18h, e normaliza-se entre 48 e 72h. Esta enzima permite o diagnóstico tardio do IAM, após 12h do início dos sintomas, quando possui sensibilidade de cerca de 93%, porém é pouco sensível para o diagnóstico precoce nas primeiras 6h do início dos sintomas (ADAMS et al., 1993).

As troponinas (T e I) específicas do coração são atualmente consideradas os marcadores ouro para o IAM (ALPERT et al., 2000; BABUIN & JAFFE, 2005). Devido às troponinas específicas do coração possuírem seqüências de aminoácidos diferentes das que são encontradas no músculo esquelético, permitiram o desenvolvimento de ensaios quantitativos com anticorpos monoclonais altamente específicos, o que as torna os principais marcadores para o IAM, com alta especificidade e sensibilidade (KASPER et al., 2006). As troponinas elevam-se entre 4 e 8h após o início dos sintomas, com pico entre 36 e 72h e normalização entre 5 e 14 dias. Apresentam a mesma sensibilidade diagnóstica da CK-MB entre 12 e 48h após o início dos sintomas do IAM (BLUESTEIN et al., 1998; APPLE, 1992).

### **2.2.5 Tratamento farmacológico**

O uso dos agentes antiplaquetários e antitrombóticos durante a fase inicial do IAM, baseia-se em amplas evidências clínicas e laboratoriais indicativas de que a trombose desempenha um papel importante na patogenia desta doença. O objetivo principal do tratamento com antiplaquetários e antitrombóticos é estabelecer e manter a perviedade da artéria relacionada com o infarto. O grau em que o tratamento antiplaquetário atinge essas metas determina, em parte, a eficácia com que reduz o risco de mortalidade associada ao IAM (KASPER et al., 2006). As drogas antiplaquetárias mais comumente utilizadas são o ácido acetilsalicílico (AAS) e o clopidogrel (KAM & NETHERY, 2003; KASPER et al., 2006).

### **Ácido Acetilsalicílico (AAS)**

O AAS interfere no metabolismo dos prostanóides cíclicos pela inibição irreversível da ciclooxigenase (COX), a qual é uma enzima chave na síntese do tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). O TXA<sub>2</sub> é uma substância com potentes propriedades protrombóticas e vasoconstritoras (AWTRY & LOSCALZO, 2000; BHATT & TOPOL, 2002). A evidência mais convincente de benefício do tratamento antiplaquetário com ácido acetilsalicílico em pacientes com IAM foi demonstrada em uma abrangente revisão publicada no Antiplatelet Trialists' Colaboration (2002). Os dados referentes a quase 20.000 pacientes com IAM incluídos em 15 estudos randomizados foram reunidos e demonstraram redução relativa de 27% na taxa de mortalidade naqueles pacientes tratados com AAS.

### **Clopidogrel**

O clopidogrel é uma potente droga antiplaquetária pertencente à classe das tienopiridinas. Este composto inibe seletivamente a agregação plaquetária induzida pelo ADP e outros agonistas por se ligar aos receptores purinérgicos do tipo P2Y<sub>12</sub> e conseqüentemente decrescer a ativação da glicoproteína IIb/IIIa (HERBET et al., 1999; QUINN & FITZGERALD, 1999; SAVI et al., 2001). A eficácia do clopidogrel foi verificada na triagem clínica: Clopidogrel versus Aspirina em Pacientes com Risco de Eventos Isquêmicos (CAPRIE, 1996). Esse estudo revelou que o tratamento com

clopidogrel foi mais efetivo do que o tratamento com AAS em pacientes com uma história positiva de IAM, ou acidente vascular cerebral. Alguns estudos demonstram que o clopidogrel pode ser visto como uma alternativa ao tratamento com AAS, em especial naqueles pacientes resistentes ou intolerantes ao AAS (QUINN & FITZGERALD, 1999; CAVUSOGLU et al., 2003). O tratamento de modelos animais de trombose com uma combinação de AAS e clopidogrel sugere ser uma estratégia antitrombótica mais efetiva do que uma terapêutica isolada (HERBERT et al., 1996; HARKER et al., 1998; HERBERT et al., 1998). O mesmo ocorre para o tratamento de pacientes com síndrome coronariana aguda em que a associação de AAS mais clopidogrel mostrou eficácia superior ao tratamento com AAS sozinho (CURE, 2001).

## 2.3 Plaquetas

### 2.3.1 Estrutura

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariócitos, envolvidos por membranas e destituídas de núcleo. Apresentam-se heterogêneas sob aspecto morfológico, considerando tamanho, densidade e coloração (LEE et al. 1998). Ao microscópio eletrônico, as plaquetas apresentam-se como esferóides achatados nos pólos. Em condições normais e em esfregaços sangüíneos, as plaquetas apresentam-se discóides (BATLOUNI, 1993).

Nas plaquetas se reconhecem três zonas: (1) zona externa ou periférica que condiciona a propriedade de adesão. Nessa porção encontram-se antígenos, glicoproteínas e vários tipos de enzimas. Mais internamente existe a membrana plaquetária, onde estão localizadas glicoproteínas que são receptores específicos para determinados fatores de coagulação. (2) Uma zona sol-gel ou citosol com proteínas actinmiosina e tubulina, formando microtúbulos e microfilamentos, responsáveis pelo esqueleto da plaqueta. (3) Uma zona de organelas contendo corpúsculos densos ( $Ca^{2+}$ , ADP, ATP, Serotonina, Pirofosfato), grânulos alfa (fatores de crescimento, fatores de coagulação e proteínas de adesão) e um sistema de membrana, local de síntese de prostaglandinas e tromboxano  $A_2$  (LORENZI et al., 2003).

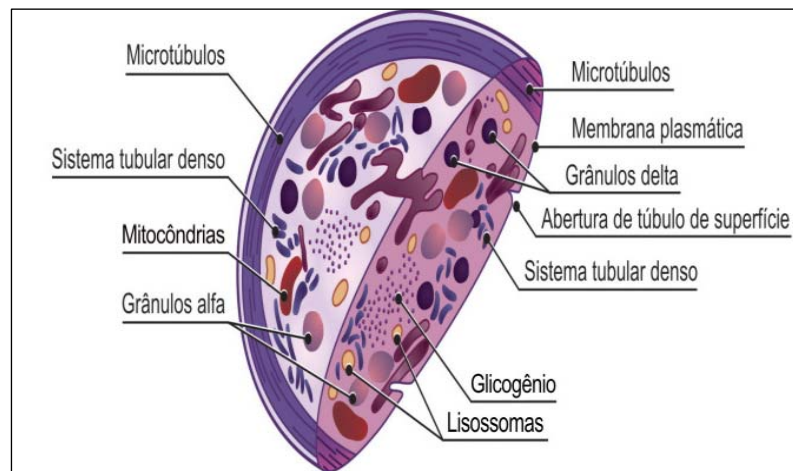


Figura 5: Representação de uma célula plaquetária.

### 2.3.2 Ativação plaquetária

As plaquetas são liberadas do citoplasma dos megacariócitos medulares e passam à circulação, onde têm vida média de 8 a 10 dias. Durante esse tempo de sobrevivência, o seu metabolismo se baseia na liberação de energia, representada pela transformação do ATP em ADP, a partir da glicólise e do mecanismo oxidativo das mitocôndrias. Essa energia é utilizada para as funções básicas das plaquetas, que são a adesão, a agregação e a secreção de substâncias contidas nos grânulos citoplasmáticos (LORENZI et al., 2003).

Quando um vaso é lesado, o subendotélio, com o colágeno subjacente, é exposto e as plaquetas se ativam, iniciando-se uma série de fenômenos que tem por finalidade evitar a hemorragia (LORENZI et al., 2003). O primeiro sinal de ativação plaquetária é sentido na membrana externa, onde os fatores capazes de promover esta ativação como a trombina, a adrenalina, o colágeno e o ADP se ligam aos seus receptores específicos. A plaqueta modifica a sua forma que passa de discóide a irregular devido à emissão de pseudópodos a partir da membrana. A seguir, ocorre a ligação das plaquetas aos receptores das glicoproteínas e ativação das moléculas de integrinas plaquetárias levando ao processo de agregação plaquetária (LEE et al., 1998; LORENZI et al., 2003).

### 2.3.3 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária ocorre devido à formação de pontes de fibrinogênio, pois este se liga ao receptor na membrana plaquetária, GP IIb/IIIa, que na presença do  $\text{Ca}^{2+}$  forma um complexo estável na superfície das plaquetas ativadas. Essa também ocorre devido ao metabolismo do ácido araquidônico, sendo o mesmo liberado a partir da membrana fosfolipídica das plaquetas pela ativação da enzima fosfolipase  $A_2$  e, subseqüentemente, a enzima cicloxigenase (COX-1) converte o ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos. Esses são então convertidos pela tromboxano sintetase em tromboxano  $A_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), funcionando como um potente agonista que induz a agregação (LEE et al., 1998; ANDREWS et al., 1999; BECKER, 1999; GAETANO, 2001). A amplificação e propagação contínua da agregação plaquetária é ativada pela formação de agregados plaquetários e a expulsão de ADP e de outras substâncias ativas das organelas plaquetárias (LEE et al., 1998).

### 2.3.4 Hemostasia

A principal função das plaquetas é a hemostasia, na qual elas desempenham atividade mecânica e bioquímica. As plaquetas aderem-se as estruturas subendoteliais expostas e tornam-se ativadas; ocorrendo a adesão plaquetária. Posteriormente, ocorre uma intensa atividade metabólica, havendo a síntese de mensageiros intracelulares e formação de agonistas plaquetários. Na seqüência as plaquetas sofrem transformações morfológicas, iniciando a formação de agregados plaquetários também denominados de rolhas, que vão constituir a barreira plaquetária inicial. A liberação de ADP e outras substâncias ativas amplificam o processo de ativação plaquetária. Segue-se a ativação com a liberação do fator 3 plaquetário e tem início o processo de coagulação sangüínea, promovendo à consolidação da rolha plaquetária pela fibrina e a conseqüente retração do coágulo (LEE et al., 1998; LORENZI et al., 2003; RAMASAMY, 2004; DAVÍ & PATRONO, 2007).

### 2.4 Nucleotídeos de adenina



Os nucleotídeos extracelulares tais como o ATP, o ADP, e o UTP estão presentes nos fluídos extracelulares em baixas quantidades (micromolares) devido a vários mecanismos como: lise celular, permeabilidade seletiva da membrana plasmática e exocitose de vesículas secretoras como os corpos densos plaquetários (ENJYOJI et al., 1999; ZIMMERMANN, 2001).

A adenosina extracelular e os derivados da adenina são moduladores do tônus vascular e da função plaquetária (COADE & PEARSON, 1989). É bem conhecido que concentrações micromolares de ADP são suficientes para induzir a agregação plaquetária, enquanto a adenosina (o produto final da hidrólise do ATP) pode inibir a agregação plaquetária (KITAKAZE et al., 1991; BAKKER et al., 1994; ZIMMERMANN, 1999). O ATP é considerado um inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP, embora evidências indiquem a existência de mecanismos não competitivos e demonstrem que o ATP em altas ou baixas concentrações modula diferentemente a agregação plaquetária (LEON et al. 1997; SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997; BIRK et al., 2002; REMIJIN et al., 2002; ROZALSKI et al., 2005).

A adenosina também apresenta uma ação cardioprotetora em episódios de isquemia ou hipóxia (MINAMINO et al., 1996). A função protetora da adenosina se manifesta pela vasodilatação coronariana e de vasos colaterais, aumentando o suprimento de oxigênio para os tecidos. Além disso, a adenosina é um ativador endógeno do sistema de enzimas antioxidantes durante os processos de injúria e isquemia celular (MAGGIRWAR et al., 1994; RAMKUMAR et al., 1995).

A adenosina é conhecida por ser cardioprotetora não somente nos momentos de isquemia/reperfusão, mas também na insuficiência cardíaca, atenuando a liberação de catecolaminas, aumentando o fluxo sanguíneo coronário e inibindo a ativação de plaquetas e leucócitos (KINUGAWA et al., 2006).

## **2.5 Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina - ECTONUCLEOTIDASES**

Os nucleotídeos de adenina extracelulares são hidrolisados por enzimas conhecidas como ectonucleotidasas. Dentre estas se destacam a NTPDase (apirase, nucleosídeo trifosfohidrolase, ATP difosfohidrolase) e a 5'-nucleotidase, duas

enzimas capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como ATP, ADP e AMP a seus receptores específicos (ZIMMERMANN, 2001).

### 2.5.1 NTPDases

NTPDases (Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) é o termo genérico para designar uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001). Oito membros desta família já foram identificados (Figura 6) e diferem quanto à especificidade ao substrato, distribuição tecidual e localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; BIOGENESE et al., 2004). Quatro das NTPDases são enzimas tipicamente localizadas na membrana celular com um sítio catalítico na face extracelular (NTPDase 1, 2, 3 e 8) e quatro delas exibem localização intracelular (NTPDases 4, 5, 6 e 7) (ROBSON et al., 2006).

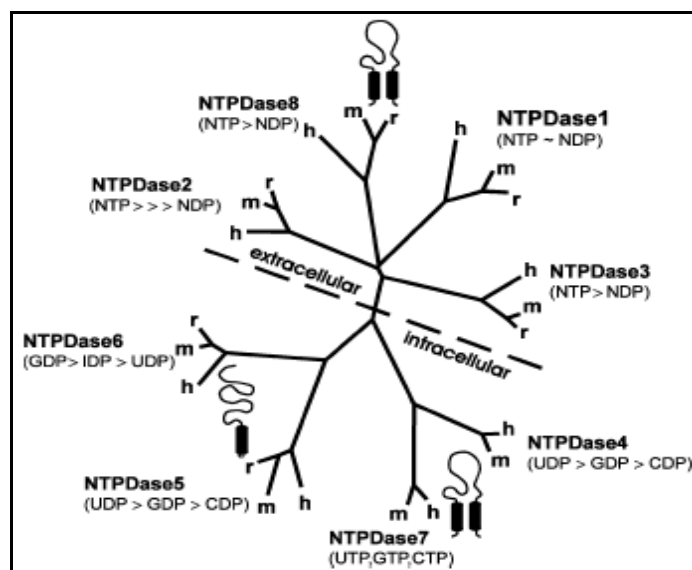


Figura 6 – Membros da Família das NTPDases (Robson et al., 2006)

Estas enzimas apresentam um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões que são conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACRs), as quais são de extrema importância para a atividade catalítica (ZIMMERMANN, 1999). Elas estão amplamente distribuídas nos tecidos animais e representam as principais ectonucleotidasas expressas pelo

endotélio e células musculares lisas do sistema circulatório (ZIMMERMANN et al., 1999; BONAN et al., 2001; SCHETINGER et al., 2001; VIERA et al., 2001).

A NTPDase-1 (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD 39) foi a primeira enzima da família NTPDase a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 7) (ZIMMERMANN, 2001). Esta enzima hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (ZIGANSHIN et al., 1994).

A NTPDase-1 de plaquetas intactas de humanos pode estar envolvida na regulação da concentração dos nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular. Alguns estudos indicam que o uso de CD39 solúvel se constitui num potencial agente terapêutico para inibição de processos trombóticos mediados por plaquetas. A solução purificada de CD39 bloqueou in vitro a agregação plaquetária induzida por ADP e inibiu a reatividade plaquetária induzida pelo colágeno (GAYLE III et al., 1998; ENJYOJI, 1999).

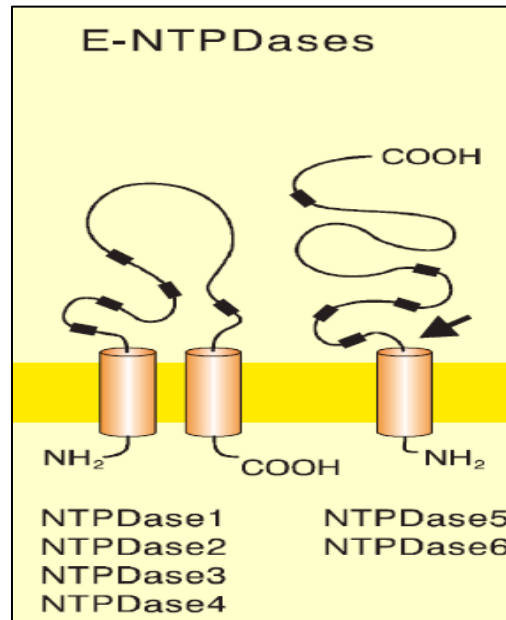


Figura 7-Topografia de membrana de ectonucleotidases (Zimmermann, 2001 - adaptado)

### 2.5.2 5'- Nucleotidase

Até o momento, sete sub-tipos da enzima 5'-nucleotidase foram isoladas e caracterizadas em humanos. Essas enzimas variam na localização subcelular, sendo 5 delas localizadas no citosol, uma na matriz mitocondrial e uma anexada a membrana plasmática externa. Enquanto essas enzimas compartilham a habilidade em hidrolisar 5'- nucleosídeos monofosfatos e se sobrepõem na especificidade ao substrato, elas variam na afinidade por 5'-monofosfatos (HUNSUCKER et al., 2005).

A ecto-5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73) é uma glicoproteína ligada a membrana via um glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 8) que catalisa a hidrólise éster fosfórica do 5'-ribonucleotídeo para o correspondente ribonucleosídeo e fosfato. Ocorre na forma de dímero e seu peso molecular está na faixa de 62 a 74 Kd. (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER et al., 2005). Esta enzima é encontrada em bactérias, animais e plantas (ZIMMERMANN, 1992).

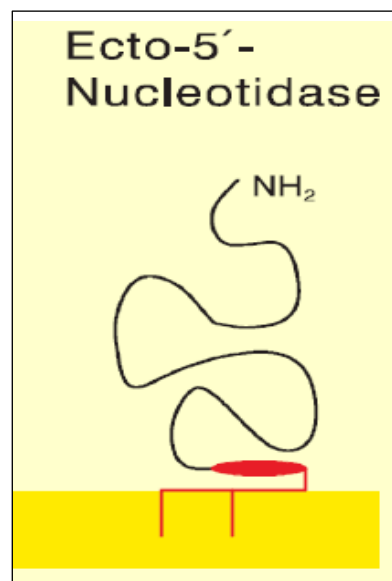


Figura 8 - Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana (Zimmermann, 2001- adaptado).

As funções da ecto-5'-nucleotidase correlacionam-se diretamente ao seu papel na produção de adenosina. Assim, de acordo com a sua localização tecidual, ela desempenha importantes funções como por exemplo, no controle da agregação plaquetária, na regulação do tônus vascular e também na neuromodulação e neuroproteção no sistema nervoso (ZIMMERMANN et al., 1998; KAWASHIMA et al., 2000; DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

A ecto-5'-nucleotidase é a principal enzima responsável pela formação de adenosina extracelular e a subsequente ativação de receptores de adenosina (P1) (ZIMMERMANN, 2000). Estudos têm demonstrado que a geração de adenosina extracelular tem sido amplamente implicada como uma resposta adaptativa a momentos de hipóxia e isquemia (GNAIGER, 2001; O'FARRELL, 2001). É geralmente aceito que a desfosforilação do AMP pela CD73 representa o maior caminho da formação da adenosina extracelular durante o decréscimo da suplementação de oxigênio como no IAM (LINDEN, 2001).

## 2.6 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo ocorre em situações em que há um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes, com o predomínio destes últimos. Assim, a diminuição dos sistemas de defesa antioxidante, ou, o aumento da geração de espécies oxidantes, radicalares ou não, pode resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (DHALA et al., 2000).

Um decréscimo no fluxo sangüíneo para o coração devido à aterosclerose, trombose ou espasmo coronário, é conhecido por induzir isquemia miocárdica. Embora a reperfusão do miocárdio isquêmico durante o estágio inicial seja essencial na prevenção do dano cardíaco, após um período crítico leva a danos como geração de estresse oxidativo (KLONER et al., 1983; GARLICK et al., 1987; ZWEIER et al., 1987; BOLLI et al., 1988; DAS & MAULIK, 2003). Durante a isquemia os carreadores mitocondriais encontram-se no seu estado reduzido. Durante a reperfusão, a interação entre o oxigênio molecular e a cadeia respiratória reduzida leva a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (BECKER, 2004; KASPAROVA et al., 2005). Entretanto EROs podem surgir de diferentes fontes que incluem NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico síntase, auto-oxidação de catecolaminas, aumento dos níveis de angiotensina II e aldosterona, e liberação de citocinas pró-inflamatórias (LANDMESSER et al., 2002; BERRY & HARE, 2004).

As EROs como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion hidroxil ( $\cdot OH$ ) e outros oxidantes podem ter diferentes efeitos deletérios no coração (ZHAO, 2003; TAKANO et al., 2003, GHOSH et al., 2005). Os efeitos mais

comumente reconhecidos do aumento do estresse oxidativo é a oxidação e o dano a macromoléculas como proteínas, lipídios, DNA (Figura 9) e enzimas envolvidas na produção de energia, desse modo contribuindo para o dano celular e aceleração da morte celular através da apoptose e necrose (GIORDANO, 2005; VALKO et al., 2006).

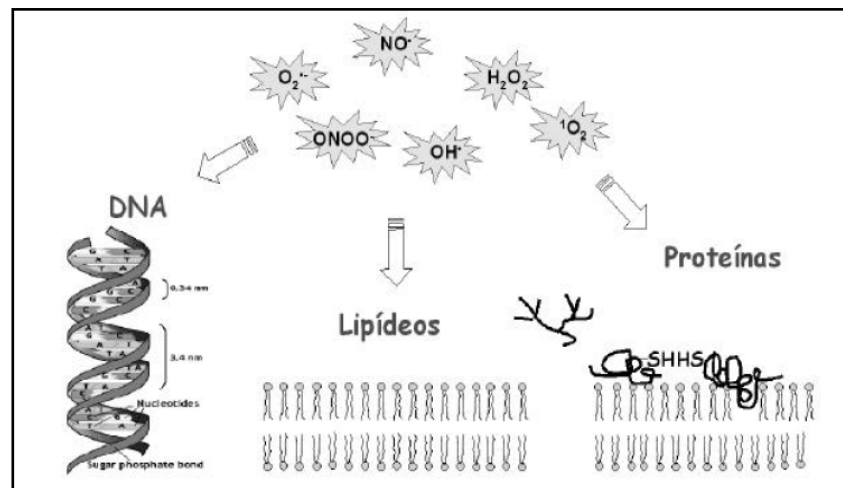


Figura 9 - Dano oxidativo a macromoléculas biológicas (Torres, 2003).

## 2.6.1 Indicadores pró-oxidantes

### 2.6.1.1 Lipoperoxidação

O dano aos lipídios induz o fenômeno conhecido como lipoperoxidação. Um dos mais conhecidos produtos da lipoperoxidação é o malondialdeído (MDA) (ALEXANDROVA & BOCHEV, 2005; CHERUBINI et al., 2005), o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados. Altos níveis de MDA elevam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da lipoperoxidação (KASHYAP et al., 2005).

As membranas são compostas principalmente de fosfolipídios e proteínas. Alterações nos lipídios de membrana por EROS estão entre os principais efeitos relacionados ao momento de isquemia e reperfusão que ocorre no IAM. Com isso, há perda da seletividade na troca iônica e da liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e a formação de produtos citotóxicos,

culminando com a morte celular (LAZZARINO et al., 1994; PARK & LUCCHESI, 1999; MAREZIN et al., 2003).

### **2.6.1.2 Oxidação protéica**

As EROs podem causar danos a todos os tipos de biomoléculas, incluindo as proteínas (DONNE et al., 2003). O dano à estrutura protéica pode alterar sua atividade biológica, sendo que no caso de enzimas, poderia resultar em modificação de sua atividade catalítica. Além disso, estas alterações ainda poderiam causar prejuízo no transporte ativo através das membranas celulares e citólise (DEAN et al., 1997).

Os grupos carbonil são produzidos pela oxidação das cadeias laterais das proteínas, quando elas são oxidadas. Essas frações são quimicamente estáveis o que os torna detectáveis. A proteína carbonil também pode ser gerada através da clivagem oxidativa das proteínas por um sistema de  $\alpha$ -amidação ou por oxidação das cadeias laterais de glutamato, levando a formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal está bloqueado por um derivado  $\alpha$ -cetoacil. Também, os grupos carbonil podem ser introduzidos nas proteínas por uma reação secundária das cadeias laterais nucleofílicas de Cys (cisteína), His (histidina) e Lis (lisina) com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (como o malondialdeído entre outros). Além disso, derivados carbonil reativos (cetoaminas, cetoaldeídos) gerados como uma consequência da reação de açúcares redutores, ou seus produtos de oxidação com resíduos de Lis das proteínas (reações de glicação ou glicooxidação) com a eventual formação de produtos finais de glicação-lipoxidação avançados, podem levar a formação de grupos carbonil (DONNE et al., 2003; STADTMAN, 2004).

O conteúdo de proteína carbonil é atualmente o principal indicador e marcador de oxidação protéica (BERLETT & STADTMAN, 1997; CHEVION et al., 2000; BEAL, 2002). A acumulação de proteína carbonil tem sido observada em diversas doenças humanas incluindo as doenças cardíacas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; MALDONADO et al., 2006; CORREA et al., 2007, BATTISTI et al., 2008). O mecanismo causador dessa acumulação é bastante interessante, mas ainda não está bem estabelecido. Uma ou mais das muitas possibilidades que

poderiam causar o aumento nos níveis de proteínas oxidadas são; (i) um aumento no número de espécies oxidantes, (ii) um decréscimo nos “scavengers” dessas espécies, (iii) um aumento na susceptibilidade dessas proteínas a oxidação e (iv) um decréscimo na remoção das espécies oxidadas (DAVIES, 2000).

### **2.6.2 Defesas antioxidantes**

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração, comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (JORDÃO et al., 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Esta definição engloba compostos de natureza enzimática e não enzimática (SIES, 1993; VALKO et al., 2007).

#### **2.6.2.1 Antioxidantes enzimáticos**

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSHPx), que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das EROs. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio evitando assim, a formação do radical hidroxil (BOVERIS & CADENAS, 1997).

A função da SOD foi descoberta em 1969 por McCord & Fridovich, o que propiciou um grande avanço das pesquisas na área de toxicidade do oxigênio. Esta enzima está presente em todos os organismos aeróbicos e catalisa a dismutação do radical superóxido. Existem três classes de superóxido dismutase: Fe-SOD, CuZn-SOD e Mn-SOD. A CuZn-SOD e a Mn-SOD encontram-se em eucariotos e a Fe-SOD, apenas em procariotos. A SOD dependente de cobre e zinco encontra-se no citoplasma celular e nos fluidos extracelulares, onde é secretada pelas células



endoteliais. A Mn-SOD é uma enzima mitocondrial tetramérica, apresentando um átomo de manganês por subunidade (SEIZI, 2003).

A SOD catalisa a dismutação do radical  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  por sua vez é degradado pela ação da CAT ou GSHPx resultando em água e  $O_2$  (Figura 10) (MCCORD & FRIDOVICH, 1969; FARBER, 1990).

A CAT é uma enzima tetramérica, consistindo de quatro subunidades idênticas de 60 KDa, que contém um único grupo ferroprotoporfirina por unidade, e tem uma massa molecular de aproximadamente 240 KDa. A CAT reage eficientemente com o  $H_2O_2$  para formar  $H_2O$  e  $O_2$  (MATTES et al., 1999). A enzima é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado e sua atividade é dependente de NADPH (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

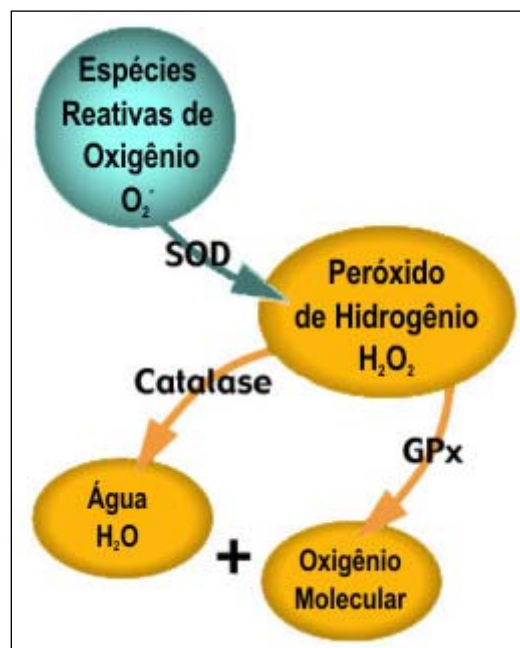


Figura 10- Mecanismo enzimático antioxidante (Nordberg & Arner, 2001).

### 2.6.2.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Além das defesas antioxidantes enzimáticas as defesas antioxidantes não-enzimáticas desempenham papel de fundamental importância para a célula. Nesse

grupo destacamos o papel dos tióis não-protéicos, e das vitaminas C e E (VALKO et al., 2007).

Os tióis não-protéicos têm uma importante função na defesa contra EROs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; MASSELA et al., 2005). A glutathiona reduzida (GSH) é o tiol não-protéico mais abundante presente nas células animais (MEISTER & ANDERSON, 1983). Esta é formada por cisteína, glicina e resíduos de ácido glutâmico e sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante do momento de isquemia – reperfusão (SHAN et al., 1990; ARTEEL & SIES, 2001).

A GSH participa na decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), potencialmente tóxico, que é convertido em  $H_2O$  em reação catalisada pela GSHPx, às custas da glutathiona reduzida; a glutathiona oxidada resultante é reciclada à forma reduzida pela glutathiona redutase e NADPH (Figura 11) (KRETZSCHMAR, 1996; GUL et al., 2000). O NADPH é regenerado pela via das pentoses fosfato, em reação catalisada pela glicose 6-fosfato desidrogenase, a qual é particularmente importante nos eritrócitos. Dessa forma, este processo de reciclagem e a manutenção de níveis adequados de GSH podem prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (STAMLER & SLIVKA, 1996). Variações nos níveis de glutathiona afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA. A oxidação ou depleção da GSH pode diminuir a síntese protéica. Em situações de estresse oxidativo muito intenso a GSH pode ser perdida de maneira irreversível, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (UHLIG & WENDEL, 1992).

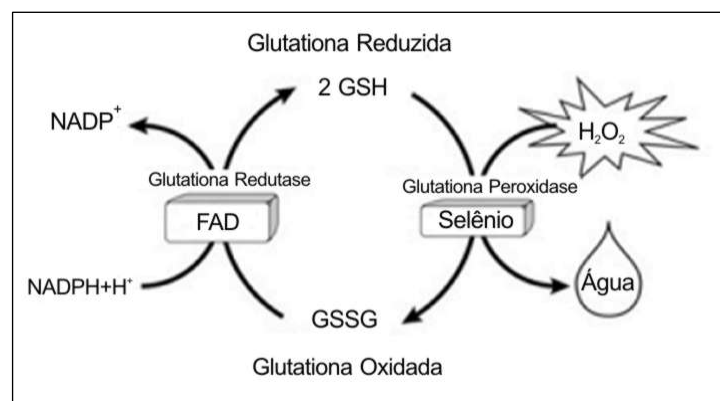


Figura 11- Papel da GSHPx e GSH na decomposição do peróxido de hidrogênio

As vitaminas C e E também desempenham papel de fundamental importância na detoxificação das EROs formadas durante o momento de isquemia-reperfusão que ocorre no IAM. A vitamina C (ascorbato) é um nutriente hidrossolúvel encontrado primariamente em frutas e vegetais (MAYNE, 2003) e exerce ação protetora sobre componentes hidrossolúveis do organismo (BENZIE & STRAIN, 1999). Age diretamente sobre as EROs e está envolvida na regeneração de  $\alpha$ -tocoferil em  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) (FREI et al., 1989; CHAN, 1993). A vitamina C interage com as EROs na fase aquosa do plasma antes que eles possam agir oxidativamente sobre lipídios e lipoproteínas (ROSS & MOLDEUS, 1991; NORDBERG & ARNER, 2001).

A vitamina E (ou  $\alpha$ -tocoferol) pertence ao grupo dos antioxidantes fenólicos, sendo que dentre eles o  $\alpha$ -tocoferol tem sido considerado o mais biologicamente ativo e o principal antioxidante lipossolúvel nas membranas celulares (MACHLIN & BENDICH, 1987; MAYNE, 2003).

A função antioxidante da vitamina E é essencialmente a captura de radicais peroxila e alcóxila, levando ao término da reação em cadeia da lipoperoxidação por formar um aduto não radicalar. Nesse processo a vitamina E atua doando um átomo de hidrogênio para estes radicais, derivados da oxidação de ácidos graxos. O radical peroxila oxida a vitamina E e produz o radical tocoferoxila, um radical estável que não propaga a cadeia. Subseqüentemente, o radical tocoferoxila é regenerado à vitamina E pela vitamina C e pela glutathione (CHAN, 1993; LIEBLER, 1993).

A vitamina E também tem sido relatada como o mais importante antioxidante endógeno para a LDL (STAMPFER & RIMM, 1995; BONITHON-KOPP et al., 1997) e, quando há depleção de antioxidantes na molécula de colesterol LDL, ocorre peroxidação lipídica em cadeia, de modo que, a presença de antioxidantes nessa lipoproteína retarda o início deste processo (MOSCA et al., 1997). Sua deficiência tem sido associada a um aumento da viscosidade das plaquetas do sangue, predispondo à formação de coágulos potencialmente fatais (STAMPFER E RIMM, 1995; BONITHON-KOPP et al., 1997). Assim, a vitamina E previne doenças ateroscleróticas não somente por seu efeito antioxidante, mas também por seu efeito inibidor sobre a proliferação de células de músculo liso e sobre a adesão e agregação plaquetária (HARRIS et al., 2002). Estudos epidemiológicos revelam uma

relação inversa entre os níveis de vitamina E e o risco para doenças cardiovasculares (GEY et al., 1991; RIEMERSMA et al., 1991; STREET et al., 1994).

### 3. MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos. As apresentações estão baseadas nas versões submetidas à publicação nas revistas: Clinical Biochemistry (Manuscrito I) e Biomedicine & Pharmacotherapy (Manuscrito II).

Manuscrito I: Hydrolysis of Adenine Nucleotides in Platelets from Acute Myocardial Infarction Patients.

Manuscrito II: Oxidative Stress versus Antioxidants Defenses in Patients with Acute Myocardial Infarction.

## HYDROLYSIS OF ADENINE NUCLEOTIDES IN PLATELETS FROM ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION PATIENTS

### **Category of submission:**

Original research communication - clinical investigation

### **Authors:**

Margarete D. Bagatini<sup>a</sup>, Caroline C. Martins<sup>a</sup>, Vanessa Battisti<sup>a</sup>, Roselia M. Spanevello<sup>a</sup>, Diogo Gasparetto<sup>b</sup>, Cintia S. Rosa<sup>a</sup>, Jamile Fabrin Gonçalves<sup>a</sup>, Maria Rosa C. Schetinger<sup>a</sup>, Romualdo B. dos Santos<sup>b</sup>, Vera Maria Morsch<sup>a,\*</sup>

### **Affiliations: Name of the Department:**

<sup>a</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Grupo de Pesquisa em Cardiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

### **\*Corresponding author:**

Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Morsch

Departamento de Química/Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, RS, Brasil- 97105-900

Fax: 0+5555 3220 8978 or e-mail: [veramorsch@gmail.com](mailto:veramorsch@gmail.com)

**Abstract**

**Objectives:** To investigate the rate of ATP, ADP and AMP hydrolysis on the surface of platelets from Acute Myocardial Infarction (AMI) patients.

**Design and methods:** Twenty five patients diagnosed with AMI, through clinical criteria, electrocardiographic changes and increase of cardiac biomarkers, as well as 25 healthy patients were selected. The hydrolysis of ATP, ADP and AMP was verified in isolated platelets of these patients.

**Results:** The results demonstrated that an increase in ATP (54%) and ADP (45%) hydrolysis occurred in AMI patients when compared to the control group. The hydrolysis of AMP also increased by 46% in AMI patients probably leading to an enhancement in the adenosine level.

**Conclusions:** Our results suggest the existence of alterations in nucleotide hydrolysis in platelets from AMI patients. Possibly, this increase in nucleotide hydrolysis could be related to a compensatory organic response to thrombotic events that occur in AMI.

**Key words:** Acute Myocardial Infarction, NTPDase-1, ecto-5'-nucleotidase, platelets, adenine nucleotides, hypoxia, ischemia.

## 1. Introduction

Vascular diseases are one of the major public health problems in the developed world resulting in devastating symptoms involving coronary artery occlusion, peripheral vascular insufficiency, cerebrovascular disorders and Acute Myocardial Infarction (AMI) [1]. These diseases affect millions of people annually resulting in morbidity and mortality. In these illnesses, organ infarction is mediated by arterial thrombosis and is associated with vascular inflammation. The endothelium and platelets have been recognized for decades as key pathological components of these processes [2].

Hemostasis is a normal physiological response to vascular injuries, and platelets play a pivotal role in this process [3]. According to the “response-to-injury” hypothesis of atherogenesis, microscopic breaches in the endothelium at advanced fatty streaks expose the highly thrombogenic subendothelial matrix to circulating platelets. This, in turn, promotes the formation of platelet-rich microthrombi, which become organized within the vessel wall, thereby contributing to the growth of atherosclerotic lesions. In addition, platelets are a potent source of growth factors that can contribute to smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic plaques. In such plaques, a breach in endothelial cell integrity can initiate the formation of occlusive platelet macrothrombi, which can lead to AMI [4].

When platelets are activated, active substances such as ADP are released [5]. It is known that micromolar concentrations of ADP are sufficient to induce human platelet aggregation, whereas adenosine (the final product of ATP hydrolysis) can inhibit platelet aggregation [6,7]. ADP acts upon platelets regulating their aggregation and modifying their shapes [8]. On the other hand, ATP has been postulated to be a competitive inhibitor of ADP-induced platelet aggregation [9]. The released ADP can



interact with P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors on platelets and induce platelet aggregation [10,11], which contributes to normal hemostasis and thrombus formation. However, the effect of the released ATP is unclear. It is known that ATP can interact with P2X<sub>1</sub> receptors on platelets causing a transient Ca<sup>2+</sup> mobilization, [12] but this does not result in platelet aggregation. Furthermore, the importance of P2X<sub>1</sub> receptors for overall platelet function is unknown. It is also known that ATP acts as an antagonist of the effects of ADP at P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors [13], and that, high concentrations can inhibit ADP-induced platelet aggregation [14].

Platelets express a multienzymatic complex, which is responsible for extracellular nucleotide hydrolysis on their surface. This complex includes enzymes from the E-NTPDase family as well as the 5'-nucleotidase enzyme [15]. The combined action of these enzymes converts ATP, ADP and AMP to adenosine. Adenosine, produced by nucleotide degradation, inhibits platelet aggregation and acts as a vasodilator. Because of these important effects, adenosine is considered a cardioprotector [16].

Taking into account the importance of adenine nucleotides in the regulation of platelet aggregation, as well as their importance in adenosine formation, the hydrolysis of nucleotides on platelets obtained from healthy and AMI patients was studied.

## 2. Patients and methods

### 2.1 Materials

Nucleotides, sodium azide, HEPES, and Trizma base were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

## 2.2 Patients

Twenty-five AMI patients from the Federal University of Santa Maria Hospital were selected for the study. AMI was characterized by clinical criteria, such as chest pain (> 30 min duration). The electrocardiographic changes included symmetrical ST segment elevations of 1 mm from baseline in limb leads or of 2 mm in chest leads of T-wave inversions with or without Q waves, and changes in serum concentrations of creatine kinase (CK), creatine kinase MB isoform (CK-MB) and troponins. All patients received conventional therapy for AMI, including acetylsalicylic acid and clopidogrel. Patient general characteristics are shown in table 1. The control group consisted of 25 individuals aged  $44.36 \pm 11.07$  years, 46.34% males and 53.66% females, who presented normal blood pressure, were free from diabetes mellitus, alcoholism, cigarette smoking, chronic diseases and who had not been submitted to any pharmacological therapy during the month before the study. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria, protocol number 32/06, Brazil. Ten milliliters of blood was obtained within 72 hours after AMI from each patient and used for platelet-rich plasma preparation and biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group.

## 2.3 Platelet isolation

Platelets were prepared from human donors by the method of Pilla et al. [17] modified by Lunkes et al. [18]. Briefly, blood was collected into 0.129 M citrate and centrifuged at 160 x g for 10 min. The platelet-rich plasma was centrifuged at 1400 x

g for 15 min and washed twice with 3.5 mM HEPES isosmolar buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl, and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer and protein was adjusted to 0.4–0.6 mg/ml.

## 2.4 Measurement ATP, ADP and AMP hydrolysis in platelets

Twenty microliters of the isolated platelets (10–15 µg protein) were added to the reaction assay and preincubated for 10 min at 37°C at a final volume of 200 µL. ATP and ADP hydrolysis were determined by the method of Pilla et al. [17] in a reaction medium containing 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 60 mM glucose, and 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1 mM. AMP hydrolysis was determined by the method of Pilla et al. modified by Lunkes et al. [17,18] in a reaction medium containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4. The reactions were stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the method of Chan et al. [19] using KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as standard. Controls were prepared to correct for nonenzymatic hydrolysis by adding protein after TCA addition. All samples were run in triplicate.

## 2.5 Biochemical determinations

CK and CK-MB were assayed by spectrophotometric methods using available commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil) with a Cobas Integra-400 method (Cobas, Basel, Switzerland). Troponins were determined (Immulite, Los Angeles, CA, USA) upon arrival to the emergency room and at 8, 12, and every 24 hours after the onset of pain until the maximum level was reached.

## 2.6 Effects *in vitro*, of drugs used in the treatment of patients with Acute Myocardial Infarction on nucleotide hydrolysis

Twenty microliters of the isolated platelets (10–15 µg protein) from healthy subjects were added to the reaction assay and preincubated for 10 min at 37°C at a final volume of 200 µL. Acetylsalicylic acid was added from a water solution to a final concentration of 50, 100, 150 and 200 µM in the test tubes. The concentrations utilized for clopidogrel were 1, 3, 5 and 8 µM. All concentrations used *in vitro* represented, approximately, the mean plasma values of the medications [20, 21]. The enzyme reaction was started by the addition of ATP, ADP and AMP, and incubated for 60 min. The reactions were stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA).

## 2.7 Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard [22].

## 2.8 LDH measurement

LDH enzyme activities were measured using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer).

## 2.9 Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the T-Test ( $P < 0.05$ ).

### 3. Results

#### 3.1 Biochemical parameters

Table 1 presents biochemical parameters demonstrated by CK ( $1584 \pm 43.02$  UI), CK-MB ( $161.11 \pm 42.05$  UI) and troponin ( $99.32 \pm 20.16$  ng/ml) were elevated in the AMI group when compared with the control group ( $<232$  UI,  $<24$  UI,  $<0.2$  ng/ml respectively, reference values).

#### 3.2 Cellular integrity

The activity of lactate dehydrogenase (LHD) was used as a marker for measuring cell integrity. The measurements of LDH activity showed that most cells (approximately 90%) were intact after the isolation procedure (data not shown).

#### 3.3 Effects of Acute Myocardial Infarction on platelet nucleotide hydrolysis.

The results obtained for ATP, ADP and AMP hydrolysis are shown in Figure 1. As can be observed, ATP and ADP hydrolysis were enhanced (54% and 45%, respectively) in the AMI patient group when compared with the control group,  $P<0.0001$ .

AMP hydrolysis was modified by AMI demonstrating an increase of 46% in the rate of hydrolysis in patients with AMI when compared with the control group,  $P<0.0001$ .

#### 3.4 Effects of drugs used in the treatment of Acute Myocardial Infarction on nucleotide hydrolysis.

In vitro, concentrations ranging from zero to 200  $\mu\text{M}$  for acetylsalicylic acid and from zero to 8  $\mu\text{M}$  for clopidogrel were used. The results obtained demonstrate that ATP, ADP and AMP hydrolysis was not affected by the presence of the medications at the concentrations cited above (Table 2).

#### 4. Discussion

Extracellular adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their nucleoside derivative adenosine are important signaling molecules in the vasculature that have the potential to influence vasomotor responses, cardiac function, inflammatory responses and platelet reactivity [23]. One of the main events that occurs in AMI is the abrupt rupture of atherosclerotic plaques, which results in atherothrombotic events and consequently increases platelets aggregation. Therefore, in the present work we evaluated the hydrolysis of the adenine nucleotides, which represent important molecules in the process of homeostasis and thrombus formation, in platelets from AMI patients.

The results of the present study showed an increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis in patients with AMI when compared with the control group (Figure 1). Recently, altered nucleotide hydrolysis in platelets was also observed in studies carried out in our laboratory with diabetic, hypertensive, diabetic/hypertensive [18], breast cancer [24] and hemodialysis patients [25] and patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes [26]. Taken together, these findings suggest that nucleotide hydrolysis could be an important parameter in thromboregulation in different pathological conditions.

ATP, ADP and adenosine are known to regulate the vascular response to endothelial damage by exerting a variety of effects on platelets. It has been observed

that micromolar concentrations of ATP inhibit platelet aggregation by both competitive and noncompetitive mechanisms, whereas lower concentrations can be stimulatory [14]. ADP is a nucleotide recognized to induce changes in platelet shape and aggregation whereas adenosine is a potent inhibitor of this aggregation and an important modulator of vascular tone [8,16]. In this context, based on our results we can suggest that the increase in nucleotide hydrolysis may act as a mechanism to attenuate the thrombotic event that occurs in AMI.

The extracellular nucleotide concentration may be regulated by the action of ectonucleotidases. The most relevant ecto-enzymes involved in adenine extracellular nucleotide hydrolysis are those from the NTPDase family and ecto-5'-nucleotidase [27]. The NTPDase family is composed of eight members: four are typical cell surface-located enzymes with an extracellularly facing catalytic site (NTPDase 1, 2, 3, 8) that exhibit the ability to hydrolyze extracellular nucleotides to their respective nucleosides [28]. Recent studies of our laboratory demonstrated a significant increase in the expression of NTPDase-1 in platelets of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes [26]. Based on these findings, we can suggest that the hydrolysis of ATP, ADP and AMP in platelets of patients with AMI could be carried out by action of NTPDase-1 together with ecto-5'-nucleotidase, as both enzymes are present on the ecto-surface in intact platelets and are able to promote the complete hydrolysis of ATP to adenosine in the extracellular space [15].

Corroborating with our results, Kittel et al. [29] found faster hydrolysis of ATP and ADP in tissues of patients with ischemic heart disease, which suggests the upregulation of NTPDase-1 and ecto-5'-nucleotidase. However, Rossatto et al. [30], studying patients with coronary artery heart disease, did not find any difference in ATP diphosphohydrolase activities between the groups studied (Group I= control,

Group II=stable angina, Group III=unstable angina + IAM). These differing results may be due to differences between our patient group and the patient group utilized in Rossatto's study, being that AMI is a pathology associated with higher platelet aggregation than is found in other coronary diseases.

Another event that occurs in AMI is ischemia/hypoxia, which is caused by coronary occlusion [31]. This alteration can be revealed by elevation of cardiac-specific troponins, CK and CK-MB, which indicates necrosis and cellular damage. This event is reinforced by the risk factors associated with AMI, such as hypertension, cigarette smoking and family history, as shown in our results (Table 1). An important aspect to be discussed here is that many studies show that myocardial ischemic preconditioning is associated with increasing 5'-nucleotidase activity and adenosine metabolism, suggesting a protective role for adenosine following hypoxia and reperfusion [32]. Confirming this findings, Node et al. [33] showed that 5'-nucleotidase activity increased 12-24 hours after ischemic preconditioning, which limited the size of the infarct, accompanied by increased adenosine levels in coronary venous blood. In this context we can infer that the nucleoside adenosine produced by nucleotide degradation in platelets of AMI patients not only inhibits platelet aggregation, but also acts as a vasodilator, thus contributing to the decrease in the size of the infarction.

With the objective of excluding a direct effect of drugs commonly used for the treatment of AMI, we investigated the influence of acetylsalicylic acid and clopidogrel in nucleotide hydrolysis. Acetylsalicylic acid is an antiplatelet drug that interferes with the metabolism of cyclic prostanoids by irreversible inhibition cyclooxygenase, which is a key enzyme in the pathway of thromboxane A<sub>2</sub> synthesis [2]. Clopidogrel is an antiplatelet compound that has recently been shown to be effective in the secondary



prevention of cardiovascular complications of atherosclerosis [34]. Clopidogrel is a thienopyridine, whose active metabolites are known as platelet ADP-receptor blockers (P2Y<sub>12</sub>) [34]. At a concentration higher than that found therapeutically, they do not alter nucleotide hydrolysis (Table 2). In accordance with our results, Lunkes, et al [18] found no alteration in nucleotide hydrolysis with acetylsalicylic acid *in vitro* at concentrations up to 60 µM. Herbert [35] found the same results for clopidogrel *in vitro* in concentrations lower than 100 µM. Consequently, we may suggest that the increase observed in nucleotide hydrolysis is not due to the medicines used by AMI patients. In conclusion, these findings support the argument that the pathological condition AMI generates the increase in nucleotide hydrolysis as a compensatory organic response.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

## References

- [1] Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA* 2003; 290:932-940.
- [2] Bhatt DL, Topol EJ. Need to test the arterial inflammation hypothesis. *Circulation* 2002; 106:136-140.

[3] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135-1143.

[4] Ross R. Mechanisms of disease: atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.

[5] Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ et al. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2002; 109:1031- 1040.

[6] Bakker WW, Poelstra A, Barradas K et al. Platelets and ectonucleotidases. *Platelets* 1994; 5:121-129.

[7] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF et al. Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *Thromb Haemost* 2003; 1: 2497–2509.

[8] Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 1997; 54: 745-750.

[9] Coade SB, Pearson JD. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res* 1989; 65: 531-537.

[10] Kunapuli SP. Functional characterization of platelet ADP receptors. *Platelets* 1998; 9:343–351.

[11] Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; 86:222–232.

[12] Mahaut-Smith MP, Ennion SJ, Rolf MG et al. ADP is not an agonist at P2X1 receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. *Brit J Pharmacol* 2000; 131:108 –114.

[13] Nicholas RA. Identification of the P2Y<sub>12</sub> receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Mol Pharmacol* 2001; 60:416-420.

[14] Soslau G, Youngprapakorn D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1997; 1355:131–140.

[15] Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJF. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol Cell Biochem* 1993; 129:47-55.

[16] Ely SW, Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992;85:893–904.

[17] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996; 7:225–230.

[18] Lunkes GL, Lunkes D, Stefanello F et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2003; 109:189-194.

[19] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157:375-380.

[20] Richter T, Mürdter TE, Heinkele G et al. Potent Mechanism-Based Inhibition of Human CYP2B6 by Clopidogrel and Ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308:189-197.

[21] Tendra M, Wojakowski W. Role of antiplatelet drugs in the prevention of cardiovascular events. *Thromb Res* 2003; 110: 355-359.

[22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:218–254.

[23] Burstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscl Throm* 2002; 22: 364-372.

[24] Araújo MC, Rocha JBT, Morsch A et al. Enzymes that hydrolyze nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochem Biophys Acta* 2005; 1740: 421– 426.

[25] Silva AC, Morsch ALB, Zanin RF et al. Enzymes that hydrolyzed adenine nucleotides in chronic renal failure: Relationship between hemostatic defects and renal failure severity. *Biochem Biophys Acta* 2005; 1741: 282-288.

[26] Duarte MMF, Loro VL, Rocha JBT et al. Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *FEBS J* 2007; 274: 2707-2714.

[27] Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Develop Res* 2001; 52, 46-56.

[28] Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2006; 2: 409-30.

[29] Kittel A, Kiss AL, Müllner N, Matkó I, Sperlágh B. Expression of NTPDase 1 and caveolins in human cardiovascular disease. *Histochem Cell Biol* 2005; 124: 51-59.

[30] Rossatto ER, Da Silva LB, Pereira GS et al. ATP diphosphohydrolase in human platelets from patients with coronary arteries heart disease. *Platelets* 2003; 14: 47-52.

[31] Keeley EC, Hillis D. Primary PCI for Myocardial Infarction with ST-Segment Elevation. *N Engl J Med* 2007; 356:47-54.

[32] Minamino T, Kitakaze M, Morioka T et al. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. *Am J Physiol* 1996; 270: 238–244.

[33] Node K, Hasegawa M, Suzuki S, Hori M. Induction of ecto-5'-nucleotidase contributes to the second-window of cardioprotection in ischemic preconditioning. *Circulation* 1996; 94: 1422.

[34] Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 1288–1295.

[35] Herbert JM. Clopidogrel and antiplatelet therapy. *Expert Opin. Invest Drug* 1994; 3: 449-455.

Table 1 Clinical characteristics and biochemical determinations in Acute Myocardial Infarction (AMI) patients.

Variable	AMI (n=25)
Age(years)	57.53 ± 11.41
Men	60%
Women	40%
Hypertension	53%
Smoker	48%
Family history	68%
Patients with CK elevation	100%
Patients with CK-MB elevation	100%
Patients with Troponins elevation	100%

Age is presented as mean ± SD and and percentage of patients.

**Table 2** In vitro effect of acetylsalicylic acid and clopidogrel on ATP, ADP and AMP hydrolysis in platelets of healthy subjects.

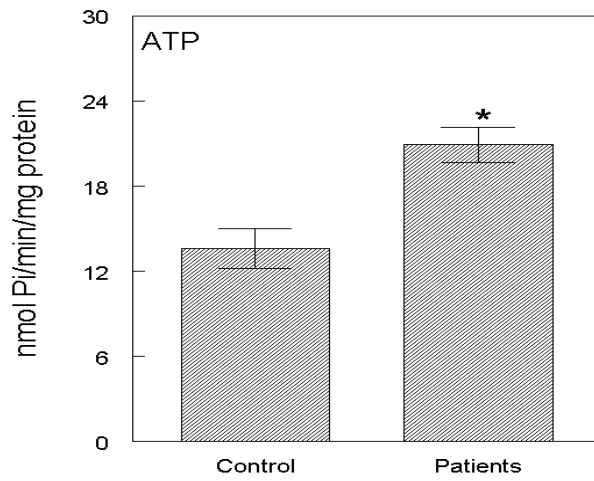
Drug ( $\mu\text{M}$ )	ATP	ADP	AMP
<b><i>Acetylsalicylic acid</i></b>			
0	16.36 $\pm$ 0.70	6.26 $\pm$ 1.05	5.33 $\pm$ 0.18
50	16.95 $\pm$ 0.89	6.88 $\pm$ 0.72	5.35 $\pm$ 0.17
100	16.67 $\pm$ 0.28	7.37 $\pm$ 0.33	5.46 $\pm$ 0.19
150	17.29 $\pm$ 0.37	6.90 $\pm$ 0.25	5.47 $\pm$ 0.20
200	16.99 $\pm$ 0.37	6.44 $\pm$ 0.78	5.19 $\pm$ 0.53
<b><i>Clopidogrel</i></b>			
0	17.04 $\pm$ 1.23	6.92 $\pm$ 0.72	6.12 $\pm$ 0.84
1	16.89 $\pm$ 1.26	7.02 $\pm$ 0.36	5.75 $\pm$ 0.82
3	17.18 $\pm$ 0.38	7.43 $\pm$ 0.13	6.08 $\pm$ 1.24
5	17.54 $\pm$ 1.47	7.33 $\pm$ 0.18	5.53 $\pm$ 0.88
8	16.95 $\pm$ 0.73	7.23 $\pm$ 0.23	5.50 $\pm$ 0.39

Values represented mean  $\pm$  standard deviation (nmol Pi/min/ mg protein) from three individual experiments.

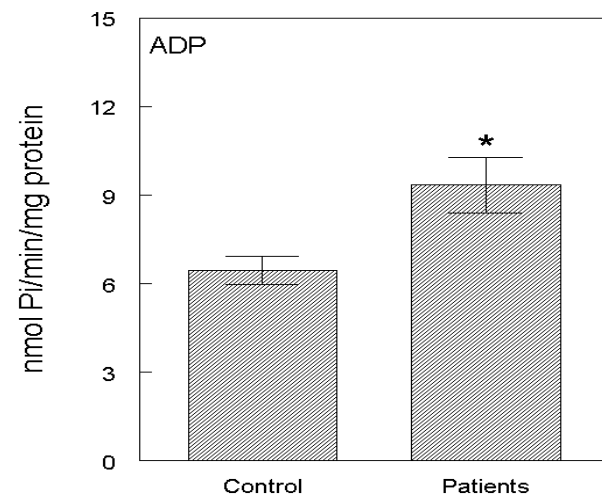


Figure 1

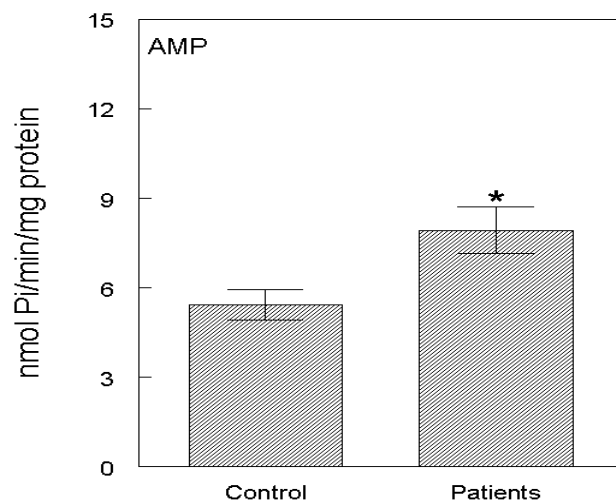
A



B



C



## Legend of the Figure

### **Figure 1**

ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in platelets from Acute Myocardial Infarction (AMI) patients. Data are presented as means  $\pm$  S.D. The symbol \* represents statistical difference from the control group.

## MANUSCRITO II

### Oxidative Stress versus Antioxidants Defenses in Patients with Acute Myocardial Infarction

Margarete D. Bagatini, Caroline C. Martins, Diogo Gasparetto, Cintia S. Rosa,  
Vanessa Battisti, Roselia M. Spanevello, Maria Rosa C. Schetinger, Vera Maria  
Morsch

## Oxidative Stress versus Antioxidants Defenses in Patients with Acute Myocardial Infarction

Margarete D. Bagatini<sup>a</sup>, Caroline C. Martins<sup>a</sup>, Diogo Gasparetto<sup>b</sup>, Vanessa Battisti<sup>a</sup>,  
Cintia S. Rosa<sup>a</sup>, Roselia M. Spanevello<sup>c</sup>, Mushtaq Ahmed<sup>a</sup>, Maria Rosa C.  
Schetinger<sup>a</sup>, Vera Maria Morsch<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

<sup>b</sup> *Grupo de Pesquisa em Cardiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

<sup>c</sup> *Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

**\*Corresponding author:**

Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Morsch

Departamento de Química

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, RS, Brasil- 97105-900

Fax: 0+5555 3220 8978

e-mail: [veramorsch@gmail.com](mailto:veramorsch@gmail.com)

## Abstract

Acute Myocardial Infarction (AMI) is a highly dynamic event, which is associated with increasing production of reactive oxygen species (ROS). The imbalance between ROS production and antioxidant defenses leads to the condition known as oxidative stress. The most widely recognized effect of increasing oxidative stress is the oxidation and damage of macromolecules, membranes, proteins, and DNA. In this study lipid peroxidation, protein carbonyl contents, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants were assessed in samples obtained from 40 AMI patients and 40 control patients. The control group was divided into two groups of 20 patients: the control group with healthy patients and the group with risk factors such as hypertension, cigarette smoking, and family history of heart disease. Our results demonstrated an increase in TBARS and carbonyl protein levels in AMI group and group with risk factors. The same occurred for the enzymatic antioxidant defenses, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). However, a decrease in nonenzymatic antioxidants such as vitamin C, and vitamin E in AMI patients was observed when compared with the healthy group and the group with risk factors. The increase in oxidative stress, represented by lipid peroxidation and protein carbonyl, observed in AMI patients probably results from the ischemic/reperfusion moment that occurs in AMI, added to the decrease of antioxidant defenses.

**Keywords** Acute Myocardial Infarction, Oxidative stress, Enzymatic antioxidants, Nonenzymatic antioxidants.

## 1. Introduction

Vascular diseases are one of the major public health problems in the developed world resulting in devastating symptoms involving coronary artery occlusion, peripheral vascular insufficiency, cerebrovascular disorders, and Acute Myocardial Infarction (AMI) [1]. These diseases affect millions of people annually resulting in morbidity and mortality [2].

AMI generally occurs when coronary blood flow decreases abruptly after a thrombotic occlusion of a coronary artery previously narrowed by atherosclerosis. That is to say, AMI occurs when a coronary artery thrombus develops rapidly at a site of vascular injury. This injury is produced or facilitated by factors such as cigarette smoking, hypertension, and lipid accumulation [3].

A decrease in the blood supply to the heart due to atherosclerosis or thrombosis is known to induce myocardial ischemia. Following ischemia, reactive oxygen species (ROS) are produced during reperfusion phase [4]. During ischemia, mitochondrial carriers are in a reduced state. During reperfusion, the interaction between molecular oxygen with the reduced respiratory chain leads to the formation of ROS [5]. However, ROS might arise from many sources that include activation of vascular NADPH oxidase, xanthine oxidase, inducible nitric oxide synthase, autooxidation of catecholamines, increased angiotensin II and aldosterone levels, and release of proinflammatory cytokines [6].

ROS may have several different effects in the heart. The most commonly recognized effect of increased oxidative stress is the oxidation and damage of macromolecules like proteins, lipids, DNA, and enzymes involved in energy production, thereby contributing to cellular damage, energetic deficit, and the acceleration of cell death through apoptosis and necrosis [7].

The first biological molecules suffering oxidative damage in cells are proteins, and their side chains can be carbonylated by reactive carbonyl compounds [8]. In addition, membranes are composed mostly of phospholipids and proteins. Alterations in membrane proteins by free radicals are important in the evolution of myocardial damage. An increasing ROS leads to the peroxidation of lipid membranes and loss of membrane integrity resulting in necrosis and cell death [9].

The effect of reactive species is balanced by the antioxidant action of nonenzymatic antioxidants, as well as by antioxidant enzymes. The most efficient enzymatic antioxidants are superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). SOD catalyzes the dismutation of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) to  $H_2O_2$ . Subsequently,  $H_2O_2$  is reduced to  $H_2O$  and  $O_2$  by peroxidases such as glutathione peroxidase or CAT [10].

The non-protein thiols, vitamin C, and vitamin E are important nonenzymatic antioxidant defenses. Reduced glutathione (GSH) is the most abundant non-protein tri-peptide thiol present in animal cells; it is formed by cysteine, glycine, and glutamic acid residues and resists to the intracellular degradation by peptidases. Non-protein thiols have an important function in the protection against ROS [11]. Ascorbic acid (vitamin C) present in aqueous environment has multiple antioxidant properties including the ability to regenerate  $\alpha$  tocopherol by reducing  $\alpha$ -tocopheryl radicals present on the surface of membranes [12]. Vitamin E has a strong antioxidant capacity and has been used in several ischemia–reperfusion studies. It plays a major role in maintaining cell membrane integrity by limiting lipid peroxidation by ROS [13].

Inadequate antioxidant protection or excessive production of ROS creates a condition known as oxidative stress that can lead to several damages [14]. The aim of this work was to assess the relation between oxidative stress and antioxidant defenses (enzymatic and nonenzymatic) in patients with AMI.

## **2. Materials and Methods**

### 2.1 Patient selection

Forty patients from the Federal University of Santa Maria Hospital with AMI were selected for this study. AMI was characterized by clinical criteria, such as chest pain with duration higher than 30 min. Electrocardiographic changes include symmetrical ST segment elevations of 1 mm from baseline in limb leads or of 2 mm in chest leads of T-wave inversions with or without Q waves, and changes in serum concentrations of creatine phosphokinase (CK), creatine phosphokinase MB isoform (CK-MB), and troponin I. All patients received conventional therapy for AMI, including acetylsalicylic acid and clopidogrel. Patient general characteristics are shown in table 1. The control group (n=40) was divided in two: control group I, consisted of twenty healthy individuals aged  $52.08 \pm 9.83$  years, 55% males and 45% females, who presented normal blood pressure, free from diabetes mellitus, alcoholism, cigarette smoking, chronic diseases, and who had not been submitted to any pharmacological therapy during the month before the study; and control group II, (n=20) with risk factors, such as cigarette smoking, hypertension, and family history of heart disease. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria, protocol number 32/06, Brazil.

### 2.2 Sample Collection

The blood was collected until 72 hours after the chest pain to start, in tubes without an anticoagulant system, centrifuged at  $1800 \times g$  for 10 min, the precipitate



was discarded and the serum was used to determine the cardiac biomarkers, substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), protein carbonyl, vitamin E and vitamin C contents. CAT and SOD activities were determined using whole blood collected in citrated tubes and diluted in a 1:10 in saline solution. For non protein thiols, the blood was collected using EDTA as anticoagulant. The sample was then centrifuged (1800 x g for 10 min) and the plasma were used to determine plasmatic thiols and the erythrocytes were used only to verify thiol levels. The sample was kept at -80°C until analysis.

### 2.3 Cardiac biomarkers

CK and CK-MB were assayed by spectrophotometric methods using available commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil) with a Cobas Integra-400 method (Cobas, Basel, Switzerland). Troponin I was determined (Immulite, Los Angeles, CA, USA) on the entrance at the emergency room at 8, 12, and every 24 hours after the onset of pain until the maximum level was reached.

### 2.4 Carbonylation of serum protein

The carbonylation of serum proteins was determined by a modified Levine's method [15]. Firstly, from 1 ml of serum, the proteins were precipitated using 0.5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 1800 x g for 5 min discarding the supernatant. One half milliliter of 10 mmol/l 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 mol/l HCl was added to this precipitate protein and incubated at room temperature for 30 min. During incubation, the samples were mixed vigorously every 15 min. After incubation, 0.5 ml of 10% TCA was added to the protein precipitate and centrifuged at 1800 x g for 5 min. After discarding the supernatant, the precipitate was washed

twice with 1 ml of ethanol/ethylacetate (1:1), centrifuging out the supernatant in order to remove the free DNPH. The precipitate was dissolved in 1.5 ml of protein dissolving solution (2 g SDS and 50 mg EDTA in 100 ml 80 mmol/l phosphate buffer, pH 8.0) and incubated at 37°C for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using a spectrophotometer at 370 nm against 2 mol/l HCl. Carbonyl content was calculated by using the molar extinction coefficient ( $21 \times 10^3$  l/mol cm) and results were expressed as nanomoles per milligram protein.

### 2.5 Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS in serum samples according to a modified method of Jentzsch et al. [16]. Briefly, 0.2 ml of serum was added to the reaction mixture containing 1 ml of 1% ortho-phosphoric acid, 0.25 ml alkaline solution of thiobarbituric acid -TBA (final volume 2.0 ml) followed by 45 min heating at 95°C. After cooling, samples and standards of malondialdehyde were read at 532 nm against the blank of the standard curve. The results were expressed as nanomoles MDA per milliliter of plasma.

### 2.6 Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD) activities

The determination of CAT activity was carried out in accordance with a modified method of Nelson and Kiesow [17]. This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to CAT dependent decomposition of hydrogen peroxide. An aliquot (0.02 ml) of blood was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was initiated by the addition of 0.07 ml in an aqueous solution of hydrogen peroxide 0.3 mol/l. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. CAT activity was calculated using the molar

extinction coefficient ( $0.0436 \text{ cm}^2/\mu\text{mole}$ ) and the results were expressed as picomoles per milligram protein.

SOD activity measurement is based on the inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin as described by McCord & Fridovich [18]. In this method, SOD present in the sample competes with the detection system for radical superoxide. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50 % the speed of oxidation of adrenalin. The oxidation of adrenalin leads to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing glicine-NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM).

### 2.7 Determination of non protein thiols

Non-protein thiols were assayed in plasma and erythrocytes by the method of Ellman [19]. Aliquots (0.1 ml) of plasma were added to a phosphate buffer 0.3 mol/l (0.85 ml), pH 7.4 and the reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0.05 ml). Results were expressed as  $\mu\text{mol/ml}$  of plasma.

Aliquots of erythrocytes (0.3 ml) were hemolyzed with 10% Triton X-100 (0.1 mL) and, after 10 min, precipitated with 0.2 mL of 20% TCA. After centrifugation at  $1800 \times g$  for 10 min, the supernatant aliquots reacted with 50  $\mu\text{L}$  of DTNB (10 mM) and the reaction product was read at 412 nm. Results were expressed as  $\mu\text{mol/mL}$  of erythrocyte.

### 2.8 Serum Vitamin C and Vitamin E quantification

Vitamin C analysis was made by the method described by Jacques-Silva et al [20]. The samples were desproteinized with trichloroacetic acid (TCA) 15%, using 0.5 ml of sample and 0.5 ml of TCA, vortex-mixed for 15 s and centrifuged at 1800 g for 15 min. Then, it was removed 0.4 ml of supernatant and incubated at 37°C in a medium containing 4.5 mg/ml dinitrophenylhydrazine, 0.6 mg/ml thiourea, 0.075 mg/ml CuSO<sub>4</sub>, and 0.675 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After 3h, 1ml of 65% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added. Then, the samples were read in spectrophotometer in 520 nm. It was used calibration curves with L(+)-ascorbic acid to determine the concentration, following the same procedure of the samples.

Serum vitamin E was estimated by a modified method of Hansen & Warwick [21]. In a cover tube, 140 µl of Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) was added to 20 µL of butylated hydroxytoluene 10 mM (BHT), 140 µl of sample and 2.1 ml of ethanol solution (66%). After this, it was vortex-mixed for 10 s and 3.5 ml of n-hexane was added and mixed for 1 min. It was then centrifuged at 1800 g for 10 min and 3 ml of superior phase transferred to fluorimeter cuvettes and the vitamin E was measured in the fluorimeter: excitement: 295 nm; emission: 340 nm. Calibration curves with α-tocopherol were used to determine the concentration, following the same procedure for the samples.

### 2.9 Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford [22] using bovine serum albumin as standard.

### 2.10 Statistical Analysis

Data were analyzed statistically using ANOVA followed by the Duncan's multiple test. Correlation was evaluated with the Pearson's test. Differences were considered significant when the probability was  $P < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1 Characteristics and cardiac biomarkers**

Table 1 shows some characteristics and risk factors of AMI, such as cigarette smoking, hypertension, and family history present in AMI patients. We have observed in our studies a large number of men that have had AMI, as previously described in the literature [3]. In the group with risk factors, we observed a higher prevalence of smoking, followed by hypertension, and family history of ischemic heart disease. Biochemical parameters demonstrated by CK, CK-MB and troponin I values were elevated in the AMI group when compared with the two others groups (<232 UI, <24 UI, <0.2 ng/ml respectively, reference values).

#### **3.2 Carbonylation of serum protein**

The protein oxidation, determined by protein carbonyl content in serum from the patients, is shown in Figure 1. A significant difference between the patients and the control groups was observed. The protein carbonyl content was increased in the AMI patients when compared with the healthy group ( $p < 0.0001$ ) and the group with risk factors ( $p < 0.01$ ). The results also showed an increase in the protein carbonyl content in the group with risk factors when compared with the healthy group ( $p < 0.01$ ), however, this elevation was lesser than that occurred in AMI patients.

### 3.3 Lipid peroxidation

The lipid peroxidation estimated by TBARS levels are shown in Figure 2. The TBARS levels showed an increase in lipid peroxidation in AMI patients when compared with the healthy group ( $p < 0.0001$ ) and the group with risk factors ( $p < 0.01$ ). When the group with risk factors was compared with the healthy group raised TBARS levels ( $p < 0.03$ ) were observed. However, these levels were lower than those occurred in AMI patients.

### 3.4 Antioxidant catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities

CAT activity was significantly increased in the AMI group and in the group with risk factors ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.001$ , respectively). The same occurred with SOD activity. There was an increase in the SOD activity in AMI patients ( $p < 0.0001$ ) and in the group with risk factors ( $p < 0.002$ ) when compared with the healthy group (Figures 3 and 4).

### 3.5 Levels of non-protein thiols in plasma and erythrocytes

Table 2 has shown non-protein thiol levels in plasma and erythrocytes of AMI and the control groups. Non-protein thiol levels were increased in the plasma of AMI patients when compared with the healthy group ( $p < 0.003$ ). There was no difference between the healthy group and the group with risk factors ( $p = 0.75$ ).

Non-protein thiol levels in erythrocytes were not significant when compared to the AMI patients and the healthy group ( $p = 0.11$ ). However, a decrease in the thiol levels in AMI patients occurred when compared with the group with risk factors ( $p < 0.03$ ).

### 3.6 Serum vitamin C and E content

Serum vitamin C content was reduced in both AMI patients and group with risk factors ( $p < 0.0001$ ) when compared with the healthy group. However, when AMI patients were compared with the group with risk factors a higher reduction in vitamin C levels in AMI patients was observed ( $p < 0.02$ ).

The serum vitamin E content was reduced in AMI patients and group with risk factors ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.001$ , respectively) when compared with the healthy group (Table 3).

## **4. Discussion**

A decrease in blood supply for the heart due to atherosclerosis, thrombosis, or coronary artery spasm is known to induce myocardial ischemia. Although reperfusion of the ischemic myocardium during early stages is essential in preventing cardiac damage, it exerts deleterious effects after a certain critical period. These abnormalities are represented by contractile dysfunction, an increase in infarct size, ultrastructural damage, and changes in myocardial metabolism, which at a posterior stage leads to cell necrosis and increasing ROS production [23]. The cell necrosis that occurs in AMI might be revealed through an elevation of cardiac biomarkers (CK-MB and troponins), especially troponin [24]. Our results (Table 1) showed that all patients had an increase in serum biomarkers, probably due to ischaemia or hipoxia that resulted in cellular necrosis in AMI. Troponin is released into the bloodstream from 4 to 6 hours after AMI, peaks appear after approximately 18 to 24 hours, and the levels can continue elevated for up to 14 days. Assessment of troponin by automated assay is the most sensitive and specific method for diagnosing AMI [25].

The imbalance between ROS production and antioxidant defenses determines the degree of oxidative stress [26]. When there is an increase in ROS production or a decrease in the antioxidant defenses, this systemic antioxidant/pro-oxidant imbalance may lead to the accumulation of oxidative damage, which, in turn, may lead to a modification of cellular proteins, lipids, and DNA, reducing functional capacity and increasing the risk of disease [7, 26].

Protein carbonyl content is the most general indicator and by far the most commonly used marker of protein oxidation [8, 27]. Accumulation of protein carbonyls has been observed in several human diseases including coronary heart surgery [28]. In our study we observed elevated protein carbonyl levels in AMI patients that can disclose protein damage in consequence of AMI. ROS may damage all types of biological molecules. Oxidative damages to proteins, lipids, or DNA may be seriously deleterious and may occur concomitantly. However, proteins are likely to be the most immediate vehicle for triggering the oxidative damage on cells because they are often catalysts rather than stoichiometric mediators since the damaging effect on one molecule is greater than stoichiometric [8].

Lipid damage induces the phenomenon known as lipoperoxidation, which culminates in MDA formation [9]. Lipid peroxidation is a part of the normal metabolism. Increasing lipid peroxidation is thought to be a consequence of oxidative stress [9, 29]. Our results showed an increase in lipid peroxidation through TBARS levels in AMI patients. The same results were found by Senthil et al. [30] and Chamblee et al [31] in patients with cardiogenic shock complicating AMI and AMI patients, respectively. Lipid peroxidation has been hypothesized to be a major mechanism of ROS cell damage. It may alter intrinsic membrane properties due to physicochemical changes of oxidized lipids, or secondary to crosslinking and



polymerization of membrane components affected by MDA [32]. Paradies et al. [33] studied the reperfusion of rat hearts after a period of ischemia found an increase in mitochondrial membranes lipid peroxidation when compared to control hearts. Besides, the damage in the reperfusion of rat hearts was also higher than in ischemia alone, as a result of ROS generation.

When comparing the TBARS and carbonyl protein levels in patients with risk factors we observed an increase in relation to the healthy group, but the lipoperoxidation and carbonylation of protein was higher in AMI patients. These results suggest that lipid and protein damage observed in our study is a result of AMI pathology and not only to pathologies associated with AMI as for example, hypertension, diabetes mellitus, and cigarette smoking. In addition, we found that TBARS and protein carbonyl content are positively correlated with troponin levels ( $r=0.45$  and  $r=0.36$ ,  $p<0.01$ , respectively) in AMI patients. These findings reinforce that the increase in oxidative stress is associated with the infarction size and cellular damage caused by ROS produced during the ischaemia/reperfusion moment.

Free radical-scavenging enzymes such as SOD and CAT are the first line of cellular defense against oxidative injury, decomposing  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  before interacting to form the more reactive hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) [10]. Akila et al. [34] showed that the activity of CAT significantly increased after reperfusion, suggesting that the antioxidant defense system protects the cell against reactive species. High levels in SOD and CAT activities were found in patients with coronary heart disease by Weinbrenner et al. [35] and Kesavulu et al. [36], respectively. We have also observed an increase in SOD and CAT activities in whole blood of AMI patients. The possible explanation for this is that the rise in SOD and CAT activity could be a compensatory mechanism of the body by preventing tissue damage caused by

oxidative stress [36]. In disagree with our results, Senthil et al. [30] and Pandey et al. [37] observed decreasing SOD and CAT activities in the erythrocyte of cardiogenic shock patients and in human blood platelets in myocardial infarction. These findings may be explained by a decrease in antioxidant enzymes followed by an increase in their activity levels after reactive species generation conditions, such as myocardial injury followed by reperfusion [38].

Non-protein thiols have an important function in the protection against ROS. Among non-protein thiols, GSH plays an important role in the antioxidant defense system by scavenging reactive species and regenerating other antioxidants [11]. Previous studies on AMI evaluated plasma thiol groups as total-SH content and interpreted the decrease as a marker of increased oxidation and an indirect sign of higher oxidative stress [39]. However, our study demonstrated a rise in the non-protein thiol levels in the plasma of AMI patients when compared with the healthy group. Other experimental data suggest that the overexpression of the enzyme glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and delays the progression to overt heart failure [40]. The raised blood GSH levels seen in our AMI patients compared with the control groups could result from a depressed enzymatic activity of glutathione peroxidase due to a rise of oxidative stress [40]. In relation the results of thiols levels in erythrocytes no significant difference was observed between AMI patients and the others groups.

Vitamin C is the primary antioxidant in plasma and cells to be depleted under conditions of oxidative stress [12]. Our results, in accordance with other studies [12, 30, 41], demonstrated a decrease in vitamin C in AMI patients. This decrease could be due to the increasing utilization of vitamin C as an antioxidant defense against ROS.

Vitamin E is an important membrane constituent of cardiac muscle which halts lipid peroxidation by acting as a peroxy radical trapping, a chain breaking antioxidant. It is the only endogenous lipid soluble antioxidant and a stabilizer of the lipid bilayer of cell membranes, where it interacts with phospholipases to reduce membrane rearrangements [42]. The low vitamin E levels found in our study are in accordance with other studies [30, 31, 41] and could be due either to the increasing utilization in scavenging the oxyradicals generated or due to the decreased vitamin C concentration since there is a well-established interaction between vitamin E and vitamin C, as previously reported [12].

A family history of ischemic heart disease, cigarette smoking, hypertension, and diabetes mellitus has been associated with an excess risk of AMI and an increasing oxidative stress [3, 43]. We observed an increase in antioxidant enzymatic defenses and a decrease in nonenzymatic defenses (especially vitamin C and E) in group with risk factors compared to the healthy group, but when compared with AMI patients this mobilization of the antioxidant system was lesser than that occurred in AMI. This fact occurred probably because the damage caused by AMI was higher than the damage caused by hypertension or smoking.

In order to exclude a direct effect of drugs commonly used for the treatment of AMI, we investigated the influence of acetylsalicylic acid and clopidogrel in oxidative stress and antioxidants. Acetylsalicylic acid is an antiplatelet drug that interferes with the metabolism of cyclic prostanoids by irreversible inhibition cyclooxygenase, which is a key enzyme in the pathway of synthesis of thromboxane A<sub>2</sub> [3]. Clopidogrel is an antiplatelet compound that has recently been shown to be effective in the secondary prevention of cardiovascular complications of atherosclerosis. Clopidogrel is a thienopyridine, whose active metabolites are known as platelet ADP-receptor

blockers [44]. At a concentration even higher than that found therapeutically, these medicines do not alter oxidative stress or antioxidants (data not shown). Therefore, these findings support the argument that the pathological condition in AMI is responsible for the increased oxidative stress levels and a mobilization of the antioxidant enzymatic system.

Taken together, these results suggest that an increase of oxidative stress in AMI patients occurred as a result of an imbalance between the oxidants and the antioxidants. Another aspect is that the oxidative stress observed in AMI patients is not only due to an oxidative stress residual caused by risk factors or medicines utilized by these patients, but also due to the state pathology that is generated by this disease. A complementary therapy using antioxidants could help to prevent the damage caused by ROS in AMI, but this should be investigated.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and Dr. Romualdo Bolzani dos Santos for the interest dedicated to this work.

### **References**

[1] Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA* 2003; 290: 932-40.

[2] Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. *Heart* 2002; 88: 119–24.

[3] Kasper DN, Braunwald E, Fauci AS, Hauser S, Longo DL, Jameson JL. *Harrison medicina interna*. Rio de Janeiro. Academic Press; 2006. p. 1514-1530.

[4] Espat NJ, Nelton WS. Oxygen free radicals, oxidative stress, and antioxidants in critical illness. *Support Line* 2000; 22:11-20.

[5] Kasparova S, Brezova V, Valko M, et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem Int* 2005; 46: 601–611.

[6] Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. Role of xanthine oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002;106: 3073–3078.

[7] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 500-508.

[8] Donne ID, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23– 38.

- [9] Lazzarino G, Raatikainen P, Nuutinen M, et al. Myocardial release of malondialdehyde and purine compounds during coronary bypass surgery. *Circulation* 1994; 90: 291–297.
- [10] Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hatac T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47:446–456.
- [11] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA 1999: 936.
- [12] Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 88: 6377– 6381.
- [13] Canbaz S, Duran E, Ege T, Sunar H, Cikirikcioglu M, Acipayam M. The effect of intracoronary administration of vitamin E on myocardial ischemia-reperfusion injury during coronary artery surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 51: 57 – 61.
- [14] Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 2005; 100: 179-190.
- [15] Levini RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464–478.

[16] Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 251–256.

[17] Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972; 49: 474–478.

[18] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.

[19] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70–77.

[20] Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EMM, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and ascorbic changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacolol Toxicol* 2001; 88: 119-125.

[21] Hansen LG, Warwick WJ. A fluorometric micromethod for serum vitamins A and E. *Am J Clin Pathol* 1969; 51: 538-541.

[22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 218-254.

[23] Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E. Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 1983; 68: 8–15.

[24] Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schatman M, McCabe CH, Cannon CP, et al. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1996; 335: 1342–1349.

[25] Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 959 –969.

[26] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-47.

[27] Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 2000; 33: 99-108.

[28] Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Sitte N, Grune T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1080–1086.



[29] Kumari SS, Menon VP. Changes in concentrations of lipid peroxides and activities of superoxide dismutase and catalase in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Ind J Exp Biol* 1987; 25: 419– 423.

[30] Senthil S, Veerappan RM, Ramakrishna RM, Pugalendi KV. Oxidative stress and antioxidants in patients with cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 2004; 348: 131-137.

[31] Chamblee BB, Timm TC, Hunsaker LA, Vander Jagt DL. Relationship of oxidative stress indices to decreased LDL-cholesterol after acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2000; 23: 423-426.

[32] Esterbauer H, Shauer RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81–128.

[33] Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero F. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 42-50.

[34] Akila BD, Vishwanath P, D'souza V. Oxidative injury and antioxidants in coronary artery bypass graft surgery: Off-pump CABG significantly reduces oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2007; 375: 147-152.

[35] Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, et al. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003; 168: 99-106.

[36] Kesavulu MM, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pr* 2001; 53: 33-39.

[37] Pandey NR, Kaur G, Chandra M, Sanwal GG, Misra MK. Enzymatic oxidant and antioxidants of human blood platelets in unstable angina and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2000; 76: 33-38.

[38] Zhou X, Zhai X, Ashraf M. Direct evidence that initial oxidative stress triggered by preconditioning contributes to second window of protection by endogenous antioxidant enzyme in myocytes. *Circulation* 1996; 93: 1177-1184.

[39] Mc Murray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* 1993; 14: 1493–1498.

[40] Campolo J, De Maria R, Caruso R, et al. Blood glutathione as independent marker of lipid peroxidation in heart failure. *Int J Cardiol* 2007; 117: 45-50.

[41] Singh RB, Pella D, Neki NS, et al. Mechanisms of acute myocardial infarction study (MAMIS). *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 111-115.

[42] Janero DR, Burghardt B. Cardiac membrane vitamin E and malondialdehyde levels in heart muscle of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 1989; 24: 33–38.

[43] Walter MF, Jacob RF, Jeffers B, Ghadanfar MM, Preston GM, Buch J, Mason RP. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1996-2002.

[44] Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Disp* 2002; 30: 1288– 95.

**Table 1** Clinical characteristics and cardiac biomarkers of healthy group, group with risk factors and Acute Myocardial Infarction (AMI) patients.

Variable	Healthy Group n=20	Risk Factors n=20	AMI n=40
Age(years)	52.08 ± 9.83	48.73 ± 4.22	55.83 ± 9.25
Men	55%	35%	60%
Women	45%	65%	40%
Hypertension	-	45%	58%
Smoker	-	85%	70%
Family history	-	40%	60%
CK elevation (UI)	<232	<232	1.395 ± 109.70
CK-MB elevation (UI)	<24	<24	164.76 ± 32.90
Troponins elevation (ng/ml)	<0.2	<0.2	112.31 ± 23.42

Continuous variables are presented as mean ± SEM and percentage of patients.

**Table 2** Comparison of nonenzymatic antioxidants levels between Acute Myocardial Infarction (AMI) patients, group with risk factors and healthy control group (means  $\pm$  SEM).

Variable	Healthy Group	Risk Factors	AMI
Non protein thiol ( $\mu\text{mol/ml}$ plasma)	$0.77 \pm 0.034$	$0.74 \pm 0.048$	$1.02 \pm 0.055$
$p^a$		0.75	<0.003
$p^b$			<0.001
Non protein thiol ( $\mu\text{mol/ml}$ erythrocytes)	$4.90 \pm 0.24$	$5.20 \pm 0.33$	$4.23 \pm 0.28$
$p^a$		0.50	0.11
$p^b$			<0.03
Vitamin C ( $\mu\text{mol/l}$ serum)	$64.77 \pm 3.77$	$48.23 \pm 4.14$	$38.03 \pm 2.12$
$p^a$		<0.001	<0.0001
$p^b$			<0.02
Vitamin E ( $\mu\text{mol/l}$ serum)	$17.97 \pm 1.07$	$13.57 \pm 1.17$	$12.68 \pm 0.54$
$p^a$		<0.001	<0.0001
$p^b$			0.48

<sup>a</sup> compared to the healthy group.

<sup>b</sup> compared to the group with risk factors.

Fig. 1

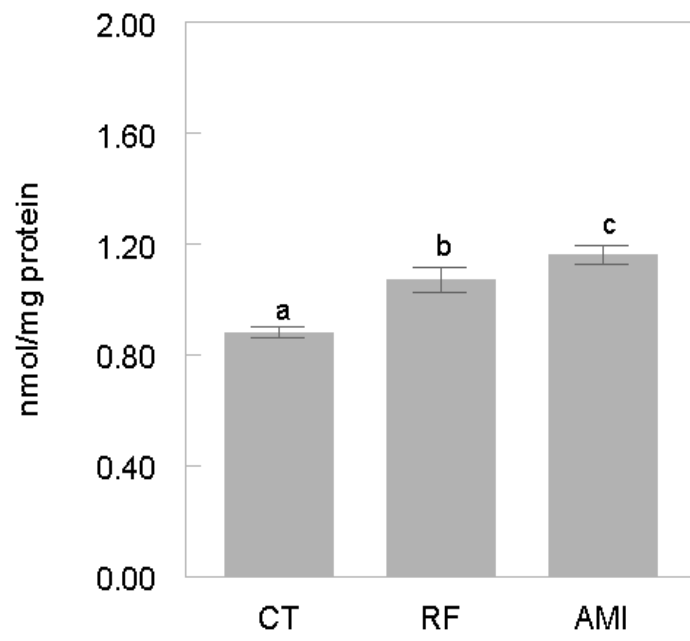


Fig. 2

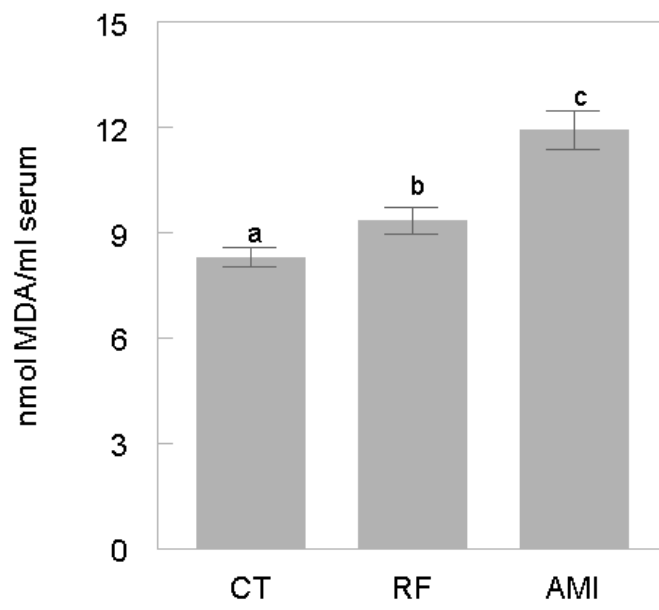


Fig. 3

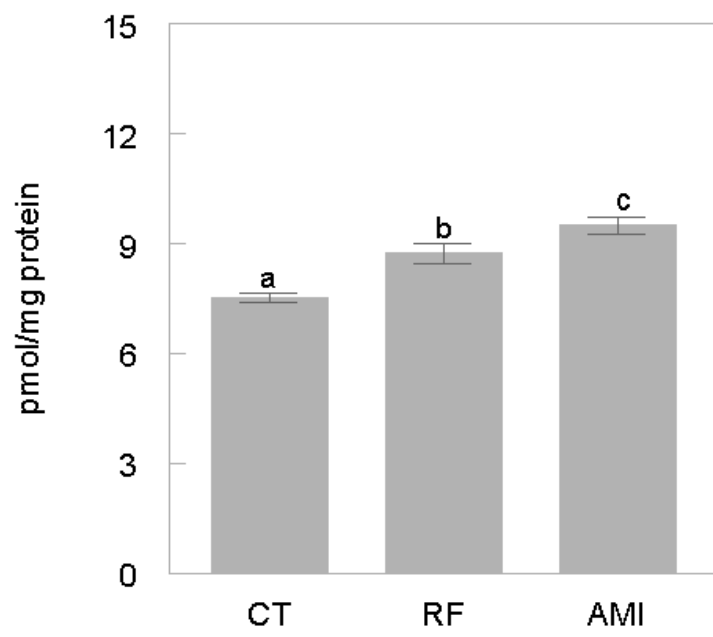
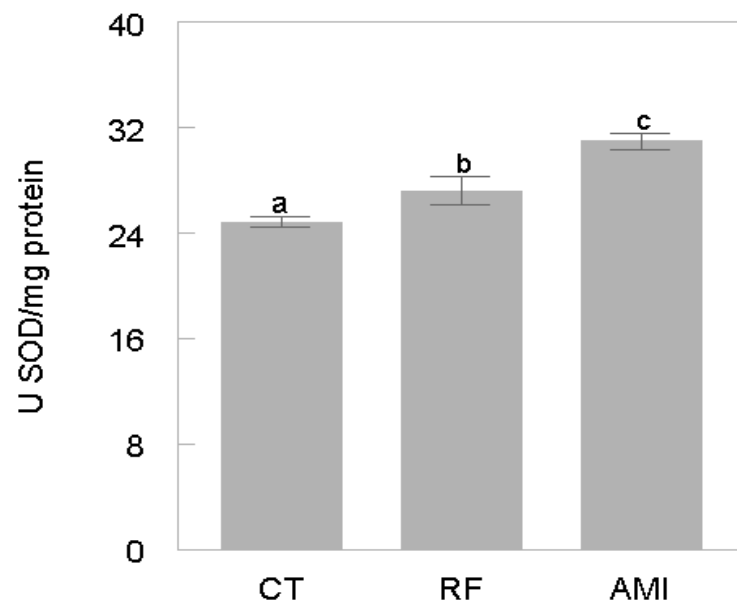




Fig. 4



## Legends

Fig.1 Carbonyl Protein content in serum of healthy control (CT), risk factors (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as means  $\pm$  SEM nmol/mg protein. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: (<sup>b</sup>)  $P < 0,02$  versus healthy control and (<sup>c</sup>)  $P < 0,0001$  versus healthy control.

Fig. 2 TBARS levels in serum of healthy control (CT), risk factors (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as means  $\pm$  SEM nmol MDA/ml serum. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: (<sup>b</sup>)  $P < 0,03$  versus healthy control and (<sup>c</sup>)  $P < 0,0001$  versus healthy control.

Fig. 3 Catalase activity in total blood of healthy control (CT), risk factors (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as means  $\pm$  SEM pmol/mg protein. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: (<sup>b</sup>)  $P < 0,001$  versus healthy control and (<sup>c</sup>)  $P < 0,0001$  versus healthy control.

Fig. 4 Superoxide dismutase activity in total blood of healthy control (CT), risk factors (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as means  $\pm$  SEM U SOD/mg protein. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: (<sup>b</sup>)  $P < 0,03$  versus healthy control and (<sup>c</sup>)  $P < 0,0001$  versus healthy control.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos o envolvimento de enzimas denominadas ectonucleotidases nos processos de tromboregulação e o estresse oxidativo em pacientes com IAM. As ectonucleotidases são enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares para seus respectivos nucleosídeos (ROBSON et al., 2006), contribuindo dessa forma para equilíbrio dos eventos pró-trombóticos. O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção e a degradação de espécies reativas, levando a danos deletérios em todo o organismo (DHALLA et al., 2000).

O IAM é caracterizado por dois principais eventos; ruptura da placa aterosclerótica, resultando em um evento trombótico e conseqüentemente um aumento na agregação plaquetária, e a isquemia ou hipóxia resultante da oclusão coronária (KEELEY & HILLIS, 2007). Quando ocorre a oclusão de uma artéria coronária previamente afetada pela aterosclerose, parte do coração irrigado por essa artéria torna-se isquêmico e ocorre um processo de necrose e morte celular (KEELEY & HILLIS, 2007). Neste momento proteínas como CK, CK-MB e troponinas são liberadas na circulação e se constituem nos marcadores do IAM (HAMM et al., 1992; ANTMAN et al., 1996). Nossos resultados demonstraram um aumento nos marcadores séricos cardíacos em todos os pacientes estudados, comprovando o diagnóstico de IAM.

Entretanto, o organismo dispõe de muitos mecanismos endógenos que reforçam a barreira vascular durante o momento de isquemia. Entre eles a produção de adenosina pelas enzimas que hidrolisam os nucleotídeos de adenina exerce papel de fundamental importância (MINAMINO et al., 1996). Os resultados presentes neste estudo demonstraram um aumento na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em pacientes com IAM quando comparados com o grupo controle, o que sugere um aumento na atividade dessas enzimas.

É bem conhecido que as plaquetas estão fortemente associadas com a tromboregulação e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BHATT & TOPOL, 2002). Quando ativadas, as plaquetas liberam substâncias ativas como o ADP. O ADP é um dos principais fatores responsáveis pela indução da agregação plaquetária (QAWI & ROBSON, 2000). A associação das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase pode promover a hidrólise do ATP, ADP e AMP, levando a formação de adenosina (RAMAMURTHI et al., 2001). A adenosina tem sido relatada como

importante cardioprotetor devido suas propriedades vasodilatadoras e anti-agregante plaquetária (BOROWIEC et al., 2006).

Além disso, estudos têm demonstrado que a geração de adenosina extracelular tem sido amplamente implicada como uma resposta adaptativa a momentos de hipóxia e isquemia (GNAIGER, 2001; O'FARRELI, 2001). É geralmente aceito que a desfosforilação do AMP pela enzima 5'-nucleotidase representa o maior caminho da formação da adenosina extracelular durante o decréscimo da suplementação de oxigênio como no IAM (LINDEN, 2001).

Dessa forma o aumento da atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase no IAM poderia estar relacionado a uma resposta orgânica compensatória, com o objetivo de aumentar a produção de adenosina.

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais existe uma produção constante de EROs acompanhada pela sua contínua inativação, através de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. A extensão e os tipos de danos causados pelas EROs depende tanto da quantidade como da natureza das mesmas, bem como das defesas antioxidantes das células (DAVIES, 1991). O desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e das defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos, provoca uma variedade de mudanças fisiológicas em proteínas, lipídios e DNA, chamadas coletivamente de estresse oxidativo (CROFT, 1998; FINKEL & HOLBROOK, 2000; GIORDANO, 2005).

Estudos têm demonstrado que o momento de reperfusão no IAM após a isquemia, pode levar a danos ao coração como geração de estresse oxidativo (KLONER et al., 1983; GARLICK et al., 1987; ZWEIER et al., 1987; BOLLI et al., 1988; DAS & MAULIK, 2003). Nossos resultados revelaram a geração de estresse oxidativo em pacientes com IAM demonstrado através da elevação dos marcadores de dano aos lipídios e proteínas, bem como um aumento nas defesas antioxidantes enzimáticas e um decréscimo das defesas antioxidantes não-enzimáticas.

A determinação do conteúdo de proteína carbonil é um dos mais utilizados indicadores de oxidação proteica (CHEVION et al., 2000; DONNE et al., 2003). Neste estudo observamos elevados níveis de proteína carbonil em pacientes com IAM quando comparados com o grupo controle. Níveis aumentados de proteína carbonil também foram verificados em nosso laboratório em diferentes patologias como câncer (MALDONADO et al., 2006), insuficiência renal crônica (SILVA et al.,

2007), acidente vascular cerebral (CORREA et al., 2007) e leucemia linfoblástica aguda (BATTISTI et al., 2008) demonstrando que o conteúdo de proteína carbonil pode ser utilizado como marcador de dano oxidativo protéico em muitas patologias, incluindo o IAM.

Danos aos lipídios causados por EROs induzem o fenômeno conhecido como peroxidação lipídica, o qual culmina com a formação de MDA (LAZZARINO et al., 1994). Nossos resultados estão de acordo com outros estudos (SENTHIL, 2004; CHAMBLEE, 2000) que demonstraram elevados níveis de TBARS em soro de pacientes com IAM, quando comparados com o grupo controle. A peroxidação lipídica tem sido citada como o maior mecanismo das EROs em produzir dano as membranas celulares (ESTERBAUER et al., 1991).

Os antioxidantes com alto potencial redutor, assim como as enzimas antioxidantes intracelulares são parte do mecanismo de proteção do organismo a fim de superar a formação de espécies pró-oxidantes durante a isquemia/reperfusão (ZIMMERMANN et al., 2004). Enzimas como a SOD e a CAT se constituem na primeira linha de defesa celular contra a injúria provocada pelas EROs (DHALLA et al., 2000). AKILA et al. (2007) sugerem que a atividade da CAT aumentada após o momento de reperfusão no IAM indica que esse sistema de defesa antioxidante protege a célula contra as espécies reativas. Altos níveis de SOD e CAT também foram encontrados em pacientes com DAC por WEINBRENNER et al. (2003) e KESAVULU et al. (2001), respectivamente. Os resultados obtidos no nosso estudo também demonstraram um aumento na atividade da SOD e CAT em sangue total de pacientes com IAM. Uma possível explicação para tais resultados, é que o aumento da atividade dessas enzimas poderia ser um mecanismo compensatório do organismo frente ao dano celular causado pelo estresse oxidativo (KESAVULU et al., 2001).

Também colaboram na proteção do organismo frente aos danos causados pelas EROs as defesas antioxidantes não-enzimáticas. Entre elas citamos os tióis não-protéicos, vitamina C e vitamina E, os quais foram alvos de estudo neste trabalho. Entre os tióis não-protéicos a GSH desempenha papel de fundamental importância como “scavenger” de espécies reativas e na regeneração de outros antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Além disso, a GSH participa na decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), potencialmente tóxico, que é convertido em  $H_2O$  em reação catalisada pela GSHPx (GUL et al., 2000). Estudos

realizados em pacientes com IAM demonstraram uma diminuição dos níveis de tióis não-protéicos como um marcador do aumento do estresse oxidativo (MC MURRAY et al., 1993). Entretanto, observamos neste trabalho um aumento nos níveis de tióis não-protéicos no plasma de pacientes com IAM. Esse aumento poderia ser resultado da inibição da atividade da GSHPx, devido aos altos níveis de espécies reativas circulantes, o que provocaria acúmulo de GSH (CAMPOLO et al., 2007).

As vitaminas C e E têm sido relatadas como importantes defesas antioxidantes não enzimáticas devido as suas propriedades de neutralizar diretamente as EROs e proteger as membranas da peroxidação lipídica, respectivamente (MACHLIN & BENDICH, 1987; ROSS & MOLDEUS, 1991; MAYNE, 2003). Em concordância com outros estudos (FREI et al., 1989; CHAMBLEE et al., 2000; SENTHIL et al., 2004; SINGH et al., 2004) nossos resultados demonstraram uma diminuição nos níveis plasmáticos de ambas as vitaminas estudadas. Essa diminuição pode ser devido a um aumento da utilização desses antioxidantes. Outra hipótese seria o fato de uma diminuição nos níveis de vitamina C ser responsável pela diminuição dos níveis de vitamina E, já que a vitamina C regenera  $\alpha$ -tocoferóis (FREI et al., 1989).

Também foi observado neste estudo, alta prevalência dos fatores de risco para o IAM como tabagismo, hipertensão, história familiar e diabetes mellitus, os quais poderiam estar gerando o estresse oxidativo na população estudada. Entretanto, nossos resultados revelaram que o aumento do estresse oxidativo em pacientes controles com fatores de risco associados foi menor que o aumento do estresse oxidativo em pacientes com IAM. Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo observado em pacientes com IAM pode ser devido ao estado patológico formado.

Além disso, para excluir possíveis efeitos das drogas utilizadas no tratamento do IAM, como AAS e clopidogrel, sobre a atividade das ectonucleotidases e sobre os parâmetros de estresse oxidativo, foi avaliado *in vitro* o efeito desses medicamentos nas concentrações plasmáticas atingidas (TENDERA & WOJAKOWSKI, 2003; RICHTER et al., 2004). Os resultados obtidos não demonstraram efeito sobre os parâmetros testados quando concentrações plasmáticas foram utilizadas. Esses resultados estão de acordo com HERBET et al. (1994) e LUNKES et al. (2003).

Em resumo, pode-se concluir que apesar de ter localização definida, o IAM resulta em uma desordem sistêmica que provoca alterações bioquímicas, as quais

podem ser detectadas perifericamente pela medida de indicadores do estresse oxidativo e medida da atividade de ectonucleotidasas.

## 5. CONCLUSÕES

- Ocorreu um aumento nas atividades das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com IAM. Isso poderia estar relacionado a uma resposta orgânica compensatória, com o objetivo de aumentar a produção de adenosina, tendo em vista o papel cardioprotetor da mesma.
- Observou-se um aumento nos níveis de TBARS e conteúdo de proteína carbonil, o que sugere o aumento da formação de EROs nessa patologia, principalmente no momento de isquemia/reperfusão.
- O aumento dos indicadores de defesa antioxidante enzimáticas, estimados pela atividade da SOD e CAT sustenta a ocorrência do estresse oxidativo nos pacientes com diagnóstico de IAM. Esses antioxidantes poderiam atuar como um mecanismo compensatório frente ao aumento do estresse oxidativo.
- A diminuição das defesas antioxidantes não-enzimáticas reveladas pelos níveis de vitaminas C e E representa um maior consumo das mesmas durante o IAM, o que demonstra haver produção aumentada de EROs nessa patologia.
- Não se observou influência das drogas utilizadas no tratamento do IAM nas concentrações plasmáticas sobre os parâmetros testados *in vitro*, dessa forma conclui-se que os resultados obtidos não foram em decorrência do uso dos medicamentos testados.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.E.; ABENDSCHEIN, D.R.; JAFFE, A.S. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990. **Circulation**, v. 88, p.750-63, 1993.

AKILA, B.D.; VISHWANATH, P.; D'SOUZA, V. Oxidative injury and antioxidants in coronary artery bypass graft surgery: Off-pump CABG significantly reduces oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 375, p. 147-152, 2007.

ALESSIO, H.M. Exercise-induce oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, p. 218-224, 1993.

ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical in Biology & Medicine**, v.39, p. 297-316, 2005.

ALPERT, J.S; THYGESEN, K.; ANTMAN, E.; BASSAND, E. Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. **Journal of American College of Cardiology**, v. 36, p. 959-69, 2000.

AL-SHAER, M. H.; CHOUEIRI, N. E.; SULEIMAN, E. S. The pivotal role of cholesterol absorption inhibitors in the management of dyslipidemia. **Lipids Health Diseases**, v. 3, n. 22, p.1-6, 2004.

ALTMAN, R.; AZNAR, J.; ROUVIER, J.; SCAZZIOTA, A.; REUSSIER, R. **Thrombosis y hemostasia, Revista Iberoamericana**, v. 3, p. 20-21, 1995.

ANDREWS, R.K.; SHEN, Y.; GARDINER, E.G. The glycoprotein Ib- IX-V complex in platelet adhesion and signaling. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 357-364, 1999.

ANTITHROMBOTIC TRIALISTS' COLLABORATION J. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. **BMJ**, v. 324, p. 71– 86, 2002.

ANTMAN, E.M.; TANASIJEVIC, M.J.; THOMPSON, B.; SCHAFFMAN, M.; MCCABE, C.H.; CANNON, C.P.; FISCHER, G.A.; FUNG, A.Y.; THOMPSON, C.; WYBENGA, D.; BRAUNWALD, E. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 1342–1349, 1996.

ARAÚJO, M.C.; ROCHA, J.B.T.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 421-426, 2005.

APPLE, F.S. Acute myocardial infarction and coronary reperfusion. Serum cardiac markers for the 1990. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 97, p. 217-226, 1992.

APPLE, F.S.; WU, A.H.B.; MAIR, J.; RAVKILDE, J.; PANTEGHINI, M.; TATE, J.; PAGANI, F.; CHRISTENSON, R.H.; MOCKEL, M.; DANNE, O.; JAFFE, A.S. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 810–824, 2005.

AWTRY, E.H.; LOSCALZO, J. Aspirin. **Circulation**, v. 10, p. 1206– 1218, 2000.

AZZAZY, H.M.E.; CHRISTENSON, R.H. Cardiac markers of acute coronary syndromes: is there a case for point-of-care testing? **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 13–27, 2002.

BABUIN, L.; JAFFE, A.S. Troponin: the biomarker of choice for the detection of myocardial injury. **Canadian Medical Association Journal**, v. 173, p. 1191–1202, 2005.

BAKKER, W.W.; POELSTRA, A.; BARRADAS, K.; MIKHAILIDIS, M.A. Platelets and ectonucleotidases. **Platelets**, v. 5, p. 121–129, 1994.

BATLOUNI, M. Ativação plaquetária e trombose arterial. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 60, n.6, p. 425-431,1993.

BATTISTI, V.; MADERS, L.D.K.; BAGATINI, M.D.; SANTOS K.F.; SPANEVELLO, R.M.; MALDONADO, P.A.; BRULÉ, A.O.; ARAÚJO. M.C; SCHETINGER. M.R.C.; MORSCH, V. M. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clinical Biochemistry**, In press, 2008.

BEAL, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 32, p. 797-803, 2002.

BECKER, L.B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. **Cardiovascular Research**, v. 61, p. 461–470, 2004.

BECKER, R.C. Thrombosis and the role of the platelet. **American Journal of Cardiology**, v. 83, p. 3-6, 1999.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Effect of vitamin C supplementation on plasma vitamin C and E levels. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 8, p. 207-210, 1999.

BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 20313-20316, 1997.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase in the cardiovascular system: Molecular mechanisms and pathophysiologic implications. **Journal of Physiology**, v. 55, p. 589–606, 2004.

BERTRAND, M.E.; SIMOONS, M.L.; FOX, K.A.; WALLENTIN, L.C.; HAMM, C.W.; MCFADDEN, E.; DE FEYTER, P.J.; SPECCHIA, G.; RUZYLLO, W. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. **European Heart Journal**, v. 23, n. 23, p. 1809-40, 2002.

BHATT, D. L.; STEG, P. G.; OHMAN, E. M.; HIRSCH, A.T, IKEDA, Y.; MAS, J. L.; GOTO, S.; LIAU, C. S.; RICHARD, A. J.; ROTHER, J.; WILSON, P. W. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. **Journal of the American Medical Association**, v. 295, p. 180-189, 2006.

BHATT, D.L.; TOPOL, E.J. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. **Nature Reviews**, v. 2, p. 15-28, 2002.

BIOGONESSE, F; LÉVESQUE, S.A.; LULKUSKI F.; LECKA, J.; ROBSON, S.C.; FERNANDES, M.J.; SEVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, v.43, p.5511-5519, 2004.

BIRK, A.; BROEKMAN, M.; GLADEK, E.; ROBERTSON, H.; DROSOPOULOS, J.; MARCUS, A.; SZETO, H. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.140, p.166-175, 2002.

BLUESTEIN, B.; PARSONS, G.; FOSTER, K. Increased concentrations of cardiac troponin I are equivalent to increased cardiac troponin T in identifying chest pain patients at short-term risk of myocardial infarction. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1785-1786, 1998.

BOLLI, R.; PATEL, B.S.; JEROUDI, M.O.; LAI, E.K.; MCCAY, P.B. Demonstration of free radical generation in “stunned” myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alaphenyl N-tert-butyl nitron. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82, p. 476-485, 1988.

BONAN, C.D.; SCHETINGER, M.R.C.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. Ectonucleotidases and synaptic plasticity: implications in physiological and pathological conditions. **Drug Development Research**, v. 52, p. 57–65, 2001.

BONITHON-KOPP, C. COUDRAY, C.; BERR, C.; TOUBOUL, P. J.; FEVE, J. M. ; FAVIER, A.; DUCIMETIERE, P. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on Carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y: The EVA Study. Etude sur le Vieillissement Arteriel. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 121-7, 1997.

BOROWIEC, A.; LECHWARD, K.; TKACZ-STACHOWSKA, K.; SKTADANOWSKI, A. Adenosine as a metabolite regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 2, p. 269-278, 2006.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, gene expression and cellular function**. Marcel Decker: New York, v. 105, p. 1-25, 1997.

BRAUNWALD, E.; ANTMAN, E.M.; BEASLEY, J.W.; CALIFF, R.M.; CHEITLIN, M.D.; HOCHMAN, J.S.; JONES, R.H.; KEREIAKES, D.; KUPERSMITH, J.; LEVIN, T.N.; PEPINE, C.J.; SCHAEFFER, J.W.; SMITH, E.E. III; STEWARD, D.E.; THEROUX, P.; et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction—summary article: a report of the American College of Cardiology/ American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). **Journal of American College of Cardiology**, v. 40, n. 7, p. 1366-1374, 2002.

CAMPOLO, J.; DE MARIA, R.; CARUSO, R. Blood glutathione as independent marker of lipid peroxidation in heart failure. **International Journal of Cardiology**, v. 117; p. 45-50, 2007.

CASTRO, S.V. **Anatomia Fundamental**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1985.

CAPRIE STEERING COMMITTEE. A randomised, blinded trial of clopidogrel vs aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). **Lancet**, v. 348, p. 1329-39, 1996.

CAVUSOGLU, E.; CHENG, J.; BHATT, R.; KUNAMNENI, P.B.; MARMUR, J.D.; ENG, C. Clopidogrel in the management of ischemic heart disease. **Heart Diseases**, v. 5, p. 144-52, 2003.

CHAMBLEE, B.B.; TIMM, T.C.; HUNSAKER, L.A.; VANDER JAGT, D.L. Relationship of oxidative stress indices to decreased LDL-cholesterol after acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v. 23, p. 423-426, 2000.

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 725-731, 1993.

CHERUBINI, A.; RIGGIERO, C.; POLIDORI, C.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 39, p. 841-852, 2005.

CHEVION, M.; BERENSHTEIN, E.; STADTMAN, E.R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. **Free Radical Research**, v. 33, p. 99-108, 2000.

COADE, S.B.; PEARSON, J.D. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. **Circulation Research**, v. 65, p. 531-537, 1989.

CORREA, M.C.; MALDONADO, P.; DA ROSA, C.S.; LUNKES, G.; LUNKES, D.S.; KAIZER, R.R.; AHMED, M.; MORSCH, V.M.; PEREIRA, M.E.; SCHETINGER, M.R.C. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, In press, 2007.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoides and phenolic acids. **Towards Prolongation of the Healthy Life Span**, v.854, p. 435-443, 1998.

DAS, D.K.; MAULIK, N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 420, p. 305-311, 2003.

DAVÍ, G.; PATRONO, C. Platelet Activation and Atherothrombosis. **New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 2482 -2494, 2007.

DAVIES, K.J.A. An overview of oxidative stress. **IUBMB Life**, v. 50, p. 241-244, 2000.

DAVIES, K.J.A. **Oxidative damage & repair: Chemical, biological and medicinal aspects**. Oxford: Pergamon, 1991, p. 910.

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **The Biochemical Journal**, v. 324, p 1-18, 1997.

DELANTY, N.; REILLY, M.P.; PRATICO, D.; LAWSON, J.A.; MCCARTHY, J.F.; WOOD, A.E.; OHNISHI, S.T.; FITZGERALD, D.J.; FITZGERALD, G.A. 8-epi PGF2a generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. **Circulation**, v. 95, p. 2492-2499, 1997.

DHALLA, N.S.; ELMOSELHI, A.B.; HATAC, T.; MAKINO, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 446–456, 2000.

DHALLA, N.S.; TEMSAH, R.M.; NETTICADAN, T. Role os oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v. 18, p. 655-673, 2000.

DIETSCHY, J. M.;TURLEY, S. O.; SPADY, D. K. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species including humans. **Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 1637–1639, 1993.

DONNE, I. D.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta** , v. 329, p. 23-38, 2003.

DOUGLAS, A.S.; RUSSEL, D.; ALLAN, T.M. Seasonal, regional and secular variations of cardiovascular and cerebrovascular mortality in New Zealand. **Journal Medical of New Zealand**, v.20, p.636-638,1991.

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

DUNWIDDIE, T.; MASINO, S. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v.24, p.31-55, 2001.

ECKARDSTEIN, A. V.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis: pole of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 13 – 27, 2001.

ENJYOJI, K.; SÉVIGNY, J.; LIN, Y.; FRENETTE, P.S.; CRISTIE, P.D.; ESCH, A.M.; IMAI, M., EDELBERG, J.M.; RAYBURN, H.; LECH, M.; BEELER, D.L.; CSIZMADIA, E.; WAGNER, D.D.; SIMON, C. Target disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase result in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v.5, p. 1010-1017, 1999.

ESPAT, N.J.; NELTON, W.S. Oxygen free radicals, oxidative stress, and antioxidants in critical illness. **Support Line**, v. 22, p. 11-20, 2000.

ESTERBAUER, H.; SHAUER, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, p. 81–128, 1991.

FARBER, J.L.; KYLE, M.E., COLEMANN, J.B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory Investigation**, v. 62, p. 670-678, 1990.



FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-47, 2000.

FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 6377-6381, 1989.

GAETANO, G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. **Haematologica**, v. 4, p. 349-356, 2001.

GAYLE III, R.B.; MALISZEWSKI, C.R.; GIMPEL, S.D.; SCHOENBON, M.A.; GAPARV, R.G.; RICHARDS, C.; BRASSEL, K.; PRICE, V.; DROSOPOULOS, J.H.F.; ISLAN, N.; ALYONYCHEVA, T.N.; BROEKMAN, M.J.; MARCUS, A.J. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n. 9, p.1851-1859,1998.

GHOSH, S.; PULINILKUNNIL, T.; YEN, G.; KEWALRAMANI, G.; AN, D.; QI, D.; ABRAHANI, A.; RODRIGUES, B. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. **American Journal of Physiology**, v. 289, p. 768-776, 2005.

GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: Dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. **Respiratory Physiology**, v. 128, p. 277-297, 2001.

GARLICK, P.B.; DAVIES, M.J.; HEARSE, D.J. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. **Circulation Research**, v. 61, p. 757-760, 1987.

GEY, K.F.; PUSKA, P.; JORDAN, P.; MOSER, U.K. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 326-334, 1991.

GIORDANO, F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 500-508, 2005.

GORDON, D.O.L. Venous and arterial thrombosis: epidemiology and risk factors at various ages. **The European Menopause Journal**, v.47, p.259-263, 2004.

GUIMARÃES, H.P.; AVEZUM, A.; PIEGAS, L.S. Epidemiologia do Infarto Agudo do Miocárdio. **Revista Sociedade de Cardiologia Estado de São Paulo**, v. 1, p. 1-7, 2006.

GUL, M.; KUTAY, F. Z.; TEMOCIN, S.; HAANNINEN, O. Cellular and Clinical implications of glutathione. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 38, p. 625-634, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3. ed. **NY: Oxford University Press**, 1999, p. 936.

HAMM, C.W.; RAVKILDE, J.; GERHARDT, W.; JORGENSEN, P.; PEHEIM, E.; LJUNGDAHL, L.; GOLDMANN, B.; KATUS, H.A. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, p. 146–150, 1992.

HANSSON, G.K.; SEIFERT, P.S.; OLSSON, G.; BONDJERS, G.; Immunohistochemical detection of macrophages and T lymphocytes in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 11, p. 745–750, 1991.

HARKER, L.A.; MARZEK, U.M.; KELLY, A.B; CHRONOS, N.R.F; SUNDELL, IB.; HANSON, S.R.; HERBERT, J.M. Clopidogrel inhibition of stent, graft and vascular

thrombogenesis with antithrombotic enhancement by aspirin in non-human primates. **Circulation**, v. 98, p. 2461–9, 1998.

HARRIS, A.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Oxidative stress, alpha-tocopherol therapy, and atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 4, p. 373-80, 2002.

HERBERT, J.M.; BERNAT, A.; SAMAMA, M.; MAFFRAND, J.P. The antiaggregating and antithrombotic activity of ticlopidine is potentiated by aspirin in the rat. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 76, p. 94–8, 1996.

HERBERT, J.M. Clopidogrel and antiplatelet therapy. Expert Opin. **Investigational New Drugs**, v. 3, p. 449-455, 1994.

HERBERT, J.M.; DOL, F.; BERNAT, A. The antiaggregating and antithrombotic activity of clopidogrel is potentiated by aspirin. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 80, p. 512–508, 1998.

HERBERT, J.M.; SAVI, P.; MAFFRAND, J.P. Biochemical and pharmacological properties of Clopidogrel: a new ADP receptor antagonist. **European Heart Journal Supplements**, v.1, p. 31–40, 1999.

HUNSUCKER, S.A.; MITCHELL, B.S.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, p. 1-30, 2005.

JORDÃO, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

KAM, P. C.; NETHERY, C.M. The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical development. **Anaesthesia**, v. 58, p.25-35, 2003.

KANNEL, W.B.; HIGGINS, M. Smoking and hypertension as predictors of cardiovascular risk in population studies. **Journal of Hypertension Supplement**, v. 8, p. 3-8, 1990.

KASHYAP, M. K.; YADAV, V., SHERAWAT, B. S.; JAIN, S.; KUMARI, S.; KHULLAR, M.; SHARMA, P. C.; NATH, R. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, p. 89-99, 2005

KASPAROVA, S.; BREZOVA, V.; VALKO, M.; HORECKY, J.; MLYNARIK, V.; LIPTAJ, T. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. **Neurochemistry International**, v. 46, p. 601–611, 2005.

KASPER, D.N.; BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.S.; HAUSER, S.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L. **Harrison Medicina Interna**. Rio de Janeiro. Academic Press; 2006. p. 1514-1530.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v.6, p.2157-2162, 2000.

KEELEY, E.C.; HILLIS, L.D. Primary PCI for Myocardial Infarction with ST-Segment Elevation. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, p.47-54, 2007.

KESAVULU, M.M.; RAO, B.K.; GIRI, R.; VIJAYA, J.; SUBRAMANYAM, G.; APPARAO, C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 53, p. 33-39, 2001.

KIP, K.E.; FAXON, D.P.; DETRE, K.M.; YEH, W.; KELSEY, S.F.; CURRIER, J.W. For the Investigators of the NHLBI PTCA Registry. Coronary angioplasty in diabetic patients. **Circulation**, v.94, p. 1818–1825, 1996.

KITAKAZE, M.; HORI, M.; SATO, H.; TAKASHIMA, S.; INOUE, M.; KITABATAKE, A.; KAMADA, T. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. **Circulation Research**, v.69, n. 5, p.1402-1408,1991.

KLONER, R.A.; ELLIS, S.G.; LANGE, R.; BRAUNWALD, E. Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. **Circulation**, v. 68, p. 18-15, 1983.

KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 48, p. 439-446,1996.

LAHOZ, C.; MOSTAZA, J.M. Atherosclerosis as a Systemic Disease. **Revista Española de Cardiología**, v. 60, n. 2, p. 184-95, 2007.

LANDMESSER, U.; SPIEKERMANN, S.; DIKALOV, S. TATGE, H.; WILKE, R.; KOHLER, C.; HARRISON, D.G.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. Role of xanthine oxidase and extracellular superoxide dismutase. **Circulation**, v. 106, p. 3073–3078, 2002.

LAZZARINO, G.; RAATIKAINEN, P.; NUUTINEN, M.; et al. Myocardial release of malondialdehyde and purine compounds during coronary bypass surgery. **Circulation**, v. 90, p. 291–297, 1994.

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998, v I e II, p.2623.

LÉON, C.; HECHLER, B.; VIAL, C.; LERAY, C.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, C. The P2Y receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. **FEBS Letters**, v. 403, p. 26-31, 1997.

LESSA, I. Assistência Médica e Óbitos por Doença Arterial Coronariana no Brasil, 1980-1999. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.81, p. 329-35, 2003.

LIBBY, P. Changing concepts of atherogenesis. **Journal of International Medical Research**, v. 247, p. 349–358, 2000.

LIEBLER, D.C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. **Critical Reviews Toxicology**, v. 23, p. 147-169, 1993.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection. **Annual Review of Pharmacology in Toxicology**, v. 41, p. 775-787, 2001.

LOPEZ, A.D. Assessing the burden of mortality from cardiovascular diseases. **World Health Stat Q**, v. 46, p. 91-96, 1993.

LORENZI, T.F.; AMICO, E.; DANIEL, M.M.; SILVEIRA, P.A.A.; BUCCHERI, V. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3<sup>a</sup> ed., Ed. Medsi., Rio de Janeiro, 2003.

LUNKES, G.I.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, V.M.; MAZZANTTI, C.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, p. 189– 194, 2003.

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, v. 1, p. 441-445, 1987.

MALDONADO, P.A.; NEGRINI, L.A.; KAIZER, R.R.; ZANIN, R.F.; ARAÚJO, M.M.; BATTISTI, V.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M.R.C. Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p. 174-78, 2006.

MASELLA, R., DI BENEDETTO, R., VARI, R., FILESI, C., & GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p. 577–586, 2005.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **Journal Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MC MURRAY, J.; CHOPRA, M.; ABDULLAH, I.; SMITH, W.E.; DARGIE, H.J.; Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. **European Heart Journal**, v. 14, p. 1493–1498, 1993.

MAGGIRWAR, S.B.; DHANRAJ, D.N.; SOMANI, S.M.; RAMKUMAR, V. Adenosine acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n.2, p. 508-515, 1994.

MANOHARAN, S.; KALANJIAPPAN, K.; KAYALVIZHI, M. Enhanced Lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in the erythrocytes of patients with cervical carcinoma. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 699 – 707, 2004.

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.F.; ISLAM, N.; PISNKY, D.J.; SESTI, C.; LEVI, R. Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 1, p. 2497– 2509, 2003.

MAREZIN, N.; EL-HABASHI, N.; HOARE, G.S.; BUNDY, R.E.; YACOUB, M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 420, p. 222-236, 2003.

MATTES, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MATTES, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603, 1999.

MAYNE, S. T. Antioxidants nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 933-940, 2003.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-60, 1983.

MINAMINO, T.; KITAKAZE, M.; MORIOKA, T. NODE, K.; KOMAMURA, K.; TAKEDA, H.; INOUE, M.; HORI, M.; KAMADA, T. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. 238–244, 1996.

MOSCA, L.; RUBENFIRE, M.; MANDEL, C.; ROCK, C.; TARSHIS, T.; TSAI, A.; PEARSON, T. Antioxidant nutrient supplementation reduces the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. **Journal of American College of Cardiology**, v.30, n.2, p. 392-9, 1997.

MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. **The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from disease, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020**. Cambridge: Harvard University Press; 1996.

NATHAN, D.M.; LACHIN, J.; CLEARY, P.; ORCHARD, T.; BRILLON, D.J.; BACKLUND, J.Y.; O'LEARY, D.H.; GENUTH, S. Diabetes control and complications trial; epidemiology of diabetes interventions and complications research group. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* v. 348, n. 23, p. 2294–2303, 2003.

NEAL, B.; MACMAHON, S.; CHAPMAN, N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. **Lancet**, v. 356, p. 1955-1964, 2000.



NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

O'FARRELL, P.H. Conserved responses to oxygen deprivation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 671-674, 2001.

PARK, J.L.; LUCCHESI, B.R. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 68, p. 1905-1912, 1999.

PIEGAS, L.S.; AVEZUM, A.; PEREIRA, J.C.R.; et al., On behalf of the AFIRMAR study investigators. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. **American Heart Journal**, v. 146, p. 331-338, 2003.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225–230, 1996.

QAWI, I.; ROBSON, S.C. New developments in anti-platelet therapies: potential use of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase in thrombotic disorders. **Current Drug Targets**, v. 1, p. 285-296, 2000.

QUINN, M.J.; FITZGERALD, D.J. Ticlopidine and clopidogrel. **Circulation**, v. 100, p. 1667-1672, 1999.

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; PUCSOK, J.; SASVARI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 27, p. 69-74, 1999.

RAMAMURTHI, A.; ROBSON, S.C.; LEWIS, R.S. Effects of nitric oxide (NO) and soluble nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) on inhibition of platelet deposition in vitro. **Thrombosis Research**, v. 102, p. 331–341, 2001.

RAMASAMY I. Inherited bleeding disorders: disorders of platelet adhesion and aggregation. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, p. 1–35, 2004.

RAMKUMAR, V.; NIE, Z.; RYBAK, L.P.; MAGGIRWAR, S.B. Adenosine antioxidant enzymes and cytoprotection. **TIPS**, v.16, p. 283-285, 1995.

REMIJIN, J.; WU, Y.; JENINGA, E.; IJSSELDIJK, M.; WILLIGEN, G.; GROOT, P.; SIXMA, J.; NURDEN, A.; NURDEN, P. Role of ADP receptor P2Y<sub>12</sub> in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.22, p. 686-691, 2002.

RICHTER, T.; MÜRDTER, T.E.; HEINKELE, G.; PLEISS, J.; TATZEL, S.; SCHWAB, M.; EICHELBAUM, M.; ZANGER U.M.; Potent Mechanism-Based Inhibition of Human CYP2B6 by Clopidogrel and Ticlopidine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, p. 189-197, 2004.

RIEMERSMA, R.A.; WOOD, D.A.; MACINTYRE, C.C.; ELTON, R.A.; GEY, K.F.; OLIVER, M.F. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E, and carotene. **Lancet**, v. 337, p. 1–5, 1991.

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

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **The New England Journal Medicine**, v. 340, p. 115, 1999.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. **Antioxidant defense systems and oxidative stress**. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 1991, p. 151-170.

ROZALSKI, M.; NOCUN, M.; WATALA, C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets – potencial new targets for antiplatelet therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v.52, p.411-415, 2005.

SAHGER, D.; CERCEK, B.; CANNON, C. P.; ET AL. How do smokers differ from non smokers in their response to trombolysis. **American Journal of Cardiology**, v. 75, p. 232-236, 1995.

SAKAI, A.; KUME, N.; NISHI, E.; TANOUE, K.; MIYASAKA, M.; KITA, T. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 17, p. 310–316, 1997.

SAVI, P.; LABOURET, C.; DELESQUE, N.; GUETTE, F.; LUPKER, J.; HERBERT, J.M. P2Y<sub>12</sub>, a new platelet ADP receptor, target of Clopidogrel. **Biophys Biochem Res Commun**, v. 283, p. 379–383, 2001.

SAVONITTO, S.; ARDISSINO, D.; GRANGER, C.B.; MORANDO, G.; PRANDO, M.D.; MAFRICI, A.; CAVALLINI, C.; MELANDRI, G.; THOMPSON, T.D.; VAHANIAN, A.; OHMAN, E.M.; CALIFF, R.M.; VAN DE, W.F.; TOPOL, E.J. Prognostic value of the admission electrocardiogram in acute coronary syndromes. **JAMA**, v. 281, n. 8, p. 707-13, 1999.

SCHETINGER, M.R.C.; VIEIRA, V.L.P.; MORSCH, V.M.; BALZ, D. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, p. 731– 41, 2001.

SEIZI, O. **Fundamentos de Toxicologia**. Segunda edição, Editora Ateneu, 2003 p.39-48.

SENTHIL, S.; VEERAPPAN, R.M.; RAMAKRISHNA, R.M.; PUGALENDI, K.V. Oxidative stress and antioxidants in patients with cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. **Clinica Chimica Acta**, v. 348, p. 131-137, 2004.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N.; GUCKELBERGER, O.; CSIZMADIA, E.; QAWI, I.; IAMI, M.; ZIMMERMAN, H.; ROBSON, S.C. Differential catalytic properties

and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1) and NTPDase 2 have implications for thromboregulation. **Blood**, v. 99, p. 2801-2809, 2002.

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHAROVSKY, R.; CÉZAR, L.A.M. Increase in mortality due to myocardial infarction in the Brazilian city of São Paulo during winter. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.78, n.1, p.106-109, 2002.

SHEBUSKI, R.J. Utility of point-of-care diagnostic testing in patients with chest pain and suspected acute myocardial infarction. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 160–164, 2002.

SHI, J.; KUKAR, T.; WANG, C.; LI, Q.; CRUZ P. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.17471-17478, 2001.

SIES H. Strategies of antioxidants defenses. **European Journal of Biochemistry**. v. 215, p. 213-219,1993.

SILVA, A.C.; MORSCH, A.L.B.; ZANIN, R.F.; CORRÊA, M.C.; ARANTES, L.C.; ARAUJO, M.C.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze nucleotides in chronic renal failure: Relationship between hemostatic defects and renal failure severity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1741, p. 282-288, 2005.

SILVA, A.C.; ROCHA, J.B.T.; MORSCH, A.L.B.; ZANIN, R.F.; KAIZER, R.; MALDONADO, P.A.; ARANTES, L.C.; SILVA, L.A.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Oxidative stress and  $\delta$ -ALA-D activity in chronic renal failure patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, In press, 2007.

SINGH, R.B.; PELLA, D.; NEKI, N.S.; CHANDEL, J.P.; RASTOGI, S.; MORI, H.; OTSUKA, K.; GUPTA, P. Mechanisms of acute myocardial infarction study (MAMIS). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 111-115, 2004.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1355, p.131-140, 1997.

STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1105–1112, 2004.

STAMLER, J. S.; SLIKVA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. 1-30, 1996.

STAMPFER, M.J.; RIMM, E. B. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p. 1365-1369, 1995.

STEFANINI, E.; KASINSKI, N.; CARVALHO, A.C. **Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar de Cardiologia**. 1ª ed. Barueri, SP: Manole, 2004, p. 195-224.

STREET, D. A.; COMSTOCK, G. W.; SALKELD, R. M.; SCHU"EP, W.; KLAG, M. J. Serum antioxidants and myocardial infarction. Are low levels of carotenoids and a-tocopherol risk factors for myocardial infarction? **Circulation**, v. 90, p.1154–1161, 1994.

TAILOR, A.; GRANGER, D.N. Hypercholesterolemia promotes P-selectin-dependent platelet–endothelial cell adhesion in postcapillary venules. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 675–680, 2003.

TAKANO, H.; ZOU, Y.; HASEGAWA, H.; AKAZAWA, H.; NAGAI, T.; KOMURO, I. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, p. 789-794, 2003.

TENDERA, M.; WOJAKOWSKI, W. Role of antiplatelet drugs in the prevention of cardiovascular events. **Thrombosis Research**, v. 110, p. 355-359, 2003.

The Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators (CURE). Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 494–502, 2001.

TOPOL, E.J. Acute myocardial infarction: Thrombolyses. **Heart**, v. 83, p. 122, 2000.

TORRES, B. B. **Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica**. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

TSCHOEPE, D.; ROESEN, P.; SCHWIPPERT, B.; GRIES, F.A. Platelets in diabetes: the role in the hemostatic regulation in atherosclerosis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 19, p. 122–128, 1993.

UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Sciences**, v. 51, p. 1083-1094, 1992.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical and Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VALKO, M. LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VAN DE, W.F.; ARDISSINO, D.; BETRIU, A.; COKKINOS, D.V.; FALK, E.; FOX, K.A.; JULIAN, D.; LENGYEL, M.; NEUMANN, F.J.; RUZYLLO, W.; THYGESEN, C.; UNDERWOOD, S.R.; VAHANIAN, A.; VERHEUGT, F.W.; WIJNS, W. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The

Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. **European Heart Journal**, v. 24, n. 1, p. 28-66, 2003.

VIEIRA, J.R.S. Hipercolesterolemia e risco genético para doença arterial coronária. **News Lab**, v. 72, p. 116-130, 2005.

VIEIRA, V.P.; ROCHA, J.B.T.; STEFANELLO, F.M.; BALZ, D.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Heparin and chondroitin sulfate inhibit adenine nucleotide hydrolysis in liver and kidney membrane enriched fractions. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 1193–201, 2001.

WEINBRENNER, T.; CLADELLAS, M.; COVAS, M.I.; FITÓ, M.; TOMÁS, M.; SENTÍ M.; BRUQUERA, J.; MARRUGAT, J. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v. 168, p. 99-106, 2003.

WU, A.H.B. Creatine kinase, isoenzymes, and variants. In: Wu AH, editor. **Cardiac markers**. New Jersey: Human Press, 1998. p. 113-25.

WU, A.H.B. Markers for early detection of cardiac diseases. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 65, n. 240, p.112–121, 2005.

ZHAO, Z.Q. Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 159-165, 2004.

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

ZIMMERMANN, C.; WINNEFELD, K.; STRECK, S.; ROSKOS, M.; HABERL, R. L. Antioxidant status in Acute Stroke Patients and Patients at stroke Risk. **European Neurology**, v.51, p. 157-61, 2004.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B.; HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**, v.32, p.421-425, 1998.

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

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and the other nucleotides. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 362, p. 299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.20, p.231-236, 1999.

ZIMMERMANN, H. 5'-nucleotidase: Molecular structure and functional aspects. **Biochemical Journal**, v. 285, p. 345-365, 1992.

ZWEIER, J.L.; FLAHERTY, J.T.; WEISFELDT, M.L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischaemic myocardium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 1404-1507, 1987.



## **7. ANEXOS**

### **7.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo um projeto de pesquisa intitulado: Avaliação da atividade da NTPDase e indicadores do estresse oxidativo em pacientes com infarto agudo do miocárdio, através da mestrandia Margarete Dulce Bagatini, orientada pela Prof<sup>a</sup> Dra. Vera Maria Morsch, que tem como objetivo avaliar a atividade de componentes sangüíneos, que se alteram durante o IAM , a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos no IAM. Justifica-se este estudo tendo em vista que as doenças cardiovasculares continuam sendo a primeira causa de morte no Brasil, sendo responsáveis por quase 32% de todos os óbitos no país, representando a terceira maior causa de internação. Os benefícios do estudo para os participantes é a possibilidade de verificar fatores predisponentes e envolvidos no IAM sendo esses informados e esclarecidos de atitudes preventivas que poderão tomar.

Os voluntários participantes da pesquisa permitirão uma coleta de sangue (punção venosa); um tubo com anticoagulante e um tubo de soro. Todo o material utilizado para a coleta será descartável e/ou desinfectado. Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação aos pacientes. Em caso de acidente de coleta, os pacientes poderão desenvolver flebite, hematoma local ou petéquias, neste caso serão atendidos e receberão os cuidados adequados. As amostras serão tratadas de acordo com os protocolos experimentais estabelecidos.

Fica garantido que os dados coletados ficarão sob responsabilidade do pesquisador e que os mesmos serão utilizados apenas para fins científicos, sem que o paciente seja identificado, garantindo assim o anonimato. A participação neste estudo é livre e voluntária, sendo que não haverá nenhuma forma de compensação financeira ou custos para o participante. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo ou comprometimento dos cuidados de saúde aos pacientes.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que estou de acordo em participar deste projeto de pesquisa, livre de qualquer constrangimento, pois fui informado de forma clara e detalhada dos objetivos e dos procedimentos que serão realizados. Fui igualmente informado da garantia de

receber respostas a qualquer dúvida que ainda puder ter sobre assuntos relacionados com a pesquisa, e da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízo de qualquer ordem.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu \_\_\_\_\_ estou de acordo em participar nesta pesquisa, assinando este consentimento.

Santa Maria, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Margarete Dulce Bagatini/ Pesquisadora/ (55)91422611

Vera Maria Morsch/ Orientadora/ (55)32208665

## 7.2 Anexo B – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Santa Maria  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Comitê de Ética em Pesquisa

### CARTA DE APROVAÇÃO

Título do Projeto de Pesquisa: “Avaliação da atividade da NTPDase e indicadores do estresse oxidativo em pacientes com infarto agudo do miocárdio”.

Número do Processo: 23081.012275/2006-32.

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0083.0.243.000-06

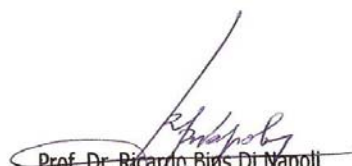
Pesquisador Responsável:

Nome: Vera Maria Morsch

Telefone: 055 3220 8665

Email: vmorsch@smail.ufsm.br

Projeto Aprovado em: 03/10/06.



Prof. Dr. Ricardo Bins Di Napoli  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa - UFSM