

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

**INTERFERÊNCIA DE VASODILATADORES NA
HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM
PLAQUETAS DE PACIENTES HIPERTENSOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniéle Sausen Lunkes

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**INTERFERÊNCIA DE VASODILATADORES NA HIDRÓLISE
DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM PLAQUETAS DE
PACIENTES HIPERTENSOS**

por

Daniéle Sausen Lunkes

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 obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Profa. Dra. Vera Maria Morsch
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Rosa Schetinger

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**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

**INTERFERÊNCIA DE VASODILATADORES NA HIDRÓLISE
DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM PLAQUETAS
DE PACIENTES HIPERTENSOS**

elaborada por
Daniéle Sausen Lunkes

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

BANCA EXAMINADORA:

Vera Maria Morsch, Dra.
(Presidente/Orientador)

Maria Beatriz Moretto, Dra. (UFSM)

Cinthia Melazzo Mazzanti, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 19 de janeiro de 2009.

DEDICATÓRIA

Ao Eugênio, à Jacinta, Darlene, Dariane e Gilberto

Aos meus pais, por suas palavras de incentivo, por seus ensinamentos e por seu exemplo de amor em toda minha vida. Às minhas irmãs, pela presença amiga e pelas palavras de apoio, em todas as etapas da jornada acadêmica. Ao meu esposo Gilberto, por seu estímulo em nunca desistir de um objetivo, bem como, por sua colaboração no percurso do mestrado e na formação do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me conceder a vida, a determinação, a superação, a fé e a energia necessária para realizar os meus ideais.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, apoio incondicional e pelos preceitos de dedicação e disciplina a mim proporcionado. Às minhas irmãs, por estarem sempre torcendo por mim e me incentivando a seguir sempre minhas metas.

Ao meu esposo Gilberto, obrigado pelo grande estímulo, amor, compreensão, confiança e pela imensa força. Agradeço-te também por estares ao meu lado nas horas mais difíceis.

À minha orientadora professora Dra. Vera Maria Morsch, pela disponibilidade, pela enorme paciência e persistente apoio para a conclusão do mestrado. Agradeço também a minha co-orientadora, Dra. Maria Rosa Schetinger, pela oportunidade proporcionada, de me inserir neste grupo de pesquisa, pela sua constante participação e argüição nas diretrizes deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pelos ensinamentos transmitidos, os quais permitiram acrescentar meu crescimento científico. A funcionária Angélica pela sua dedicação e presteza no atendimento.

Sou muito grata aos pacientes e seus familiares, pelo desprendimento em participar desta pesquisa e compartilhar suas histórias de vida.

Sejam também consignados os melhores agradecimentos aos colegas e incentivadores do Laboratório de Enzimologia, em especial a Maísa, a Paula, ao André e ao Rafael, pois a colaboração de vocês foi imprescindível para realização deste trabalho. Ao meu amigo Mushtaq Ahmed, pela inestimável ajuda na análise da cinética enzimática.

Não posso esquecer de agradecer aos colegas do Hemocentro de Cruz Alta pela valiosa contribuição, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma cooperaram para que este trabalho fosse possível e se consolidasse.

“A estrada para o sucesso não é uma reta, há uma curva chamada fracasso, um trevo chamado confusão, um quebra-molas chamado amigo, faróis de advertência chamados família e pneus furados chamados empregos. Mas... se você tiver um stepe chamado determinação, um motor chamado perseverança, um seguro chamado fé e um motorista chamado Jesus, você chegará a um lugar chamado sucesso.”

(Autor Desconhecido)

RESUMO

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

INTERFERÊNCIA DE VASODILATADORES NA HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM PLAQUETAS DE PACIENTES HIPERTENSOS

AUTORA: DANIÉLE SAUSEN LUNKES
ORIENTADOR: VERA MARIA MORSCH

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 19 de janeiro de 2009

O processo trombogênico que afeta os pacientes hipertensos está associado com mecanismos regulatórios presentes no endotélio vascular. Esses mecanismos envolvem o fator de relaxamento do endotélio, as ectonucleotidases e íons cálcio. Considerando que os vasodilatadores atuam em ambos, na pressão sangüínea e na homeostase, foi avaliada a interferência de diferentes vasodilatadores na atividade da NTPDase de plaquetas de hipertensos e pacientes saudáveis, com o objetivo de verificar a sensibilidade destes pacientes aos vasodilatadores. Além disso, foi determinado o comportamento cinético da NTPDase na presença do vasodilatador que apresentou maior influência inibitória. Os resultados mostraram uma diminuição na atividade da NTPDase na presença de arginina (0,025 mM – 3,0 mM), nitroprussiato de sódio (0,01 – 2,0 mM) e hidralazina (20,0 μ M – 90,0 μ M), quando testada para os substratos ATP e ADP em plaquetas do grupo hipertensos. Porém, a hidrólise dos substratos ATP e ADP aumentou quando testado na presença de arginina no grupo controle. Nenhum efeito foi observado sobre a atividade da enzima quando doses farmacológicas de captopril foram testadas *in vitro*. Estudos do comportamento cinético foram realizados na presença de nitroprussiato de sódio, o qual causou uma inibição mista. Os valores de K_m aumentaram e os de V_{max} diminuíram com o aumento da concentração de nitroprussiato de sódio. Os valores de IC_{50} foram 3,66 mM e 2,64 mM (grupo controle) e 2,08 mM e 3,15 mM (grupo hipertenso) para ATP e ADP, respectivamente. Os valores de K_i obtidos foram 0,167 mM e 0,325 mM para o grupo hipertensos, usando ATP e ADP como substrato, respectivamente. Contudo, baseado nos resultados encontrados, é possível sugerir que existe uma interação entre vasodilatadores, doadores de óxido nítrico e a inibição da hidrólise de nucleotídeos da adenina em plaquetas de pacientes hipertensos.

Palavras-chave: Hipertensão, vasodilatadores, NTPDase, parâmetros cinéticos.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduation Program on Biological Sciences:
Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

INTERFERENCE OF VASODILATORS IN THE HYDROLYSIS OF ADENINE NUCLEOTIDE ON PLATELETS OF HYPERTENSIVE PATIENTS

AUTHOR: DANIÉLE SAUSEN LUNKES
ADVISER: VERA MARIA MORSCH

Date and place of the defense: Santa Maria, January 19nd, 2009

The thrombogenic process that affects the hypertensive patient is associated with regulatory mechanisms present in the vascular endothelium. These mechanisms involve the release of a endothelium-derived relaxing factor, ectonucleotidases and calcium ions. Considering that vasodilators act both on blood pressure and on homeostasis, we evaluated the interference of different vasodilators on platelet NTPDase activity in hypertensive and healthy patients, with the objective of verifying patient sensitivity to vasodilators. In addition, the kinetic behavior of NTPDase was determined in the presence of the vasodilator that showed the greatest inhibitory influence. The results showed a decrease in NTPDase activity in the presence of arginine (0.025 mM – 3.0 mM), sodium nitroprusside (0.01 mM – 2.0 mM) and hydralazine (20.0 μ M – 90.0 μ M), when tested for ATP and ADP substrate. However, the hydrolysis of ATP and ADP substrates increased when tested in the presence of arginine in the control group. No effects on enzyme activities were observed when pharmacological doses of captopril were tested in vitro. Kinetic behavior studies were estimated in the presence of sodium nitroprusside, which caused a mixed inhibition. The K_m values increased and V_{max} decreased with increasing sodium nitroprusside concentrations. The IC_{50} values were 3.66 mM and 2.64 mM (control group) and 2.08 mM and 3.15 mM (hypertensive group) for ATP and ADP, respectively. The K_i values obtained were 0.345 mM and 2.00 mM for the control group and 0.167mM and 0.325 mM for the hypertensive group, using ATP and ADP as substrate, respectively. In conclusion, based on these results it is possible to speculate that there is an interaction between vasodilators, donors of nitric oxide, and the inhibition of adenine nucleotide hydrolysis on platelets of hipertensive patients.

Keywords: Hypertension, Vasodilators, NTPDase, kinetic parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1 – Circulação sistêmica e pulmonar	15
FIGURA 2 – Corte transversal de artéria com processo trombótico	19
FIGURA 3 – Os três componentes da função plaquetária (adesão, ativação e agregação)	21
FIGURA 4 – Mudança de forma e agregação das plaquetas	22
FIGURA 5 – Hipotética árvore filogenética dos membros da família das E-NTPDases	25
FIGURA 6 – Estrutura da NTPDase 1	26
FIGURA 7 – Estrutura molecular do vasodilatador arginina	27
FIGURA 8 – Estrutura molecular do vasodilatador nitroprussiato de sódio	29
FIGURA 9 – Estrutura molecular do vasodilatador hidralazina	30
FIGURA 10: Estrutura molecular do vasodilatador captopril	31

Artigo

FIGURE 1 – Effect of arginine on NTPDase activity from human platelet preparation of control and hypertensive groups with ATP (A) and ADP (B) as substrate.....	50
FIGURE 2 – Effect of SNP on NTPDase activity from human platelet preparation of control and hypertensive group with ATP (A) and ADP(B) as substrate.....	51
FIGURE 3 – Effect of hydralazine on NTPDase activity from human platelet preparation of control and hypertensive group with ATP (A) and ADP (B) as substrate.....	52
FIGURE 4 – Lineweaver – Burk representation of inhibition of NTPDase activity by SNP (1.0mM – 2.0mM) in platelet human preparation. (A) Control group in the presence of ATP substrate; (B) Control group in the presence of ADP substrate; (C) Hypertensive group in the presence of ATP substrate; (D) Hypertensive group in the presence of ADP substrate.....	54

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

TABELA 1 – Classificação de hipertensão arterial para maiores de 18 anos..... 17

Artigo

TABLE 1 - Effect of SNP on K_m and V_{max} of NTPDase activity in platelets of control and hypertensive group..... 47

TABLE 2 - K_i and IC_{50} values for NTPDase activity of platelets of control and hypertensive group..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenosina trifosfato

ADP – adenosina difosfato

NTPDase – nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

Ca²⁺ – cálcio

Mg²⁺ – magnésio

NO – óxido nítrico

cGMP – guanosina monofosfato cíclico

SNP – nitroprussiato de sódio

IP₃ – inositol trifosfato

DAG – diacilglicerol

ACRs – regiões conservadas da apirase

V_{max} – velocidade máxima

K_m – contaste de Michaelis

K_i – constante de dissociação

EROs – espécies reativas do oxigênio

NADH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A –Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73
ANEXO B – Aceite do artigo “Effect of different vasodilators on NTPDase activity in healthy and hypertensive patients”, no periódico “ Thrombosis Research”	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Sistema Cardiovascular	15
2.2 Hipertensão	16
2.2.1 Epidemiologia	16
2.2.2 Classificação	17
2.2.3 Fisiopatologia	18
2.3 Trombose	19
2.4 Plaquetas	20
2.4.1 Adesão	21
2.4.2 Ativação	22
2.4.3 Agregação	23
2.5 Nucleotídeos	23
2.6 NTPDase	24
2.7 Fármacos Vasodilatadores	27
2.7.1 Arginina	27
2.7.2 Nitroprussiato de sódio	28
2.7.3 Hidralazina	29
2.7.4 Captopril	30
2.8 Cinética Enzimática	31
3 ARTIGO CIENTÍFICO	33
4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	55
5 CONCLUSÃO	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERENCIAL	60
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam umas das maiores causas de morbidade na população brasileira, sendo responsáveis por aproximadamente 35% dos óbitos no Brasil (GUIMARÃES et al., 2006). A hipertensão arterial é uma síndrome hemodinâmica, complexa, desenvolvida a partir de alterações no fluxo sangüíneo e das interações entre mecanismos de vasoconstrição e substâncias secretadas pelo endotélio vascular (BARRETO et al., 2005). As complicações micro e macrovasculares são aceleradas pelo aumento da atividade das plaquetas e pela redução da função vasoprotetora.

A diminuição das concentrações de óxido nítrico, um fator de relaxamento do endotélio, pode induzir a vasoconstrição e ao recrutamento plaquetário no local de injúria vascular (NEGRO, 2008). A agregação de plaquetas é mediada por agonistas, como colágeno, ADP e tromboxano A₂, os quais se ligam aos receptores de membrana e ativam cascatas bioquímicas em plaquetas (PETIDIS et al., 2008). O aumento da concentração extracelular de nucleotídeos da adenina contribui para a ativação plaquetária e conseqüente, formação do trombo.

A enzima NTPDase catalisa a hidrólise de ATP e ADP e está envolvida nos processos de homeostasia, regulação do tônus vascular e respostas tromboregulatórias (SÉVIGNY et al., 2002; COSTA et al., 2004; MARCUS et al., 2005). O aumento da agregação plaquetária em pacientes hipertensos está relacionada com a atividade da enzima NTPDase (LUNKES et al., 2003). O tratamento da hipertensão pode normalizar os níveis da pressão arterial, bem como diversos parâmetros de ativação plaquetária (BLANN et al., 2003).

Os vasodilatadores são medicamentos que auxiliam na regulação da pressão arterial, por meio de diferentes mecanismos de ação. Esses fármacos atuam sobre o sistema vascular induzindo ao relaxamento da musculatura do endotélio (BATLOUNI & RAMIRES, 1999). Processos catabólicos podem ser influenciados pelos vasodilatadores, através do aumento da concentração de substâncias no meio extracelular (STAFYLAS & SARAFIDIS, 2008). A modulação dos níveis de

nucleotídeos extracelular pode iniciar uma importante via na patogênese da injúria vascular (GUCKELBERGER et al., 2004).

Os fármacos anti-hipertensivos, além de contribuir para a diminuição da pressão arterial, desempenham papel secundário na homeostase vascular. Entretanto, poucos trabalhos foram realizados para investigar as demais influências exercidas, por esses vasodilatadores, no meio vascular de pacientes hipertensos. Em virtude disso, é de grande interesse clínico e científico investigar a interferência desses medicamentos no processo de ativação plaquetária e de formação do trombo, através da atividade da NTPDase em pacientes hipertensos e saudáveis.

1.1 Objetivos

Analisar *in vitro* a interferência dos vasodilatadores arginina, nitroprussiato de sódio, hidralazina e captopril, na atividade da enzima NTPDase em pacientes hipertensos e saudáveis;

Determinar *in vitro* a cinética da enzima NTPDase frente ao vasodilatador que apresentar maior influência inibitória;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema Cardiovascular

O sistema cardiovascular é responsável pelo transporte de nutrientes, hormônios e oxigênio aos tecidos. Este sistema contribui para a homeostasia do organismo, suprindo todas as necessidades celulares. O sistema circulatório também realiza o transporte de produtos finais do metabolismo até os tecidos responsáveis pela sua excreção (DAMPNEY, 1994).

O sistema vascular é estruturado por meio de artérias, veias e capilares. O sangue é conduzido do coração ao organismo pelas artérias, enquanto as veias possibilitam o retorno do fluxo de sangue ao coração (FIGURA 1). Os capilares constituem um sistema capaz de realizar a troca de líquidos, eletrólitos e sangue entre artérias e veias (DIAS et al., 2002). O coração tem como principal função a propulsão do sangue para todo o corpo, por meio de uma rede de vasos sanguíneos. A circulação pulmonar permite as trocas gasosas entre os capilares e as paredes dos alvéolos, através do fluxo sanguíneo (GUYTON & HALL, 2002).

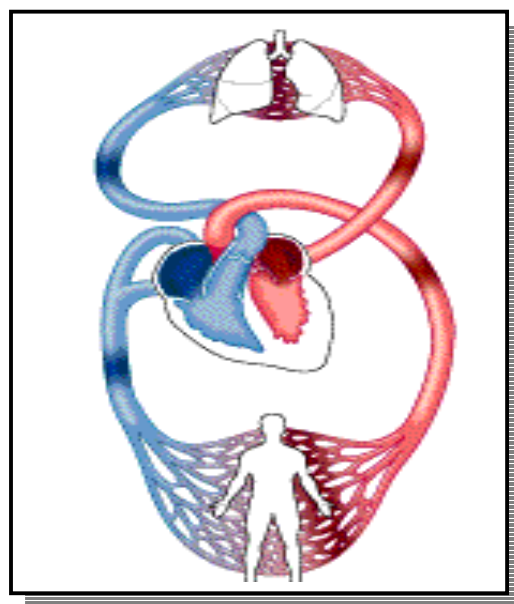


FIGURA 1 - Circulação sistêmica e pulmonar. (Adaptado CD O Corpo Humano 2.0. Globo Multimídia)

O endotélio vascular participa de forma preponderante no controle do fluxo sanguíneo, através da regulação do tônus vascular e da resistência periférica. A síntese e a liberação de compostos vasoativos pelas células endoteliais, são responsáveis pela manutenção da homeostase vascular (FAVARATO & LUZ, 2003). A injúria na parede do vaso sanguíneo promove uma intensa atividade metabólica, onde há liberação de ADP e amplificação do processo de ativação plaquetária (LEE et al., 1998).

2.2 Hipertensão

A hipertensão arterial é uma desordem circulatória caracterizada por um aumento dos níveis de pressão arterial sistêmica. Atualmente, constitui um dos grandes fatores de risco de morbidade entre as doenças não-transmissíveis. Essa profunda modificação do sistema circulatório possui relação direta e positiva com a perda funcional do sistema cardiovascular (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006; SUSIC & FROHLICH, 2008).

As alterações da função endotelial, das propriedades hemodinâmicas e das células circulantes, estão amplamente associadas à hipertensão arterial. O endotélio, em condições normais, forma uma superfície não trombogênica que impede a aderência de plaquetas e de outras células sanguíneas, bem como a ativação da cascata de coagulação (CARVALHO et al., 2001).

2.2.1 Epidemiologia

A hipertensão arterial sistêmica, como um fator de risco cardiovascular crescente na população adulta, constitui um dos maiores problemas de saúde pública. A população mais atingida por esta disfunção do sistema circulatório encontra-se na faixa etária entre 45 e 70 anos de idade (BILLET, 2008).

A prevalência de casos de hipertensão é elevada no Estado do Rio Grande do Sul e especula-se que sejam acometidos cerca de 30% dos indivíduos adultos (DÓREA & LOTUFO, 2004). Esses índices aumentam de forma progressiva com o envelhecimento, ultrapassando 70% na população idosa do Estado (LIBERMAN, 2007). A taxa de mortalidade por doenças do aparelho circulatório representa 35% do total de óbitos no Rio Grande do Sul (GUS et al., 2004).

No Brasil, estima-se que um terço da população adulta é hipertensa, com uma incidência de hipertensão arterial entre 22 e 43% da população (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006). Além disso, esta disfunção cardiovascular também é responsável por 30% dos casos de mortalidade no mundo (GUSMÃO et al., 2005).

2.2.2 Classificação

Os níveis pressóricos permitem determinar a condição cardiocirculatória, que pode variar de um quadro de normalidade até hipertensão severa. A pressão arterial sistêmica, com níveis sistólicos inferiores a 130 mmHg e diastólicos inferiores a 85 mmHg, diminui o risco de alteração cardiovascular (SILVA, 2007). Na tabela 1, estão dispostos os valores diagnósticos de hipertensão arterial para maiores de 18 anos, não hipertensos e sem co-morbidade associada.

TABELA 1 - Classificação de hipertensão arterial para maiores de 18 anos.

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130 – 139	85 – 89
Hipertensão estágio 1 (leve)	140 – 159	90 – 99
Hipertensão estágio 2 (moderada)	160 – 179	100 – 109
Hipertensão estágio 3 (grave)	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	≥ 90

Fonte: V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006

No estágio 1, a hipertensão, está pouco elevada e em consequência não há lesões em órgãos-alvo como coração, rim, pulmão e fígado. Na hipertensão moderada, os níveis pressóricos estão mais elevados e há um pequeno comprometimento do organismo. No estágio 3, a hipertensão apresenta-se com os níveis de pressão muito elevados e encontram-se evidentes alterações nos órgãos-alvo. Nos casos em que além da severidade da hipertensão, há um comprometimento do estado geral, poderá se manifestar um quadro de hipertensão maligna (CHOBANIAN et al., 2003).

2.2.3 Fisiopatologia

A patogênese da hipertensão é um processo multifatorial que envolve a interação de fatores genéticos e ambientais. A hipertensão não constitui somente um fator de risco para disfunções cardiovasculares, mas também contribui significativamente para o desenvolvimento de aterosclerose (ALEXANDER, 1995).

A sobrecarga do sistema cardiovascular, causada pelo aumento da pressão arterial e pela ativação de fatores intravasculares, leva a alterações estruturais de adaptação. O estreitamento da parede dos vasos sanguíneos e a mudança no metabolismo vascular aumentam a resistência do fluxo de sangue e a resposta aos estímulos vasoconstritores (MANO, 2007). O mecanismo que inicia a vasoconstrição é a inibição de vários canais de potássio, seguida de despolarização da membrana celular e entrada de cálcio para dentro da célula (BARRETO et al., 2005).

O sistema renina-angiotensina tem sido associado à fisiopatologia da hipertensão arterial desde a sua descoberta. A concentração de angiotensina II, um potente vasoconstritor, está frequentemente aumentado em pacientes com hipertensão. Níveis elevados da atividade da renina estão associados a maiores chances de complicações cardiovasculares (TELES et al., 2007).

A angiotensina II desencadeia vários mecanismos que estão intimamente associados a aterogênese e a trombose. A angiotensina II liga-se a receptores no músculo, resultando em ativação da fosfolipase C, o que pode aumentar o cálcio intracelular. A hipertensão aumenta a formação de peróxido de hidrogênio e radicais livres como, por exemplo, ânion superóxido (WÖLKART et al., 2004; LEE &

GRIENGLING, 2008). Essas substâncias reduzem a formação de óxido nítrico pelo endotélio e aumentam a adesão plaquetária (RUSSELL, 1999). A disfunção endotelial, que ocorre na hipertensão, refere-se à ausência da capacidade vasodilatadora em resposta a estímulos que aumentam a biodisponibilidade do óxido nítrico (TELES et al., 2007).

2.3 Trombose

A trombose é uma extensão patológica do processo normal de homeostasia. Os trombos são massas sólidas formadas no interior dos vasos, por constituintes do sangue, quando algum fator danifica a parede dos vasos sanguíneos (FIGURA 2). Essas placas podem obstruir o fluxo sanguíneo ou bloquear a oxigenação do sangue.

As desordens micro e macrovasculares envolvem complicações como trombose e aterosclerose, as quais podem ser aceleradas pela ativação plaquetária (WAJCHENBERG, 2002; BRYDON, 2006). O aumento da agregação plaquetária, assim como, a liberação de mediadores vasoativos são fatores que contribuem para a oclusão do vaso sanguíneo reduzindo a função vasoprotetora (DOCKRELL et al., 1999). A concentração elevada de adenina difosfato (ADP) e cálcio, presentes na obstrução vascular, promovem um recrutamento plaquetário à parede do vaso sanguíneo.

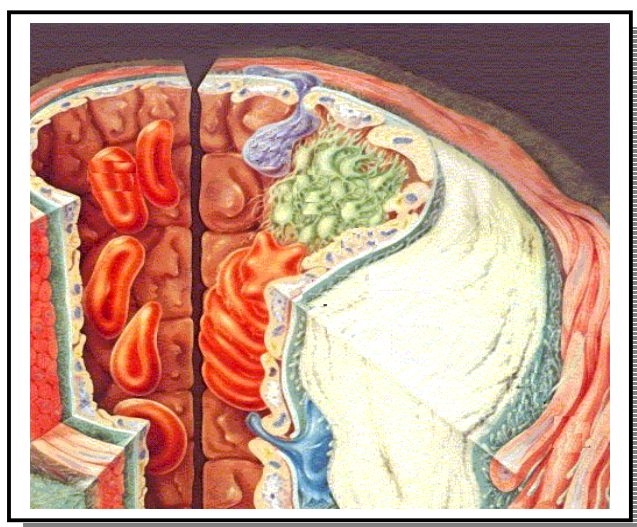


FIGURA 2 - Corte transversal de artéria com processo trombótico. Disponível em <http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/01/09/saude-geriatria/trombogenesis-arterial/>. Acessado em 10 de setembro de 2008.

A seqüência de eventos que envolvem a interação entre células endoteliais e as plaquetas são mediadas por meio da ligação de proteínas adesivas e receptores específicos (DENIS & WAGNER, 2007). As interações célula-célula geram reações enzimáticas com ativação de zimogênios, que se transformam em fatores de coagulação ativados (LOURENÇO, 1997). A cascata de reações que leva a ativação da coagulação e a formação do trombo se inicia com a ativação plaquetária. Esse processo culmina com a formação do agregado plaquetário e a rede de fibrina, constituintes básicos do trombo (WILLOUGHBY et al., 2002).

2.4 Plaquetas

A plaqueta é um fragmento citoplasmático, derivado do megacariócito, envolvido por membrana, com vida média de 7 a 10 dias. Essa célula é esférica, destituída de núcleo e composta por diversas organelas, como sistema canicular aberto e grânulos densos. Este sistema é responsável pela troca de substâncias com o meio externo. Pequenos filamentos de actina estão ligados a proteínas e conectados a membrana plasmática através de glicoproteínas (BLOCKMANS et al., 1995)

As plaquetas não têm capacidade de síntese protéica, mas possuem intensa atividade metabólica em nível de membrana (BATLOUNI, 1993). A liberação de agentes agregantes como ADP no meio extracelular, pode estimular a adesão, ativação e agregação plaquetária (FIGURA 3). A hidrólise do nucleotídeo ADP extracelular constitui uma importante via para limitar a agregação plaquetária e a formação de trombo (PILLA et al., 1996; ISHII-WATABE et al., 2000).

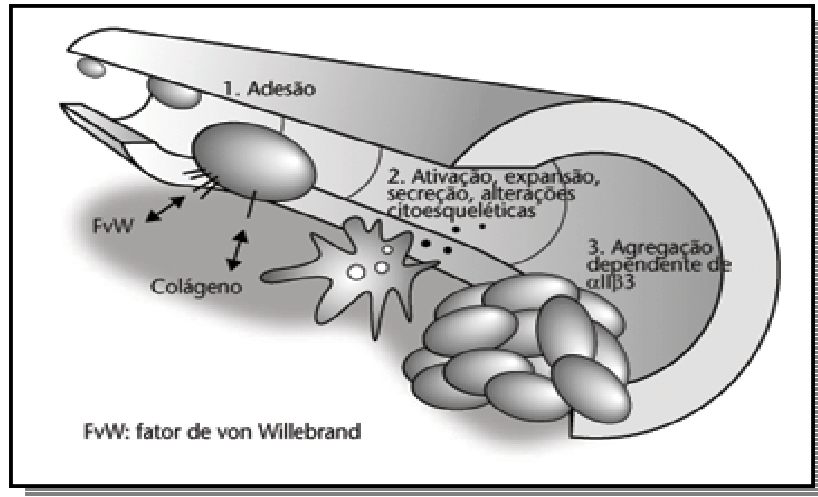


FIGURA 3 - Os três componentes da função plaquetária - adesão, ativação e agregação (Adaptado YIP et al., 2005).

2.4.1 Adesão

Em condições fisiológicas, as plaquetas não interagem com as outras células e não aderem ao endotélio vascular intacto (STEIN et al., 1989). Porém, quando a integridade do sistema vascular é rompida, uma parte das plaquetas circulantes se liga aos constituintes da matriz subendotelial exposta. A plaqueta apresenta diversos receptores de adesão, entre eles o complexo glicoprotéico, que se liga ao fator de Von Willebrand, ao colágeno e a P-selectina (CASTRO et al., 2006).

Uma vez que ocorre a ligação da plaqueta aos constituintes do subendotélio, é induzida uma sinalização intracelular que ativa a mudança conformacional da plaqueta. A adesão plaquetária à parede do vaso danificado é a primeira etapa do processo trombótico e envolve estruturas do subendotélio, receptores e proteínas plasmáticas. Nesta fase, uma série de alterações bioquímicas e ultra-estruturais é desencadeada e possui ação sinérgica à formação do trombo (LANGER & GAWAZ, 2008).

2.4 2 Ativação

Após o processo de adesão, as plaquetas ativadas sofrem uma alteração na sua forma natural discóide, para outra mais esférica, com protusões citoplasmáticas longas e irregulares, resultantes da associação paralela de filamentos de actina (FIGURA 4). As plaquetas projetam pseudópodes, aumentando a área de contato com o endotélio e se tornam mais firmemente ancoradas (VORCHHEIMER & BECKER, 2006). Os grânulos plaquetários são liberados e secretam seus conteúdos no plasma, entre eles produtos de oxidação do ácido araquidônico pela via cicloxigenase (PGH2 e seu produto, o tromboxano), serotonina e ADP (BATLOUNI, 1993).

A plaqueta ativada pode se acumular na parede dos vasos das artérias, recrutar plaquetas adicionais e expandir o trombo. Um importante componente da plaqueta é o receptor glicoproteína IIb/IIIa, expresso durante a ativação plaquetária, que junto com o fibrinogênio, desencadeia o processo de agregação plaquetária (RUSSELL, 1999).

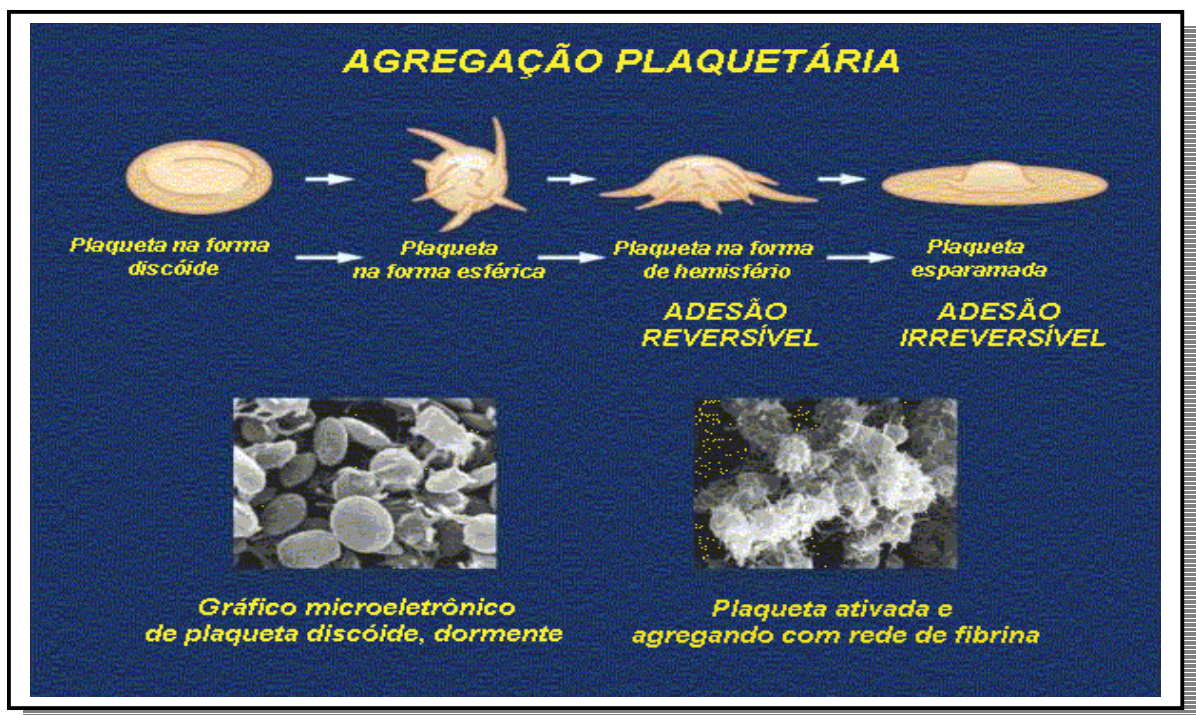


FIGURA 4 – Mudança de forma e agregação das plaquetas. (Adaptado KUWAHARA et al., 2002).

2.4.3 Agregação

A agregação plaquetária é a propriedade que as plaquetas possuem de unirem-se entre si e é responsável pelo crescimento do trombo plaquetário. Há três vias principais de agregação plaquetária, que se interrelacionam em várias etapas do processo.

Uma vez ativada, a plaqueta sofre ação de agonistas que se ligam a receptores de membrana da plaqueta e ativam cascatas bioquímicas. A primeira via de agregação se manifesta pela ação da fosfolipase C, que atua catalisando a formação de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ se liga aos receptores no sistema tubular denso, elevando a concentração citoplasmática de cálcio. O aumento dos níveis intracelulares de cálcio promove a contração da plaqueta, secreção de ADP e síntese de tromboxano A₂ (SOBOL & WATALA, 2000).

A segunda via de agregação plaquetária é mediada pelo ADP, o qual promove o recrutamento de outras plaquetas para o tampão plaquetário. A ligação do ADP ao receptor purinérgico de plaquetas leva a ativação da cascata da proteinoquinase de ativação mitogênica. Esta proteína induz a liberação de cálcio do sistema tubular denso para o citosol. O ADP caracteriza-se por ser um agente indutor da agregação plaquetária em presença de cálcio e fibrinogênio (VANNI et al., 2007).

A terceira via está envolvida com o ácido araquidônico, que é liberado da membrana plaquetária por ação da fosfolipase A₂ e fosfolipase C. O ácido araquidônico é rapidamente metabolizado pelas enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase, formando as prostaglandinas G₂ e H₂. Esses intermediários são convertidos, pela tromboxano sintetase, em tromboxano A₂, que é um potente agente agregante plaquetário (WAKEFIELD et al., 2008).

2.5 Nucleotídeos

Os nucleotídeos ATP e ADP estão envolvidos na modulação da homeostasia vascular e na regulação da função plaquetária. O ADP é o mais importante agonista natural, do recrutamento de plaquetas, presente na injúria vascular (PINSKY et al.,

2002). Em contrapartida, o ATP é um antagonista competitivo de todos os efeitos do ADP sobre o desenvolvimento do trombo (MARCUS et al., 2003).

Diversas respostas fisiológicas vasculares implicam na liberação de nucleotídeos da adenina, que atuam sobre a ativação plaquetária. A superfície da membrana da plaqueta expressa receptores purinérgicos tipo 2 (P2) chamados P_{2Y} (acoplados a proteína G) e P_{2X} (ligado a canais iônicos), ativados por ADP e ATP, respectivamente (GACHET, 2008). O receptor P_{2Y1} é responsável pela mobilização interna de cálcio e pela mudança de forma da plaqueta, o que inicia o processo de agregação plaquetária. Já o receptor P_{2Y12} completa a agregação, amplifica os efeitos induzidos pelo ADP e inibe a enzima adenilato ciclase (ERLINGE & BURNSTOCK, 2008). O ATP estimula um rápido influxo de cálcio intraplaqueta através de receptores P_{2X1} e pode alterar a função plaquetária sozinho ou em sinergismo com outros receptores (PACKHAM & MUSTARD, 2005).

A ação dos nucleotídeos ATP e ADP é mediada através de sua ligação aos purinoreceptores, na superfície das células endoteliais (MEGHJI et al., 1995). A alteração dos níveis de nucleotídeos extracelulares causados pelo aumento da expressão da CD39 pode representar um mecanismo tromboregulatório essencial para a vasculatura muscular. A estabilização da interação entre nucleotídeos e purinoreceptores, pode reverter a função das plaquetas, reduzida pelo processo de ativação plaquetária (ENJYOJI et al., 1999).

2.6 NTPDase

A enzima NTPDase (E.C.3.6.1.5, ATP-difosfohidrolase, ecto-ATPase, apirase, CD39), pertence a família das ectonucleotidases que catalisam a hidrólise de nucleotídeos extracelulares tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). Oito membros desta família já foram identificados e diferem quanto à especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (FIGURA 5). As NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão localizadas na superfície celular com o sítio catalítico voltado para a face extracelular. Já as NTPDases 5 e 6 tem expressão intracelular e as NTPDases 4 e 7 têm sua localização inteiramente intracelular, voltada para o lúmen da organela citoplasmática (ROBSON et al., 2006).

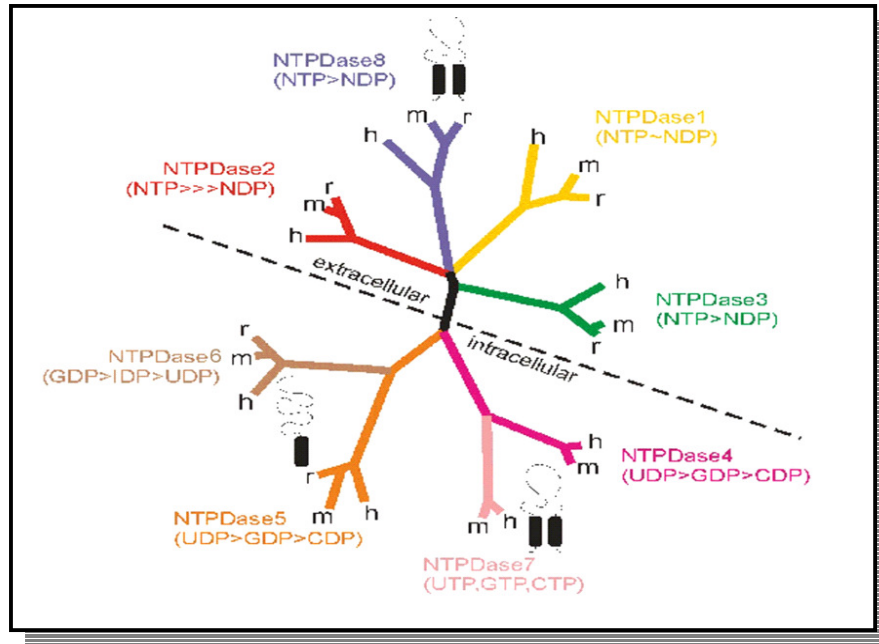


FIGURA 5 - Hipotética árvore filogenética dos membros da família das E-NTPDases. (Adaptado ROBSON et al., 2006).

As ectonucleotidases possuem um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões que são conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACRs), que são de extrema importância para a atividade catalítica e ligação com substrato específico. Alterações na estrutura quaternária e interação das subunidades podem afetar a interação de ACRs envolvendo a ligação e hidrólise do substrato (GRINTHAL & GUIDOTTI, 2006).

A enzima NTPDase 1 está firmemente ancorada na membrana através dois domínios transmembrana hidrofóbicos, cujas extremidades amino-terminal e carboxi-terminal, estão voltadas para a parte interna da membrana (FIGURA 6). Os dois domínios transmembrana são monômeros e interagem entre si para a manutenção da especificidade da atividade catalítica e do substrato. Eles podem sofrer movimentos coordenados durante o processo de ligação e hidrólise do nucleotídeo.

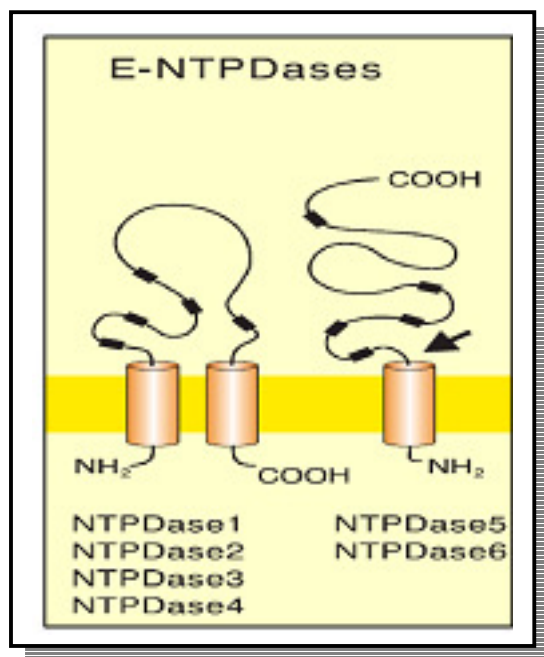


FIGURA 6 - Estrutura das NTPDases. (Adaptado de ZIMMERMANN, 2001).

Os nucleotídeos ATP e ADP são degradados, em proporções iguais, pela NTPDase 1. A atividade catalítica máxima requer a presença de cátions divalentes como cálcio ou magnésio e pH alcalino (SARKIS et al., 1995). A CD 39 foi amplamente descrita em vegetais (MAZELIS, 1959; CHEUNG et al., 1994), invertebrados (VASCONCELOS et al., 1993), em diversos tecidos de mamíferos como córtex cerebral (BATTASTINI et al., 1991; SCHETINGER et al., 2001), glândulas mamárias (VALENZUELA et al., 1989), plaquetas (PILLA et al., 1996; LUNKES et al., 2003), linfócitos humanos (PLESNER, 1995; LEAL et al., 2005) e plaquetas de ratos (FRASSETO et al., 1995).

A expressão da CD39 está aumentada em plaquetas de pacientes diabéticos, hipertensos e diabéticos/hipertensos (LUNKES et al., 2008). O agravamento de quadros de leucemia linfocítica crônica pode estar associado à expressão de CD39 na superfície de células tumorais malignas (PULTE et al., 2007). A presença de NTPDase 1, na membrana de células endoteliais, constitui um fator preponderante na manutenção da homeostasia vascular (BIRK et al., 2002). As respostas trombóticas e inflamatórias podem ser moduladas pela expressão da CD39/ATPDase (KOZIAK et al., 1999).

Esta enzima foi relacionada com a regulação da concentração de nucleotídeos, na circulação vascular (FRASSETO et al., 1993; EL-OMAR et al.,

2005). A NTPDase interfere na produção de substâncias pró-agregatórias e tem importante função na regulação da ativação plaquetária (ATKINSON et al., 2006). Estudos prévios realizados pelo nosso laboratório demonstraram que a atividade da enzima NTPDase de plaquetas humanas encontra-se aumentada em pacientes com hipertensão (LUNKES et al., 2003).

Muitos estudos relataram que diversos parâmetros de ativação plaquetária são normalizados com o tratamento da hipertensão (BLANN et al., 2003). Uma das principais vias de tratamento farmacológico utilizado para a hipertensão são os vasodilatadores. Estes fármacos possuem ação sobre a musculatura vascular, promovendo o relaxamento do endotélio. Além de normalizar a pressão arterial, essas drogas podem exercer efeitos secundários na homeostase vascular.

2.7 Fármacos Vasodilatadores

2.7.1 Arginina

A arginina (FIGURA 7) é um aminoácido semi-essencial, encontrado em peixes, feijão e mamíferos (ANGGARD, 1994). É um vasodilatador e serve como substrato para a produção de óxido nítrico, um fator de relaxamento endógeno, liberado pelas células do sistema cardiovascular (ÉVORA et al., 2003). O óxido nítrico é formado a partir da arginina pela oxidação do nitrogênio guanidino terminal e é responsável pela manutenção da vasodilatação dependente do endotélio através da ativação das células vasculares (GOUMAS et al., 2001).

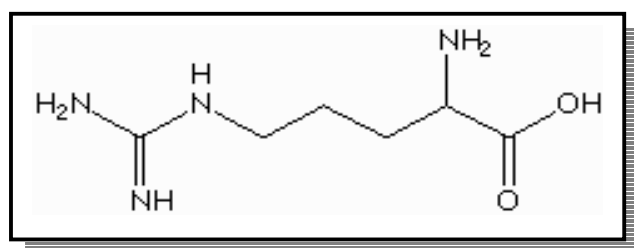


FIGURA 7 – Estrutura molecular do vasodilatador arginina Disponível em <http://www.sportsmen.com.br/.../Pgarginina.html>. Acesso em 10 de setembro de 2008.

A formação de óxido nítrico e citrulina é catalisada pela enzima NO sintase endotelial e requer íons cálcio, mononucleotídeos flavina, adenina dinucleotídeos e tetrahydrobioterina como cofator (TAPIERO et al., 2002). O NO é capaz de aumentar os níveis de GMP cíclico, pela estimulação da enzima guanilato ciclase. O aumento da atividade desta enzima resulta em diminuição do cálcio intracelular e conseqüente vasodilatação, inibição da adesão e agregação plaquetária e eliminação do trombo (PRELI et al., 2002; IYU et al., 2004).

Estudos prévios associaram alguns fatores de risco coronarianos, hipertensão e hipercolesterolemia à presença de distúrbios endoteliais (ZEIHER et al., 1993; CASINO et al., 1994). A disfunção endotelial refere-se à ausência da capacidade vasodilatadora em resposta a estímulos que aumentam a biodisponibilidade do óxido nítrico (TELES et al., 2007). A destruição do NO, pelo aumento do estresse oxidativo e pela disfunção dos receptores do NO, induz ao aumento da pressão arterial, diminuição do fluxo sanguíneo e respostas anormais do sistema vascular (DELLES et al., 2008).

2.7.2 Nitroprussiato de sódio

O nitroprussiato de sódio (FIGURA 8) é um vasodilatador de uso parenteral, utilizado no tratamento das emergências hipertensivas. Esse fármaco atua diretamente sobre a musculatura lisa vascular, tanto arterial como venosa diminuindo a resistência vascular sistêmica. A ação vasodilatadora pode ocorrer através da interação com grupos intracelulares de sulfidril, inibição do transporte de cálcio e alteração dos nucleotídeos cíclicos intracelulares (ANFOSSI et al., 2001).

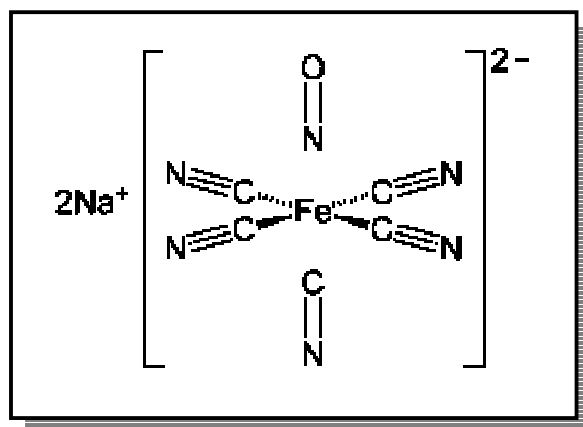


FIGURA 8 – Estrutura molecular do vasodilatador nitroprussiato de sódio. Disponível em <http://www.answers.com/topic/sodium-nitroprusside>. Acesso 10 de setembro de 2008.

Após a entrada do nitrovasodilatador na célula muscular lisa, o nitrato orgânico é oxidado por grupos sulfidrilas do aminoácido cisteína. A reação S-nitrosilação influencia a atividade de proteínas (BROILLET, 1999). A elevação da concentração do GMPc e a inibição do influxo de cálcio provocado pelo nitroprussiato de sódio parecem inibir a adesão plaquetária (MORGAN & NEWBY, 1989; GUGMUNDSÓTTIR et al., 2005).

2.7.3 Hidralazina

A hidralazina (FIGURA 9) é um vasodilatador de ação direta sobre a musculatura vascular arterial. É considerado um agente hipotensor de emergência, utilizado em casos de hipertensão crônica e pré-eclâmpsia (POWERS et al., 1998). Este fármaco anti-hipertensivo tem seu mecanismo de ação associado a hiperpolarização da membrana por ativação dos canais de potássio (BANG et al., 1998). A alta condutância dos canais de potássio, ativados pelos íons cálcio, é estimulada pela elevação de cálcio intracelular e por hiperpolarização da membrana (NELSON & QUAYLE, 1995).

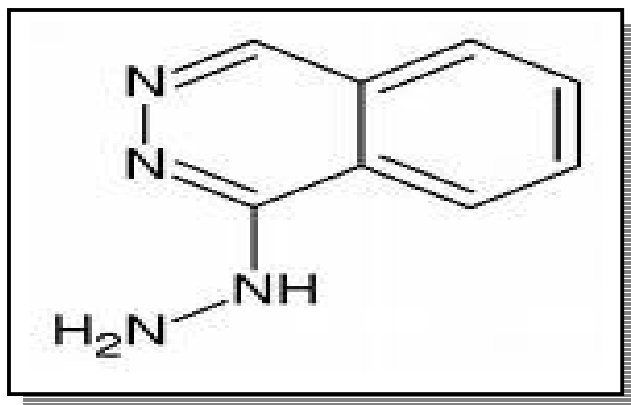


FIGURA 9 – Estrutura molecular do vasodilatador hidralazina Disponível em <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Hydralazine.svg>. Acesso 10 de setembro de 2008.

A produção intracelular de inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3), é outro mecanismo de ação atribuído à hidralazina (SMALL, 2006). Como consequência, há a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático que promove a vasodilatação (BATLOUNI & RAMIRES, 1999). A supressão de cálcio intracelular pode interferir no metabolismo dos nucleotídeos da adenina, promovendo a inibição da secreção de substratos, como ADP, pelos grânulos densos plaquetários.

2.7.4 Captopril

O captopril (FIGURA 10) apresenta sua ação terapêutica hipotensora através de uma inibição competitiva da enzima conversora da angiotensina Este fármaco aumenta indiretamente a síntese vascular de óxido nítrico e influencia o metabolismo do ácido araquidônico. O aumento da concentração de íons cálcio intracelular, pelo captopril, promove a diminuição da pressão arterial (MEZEI et al., 1997)

A capacidade do captopril em interferir na formação de agregação plaquetária envolve mecanismos de modificação da concentração de peptídeos como a bradicinina. A bradicinina é um mediador inflamatório, o qual aumenta a produção de óxido nítrico e outras substâncias, que inibem a agregação plaquetária (PERSSON et al., 2008).

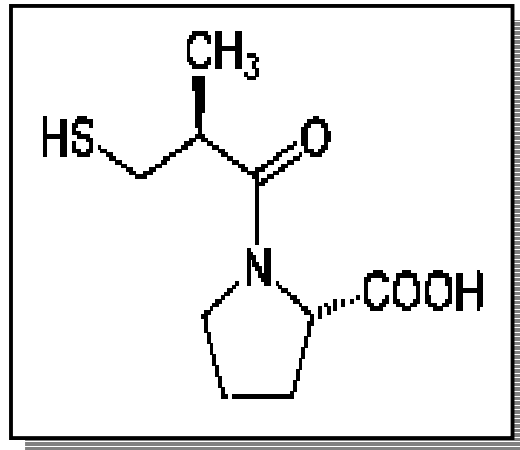


FIGURA 10: Estrutura molecular do vasodilatador captopril Disponível em [http:// www.answers.com/topic/captopril](http://www.answers.com/topic/captopril). Acesso em 10 de setembro de 2008.

2.8 Cinética enzimática

A compreensão da cinética enzimática possibilita avaliar como a enzima pode ser inibida ou potencializada por drogas ou compostos. Um dos modelos cinéticos que descreve a catálise enzimática foi proposto por Michaelis e Menten. A expressão gráfica desse modelo demonstrou que a relação entre a velocidade enzimática e a concentração de substrato não é linear, para elevadas concentrações de substrato (MICHAELIS & MENTEN, 1913).

A enzima NTPDase catalisa a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP, com a mesma afinidade. A propriedade catalítica é ativada pelos íons cálcio e magnésio e inativada na ausência destes cátions (FRASETTO et al., 1995). O pH entre 7.0 e 8.5 é considerado ótimo para que a reação ocorra com eficiência máxima, na superfície da plaqueta. A atividade enzimática da NTPDase, para os substratos ATP e ADP, tem conservado sua linearidade à uma temperatura de 37°C (CHAMBERS et al., 1967).

Os inibidores enzimáticos podem ser classificados em competitivos, não-competitivos e mistos, conforme o efeito que produzam nas constantes cinéticas K_m e V_{max} . A avaliação do comportamento do inibidor pode ser realizada pela observação da cinética enzimática em função da concentração do inibidor. Na inibição competitiva há uma alteração de K_m e na não-competitiva o K_m não se altera.

Entretanto, na inibição mista o K_m apresenta-se aumentado com V_{max} diminuído (FERSHT, 1998).

A presença de inibidores promove uma alteração na hidrólise de nucleotídeos pela NTPDase. Existem compostos, como azida, fluoreto de sódio, suramin e trifluorperazina, que se caracterizam por serem inibidores clássicos, que ocasionam uma redução na atividade da NTPDase (KNOWLES & NAGY, 1999; SCHETINGER et al., 2001). Além disso, também atuam como inibidores, análogos não-hidrolizáveis dos nucleotídeos, como ARL 67156. Este composto atua como um inibidor seletivo da atividade da NTPDase em células sanguíneas (LÉVESQUE et al., 2007).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo. O artigo “Effect of different vasodilators on NTPDase activity in healthy and hypertensive patients” foi aceito pelo periódico “Thrombosis Research” (ANEXO B). A apresentação está baseada na versão submetida à publicação na revista.

EFFECT OF DIFFERENT VASODILATORS ON NTPDase ACTIVITY IN HEALTHY AND HYPERTENSIVE PATIENTS

Daniéle Sausen Lunkes^a, Gilberto Inácio Lunkes^a, Mushtaq Ahmed^a, André L.B.Morsch^a, Rafael Fernandes Zanin^a, Paula Acosta Maldonado^a, Maísa Corrêa^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{a*} and Vera Maria Morsch^{a*}

^aCentro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

* Corresponding authors: Departamento de Química, CCNE, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. Fax: +55-5532208978

e-mail.: veramorsch@gmail.com (V.M. Morsch)

mariaschetinger@gmail.com (M.R.C. Schetinger)

Abstract

Introduction: The thrombogenic process that affects the hypertensive patient is associated with regulatory mechanisms present in the vascular endothelium. These mechanisms involve release of an endothelium-derived relaxing factor, ectonucleotidase activity and calcium ion concentration.

Methods: Interference with ENTPDase activity in platelets of hypertensive patients and healthy donors was evaluated for arginine, sodium nitroprusside, and hydralazine. In addition, the kinetic behavior of NTPDase was determined in the presence of the vasodilator that showed the greatest inhibitory influence.

Results: Vasodilators decreased NTPDase activity with ATP and ADP as substrates. In controls, hydrolysis was increased in the presence of arginine. Captopril did not affect enzyme activities. The dose response for increasing sodium nitroprusside was biphasic. Kinetic behavior studies were estimated in the presence of sodium nitroprusside, which caused a mixed inhibition. The K_m values increased and V_{max} decreased with increasing sodium nitroprusside concentrations. The IC_{50} and K_i values indicated that the vasodilator was a strong NTPDase inhibitor when tested for the control and hypertensive group, using ATP and ADP as substrate, respectively.

Conclusion: It is postulated that there was an interaction between vasodilators, NO donors and inhibition of NTPDase.

Keywords: Hypertension, Vasodilators, NTPDase, kinetic parameters.

Abbreviations:

ADP: Adenosine diphosphate

ATP: Adenosine triphosphate

Ca^{2+} : Calcium

Mg^{2+} : Magnesium

cGMP: Cyclic Guanosine monophosphate

SNP: sodium nitroprusside

NO: Nitric oxide

1. Introduction

Hypertension is a vascular endothelium dysfunction with high prevalence in the world population [1,2]. High blood pressure can lead to the development of micro and macrovascular complications and the formation of thrombus [3,4]. The increased platelet activation and aggregability has been associated with cardiovascular alteration in hypertension [5].

Platelets are important for the haemostatic process as these cells adhere to sites of vascular injury, releasing ADP, Ca^{2+} , thromboxane A_2 and other active substances [6,7]. ADP and Ca^{2+} promote the recruitment of platelets and adhesion to the vessel wall [8]. Moreover, the presence of ADP stimulates platelet aggregation and contributes to thrombus formation [9].

NTPDase hydrolyzes extracellular nucleosides, tri- and di-phosphates, in the presence of Ca^{2+} or Mg^{2+} and has been well characterized in the platelets and in other tissues [10,11,12,13]. This enzyme is highly active and participates in the control of extracellular ATP and ADP levels in the vascular circulation of hypertensive patients [14,15,16]. Most importantly, platelet NTPDase interferes with the production of pro-aggregant substances and has important functions in the regulation of platelet activation [17].

Studies from our laboratory have indicated a significant increase in NTPDase activity in human platelets from hypertensive and type 2 diabetic /hypertensive patients. Results have demonstrated that hypertension is a predisposition factor for thrombus formation [15]. Recently, studies observing alterations in NTPDase activity in blood platelets have suggested that this ectonucleotidase is involved in thromboregulation in several physiological and pathological conditions [18,19].

The treatment of hypertension normalizes several parameters of platelet activation [20]. Vasodilators are drugs that have action on the vascular musculature, promoting endothelial relaxation. Besides normalizing blood pressure, these drugs can exert secondary effects on vascular homeostasis [21,22].

Vasodilators also possess anti-hypertensive properties. These drugs can act either directly on the venous musculature, such as the vasodilator sodium nitroprusside, or on the arterial musculature, such as hydralazine. Vasodilators that inhibit the renin-angiotensin system, such as captopril, have an indirect effect on the vascular musculature [23].

Arginine, a precursor of nitric oxide, is a vasodilator which actively restricts thrombus formation by increasing the levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), thus inhibiting platelet activity [24,25]. Sodium nitroprusside (SNP) acts directly on vascular smooth muscle to produce nitric oxide and increases the activity of guanylate cyclase leading to the formation of cGMP and consequent vasodilatation [26]. The increase of the cGMP concentration and the inhibition of calcium influx caused by sodium nitroprusside seem to inhibit platelet adhesion [27,28].

Hydralazine is an emergency vasodilator drug, but its mechanism of action is still poorly understood. Several mechanisms have been proposed such as the release of nitric oxide, membrane hyperpolarization and inhibition of the enzyme thromboxane synthase [29,30,31,32]. The effect of hydralazine-induced vasodilatation involves relaxation of the vascular musculature and the decrease of platelet aggregation [23].

Captopril presents its therapeutic hypotensive action through a competitive inhibition of the angiotensin converting enzyme. The ability of captopril to interfere in the formation of platelet aggregation involves the modification of the concentration of peptides such as bradykinin [33]. Bradykinin is an inflammatory mediator, which increases the production of nitric oxide and other substances that inhibit platelet aggregation [34].

We know that vasodilators act both on blood pressure and on homeostasis. Therefore we evaluated their effect on thromboregulation by determining the interference of different vasodilators on nucleotide hydrolysis. In addition, we observed the kinetic behavior of NTPDase in the presence of the vasodilator that showed the highest inhibition.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Nucleotides and HEPES, were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Arginine, sodium nitroprusside, hydralazine and captopril, were obtained from Galena (Campinas, SP, Brazil). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Humans

The sample consisted of patients from the Program of Assistance to Diabetic and Hypertensive Patients associated with the Municipal Secretariat of Health and Environment of Cruz Alta (RS, Brazil) and of healthy volunteers. 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. The sample was divided into two groups. The control group consisted of 10 individuals aged 60 ± 10 years, 50% males and 50% females, who did not present any disease and who had not been submitted to any pharmacological therapy during one month. Controls were carefully selected by clinical evaluation, matched by sex, age and body mass index to the patients. The hypertensive group was formed by 10 patients aged 60 ± 10 years, 50% males and 50% females, with hypertension levels between 140/80mmHg and 200/240mmHg. Ten milliliters of blood were obtained from each participant and used for platelet-rich plasma preparations.

2.3. Platelet-rich plasma preparation

Platelet-rich plasma was prepared from human donors according to Pilla et al. (1996). Briefly, blood was collected with 0.129 M sodium citrate as anticoagulant, was pooled and centrifuged at $160 \times g$ for 10 min. The platelet-rich plasma was centrifuged at $1400 \times g$ for 15 min and washed twice by centrifugation at $1400 \times g$ 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, the protein was adjusted to 0.3–0.5 mg/ml and platelet concentration was adjusted to 500.000 platelets/ mm^3 .

2.4. NTPDase activity

NTPDase activity was determined by the method of Pilla et al. [10] in a reaction medium containing 5.0 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 60 mM glucose, and 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, in a final volume of 200 μl . About 20 μl of platelet

preparation was added to the reaction medium and preincubated for 10 min at 37°C. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1.0 mM. The drugs were diluted in 100% water, to a final concentration according to bioavailability and added to the assay tubes. After 60 min, the reaction was stopped by addition of 10% trichloroacetic acid (TCA). All samples were run in triplicate. The samples were chilled on ice and the amount of inorganic phosphate (Pi) released was measured by the method of Chan et al. [35].

2.5 Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [36], using bovine serum albumin as standard.

2.6. Kinetic determinations

The kinetics of the interaction between the vasodilator and NTPDase were determined using the Lineweaver-Burk [37] double reciprocal plot, by plotting $1/v$ against $1/s$ analyzed over a range of ATP (0.025 – 2.0 mM) or ADP (0.025 – 2.0 mM) concentrations in the absence and the presence of the vasodilator sodium nitroprusside (1.0 - 2.0mM). K_m (Michaelis constant) and V_{max} (maximum velocity) values were obtained by two different estimations, $1/V$ versus $1/S$ and V versus V/S . The K_i values (the dissociation constant of the enzyme-substrate-inhibitor (ESI) complex) were obtained using the Dixon and Webb method [38] plots of S/V versus $[I]$. IC_{50} was determined by the percentage of residual activity versus concentration of SNP.

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, followed by the Tukey-Kramer's test. Differences between groups were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1 ATP and ADP hydrolysis

NTPDase activity was increased in the presence of arginine (0.025 mM – 3.0 mM) in the control group when ATP and ADP were used as substrate (Figures 1A and 1B). On the contrary, ATP (43.2%) and ADP (46.4%) hydrolysis were inhibited in hypertensive patients (Figure 1-A and 1-B) for all arginine concentrations tested.

In the concentration ranging from 0.01 mM to 2.0 mM sodium nitroprusside inhibited ATP and ADP hydrolysis in the control and hypertensive groups (Fig 2-A and 2-B). The control group presented 52.6% inhibition of NTPDase activity for ATP ($P<0.0001$) and 68.8% for ADP ($P<0.0001$). The hypertensive group presented 38.3% inhibition for ATP hydrolysis ($P< 0.0001$) and 52.4% for ADP hydrolysis ($P<0.0001$).

Figures 3-A and 3-B summarize the inhibitory effect of hydralazine (20.0 μ M–90.0 μ M) on NTPDase activity in both groups. ATP and ADP hydrolysis were inhibited by 29.2% ($P<0.0005$) and 51.3% ($P< 0.0001$), respectively, in the control group. Platelet NTPDase activity was inhibited by 28.2% when ATP was used as substrate ($P<0.0001$) and 30.6% for ADP hydrolysis ($P<0.0001$) in the hypertensive group.

The results showed that inhibition of NTPDase activity by captopril (8.0 μ M – 70.0 μ M) was not significant (data not shown).

3.3 Kinetic determination of NTPDase

Analysis of kinetic data indicated that the inhibition caused by sodium nitroprusside was mixed in the human platelet. This kinetic behavior was observed in the control group using ATP (Figure 4-A) and ADP (Figure 4-B) as substrate and also in hypertensive group in the presence of ATP (Figure 4-C) and ADP (Figure 4-D). The values of K_m and V_{max} measured by $1/V$ versus $1/S$ (Table 1) and by V versus V/S confirmed the inhibition type. In the human platelet preparation there was an increase in K_m and a decrease in V_{max} values (Table 1), which characterizes mixed inhibition. The concentration of SNP required to inhibit 50% (IC_{50}) of NTPDase activity was calculated according to the Dixon and Webb method, using inhibitor

concentrations of 1.0, 1.5 and 2.0 mM and K_i values were measured by the Dixon and Webb method plotting S/V versus [I]. The IC_{50} and K_i values for NTPDase inhibition are shown in Table 2.

4. Discussion

The thrombus formation that affects hypertensive patient is associated with regulatory mechanisms present in the vascular endothelium. These mechanisms involve the release of an endothelium-derived relaxing factor, as well as ectonucleotidase activity and the calcium ion concentration [39].

In the present study our data show that L-arginine and sodium nitroprusside promoted nucleotide hydrolysis inhibition in the hypertensive group. In the control group only sodium nitroprusside was able to inhibit NTPDase activity. These vasodilators are largely employed in the therapy of hypertension for their nitric oxide-releasing property [26]. Nitric oxide can influence platelet responses through the stimulation of soluble guanylate cyclase which catalyses the synthesis of secondary messenger cGMP [28]. The increase of cGMP in platelets induces a change in intracellular Ca^{2+} mobilization [40, 41, 42]. The decrease of the calcium concentration could promote the inhibition of ADP secretion by dense granules [43].

Sodium nitroprusside has been demonstrated to be a potent inhibitor of NTPDase activity both for ATP and ADP substrates. The data showed that there was no difference in inhibition caused by SNP between the control and hypertensive groups either with ATP (Fig. 4-A and C) or ADP as substrate (Fig. 4-B and D). In our study, K_m values increased and V_{max} decreased characterizing a mixed inhibition type, which indicates that the enzyme-substrate-inhibitor (ESI) complex will be formed. The IC_{50} and K_i values indicated that sodium nitroprusside is a strong NTPDase inhibitor even at low mM concentrations.

The mechanism of hydralazine involves the opening of large Ca^{2+} -activated potassium conductance channels, leading to membrane hyperpolarization, thereby closing calcium channels, which can reduce the cytosolic calcium concentration [44,45]. The suppression of Ca^{2+} levels can decrease NTPDase enzyme activity [46]. This may explain the inhibition of ATP and ADP hydrolysis caused by hydralazine in both groups in our study.

Captopril is a hypotensive agent as it inhibits the angiotensin-converting enzyme. This drug can suppress the degradation of bradykinin and raise the cytosolic Ca^{2+} concentration [47]. Similar to other studies, our results showed that captopril had no effect on NTPDase activity in either group [48,34,15].

Vasodilators prevent hypertension through vascular endothelium relaxation and other mechanisms. These drugs can promote a compensatory response in the cardiovascular system. NTPDase sensitivity to vasodilators and reduced ADP secretion by dense granules of the platelet possibly help in the maintenance of the vascular homeostasis in hypertensive patients.

In our study, the vasodilators showed different enzymatic behaviors in the healthy and hypertensive groups. NTPDase inhibition in the hypertensive group in the presence of arginine demonstrated that there was a direct effect on hypertension. In the presence of sodium nitroprusside and hydralazine, inhibition was the same in both groups. Captopril, on the other hand, did not interfere in NTPDase activity.

Based on these observations, it is possible to speculate that vasodilators may modulate the activity of NTPDase enzyme in platelets of hypertensive and healthy patients. In addition the kinetic behavior of NTPDase in the presence of the vasodilatador SNP caused mixed inhibition, which reinforces the premise that there is an interaction between vasodilatadores, NO donors and NTPDase inhibition. Further studies should be conducted to clarify these hypotheses.

References

- [1] VERBERK, W.J. et al. Prevalence and persistence of masked hypertension in treated hypertensive patients. **Am J Hypertens.** v. 20, n.12, 2007, p.1258-1265.
- [2] KINZIE, J.D., et al. High prevalence rates of diabetes and hypertension among refugee psychiatric patients. **J Nerv Ment Dis.** v.196, n.2, 2008, p.108-112.
- [3] LIP, G.Y.H. Hypertension, platelets and the endothelium. **Hypertension.** v.41, n.199, 2003.
- [4] BRYDON, L. et al. Platelets, coronary heart disease, and stress. **Brain, Behav Immun.** v.20, 2006, p.113-119.
- [5] FUSEGAWA, Y. et. al. Hypertensive patients with carotid artery plaque exhibit increased platelet aggregability. **Thromb Res.** v.117, n.6, 2006, p.615-622.
- [6] DOCKRELL, M.E.C. et al. Platelet aggregation in young men with contrasting predisposition to high blood pressure. **Am J Hypertens.** v.12, 1999, p.115-119.
- [7] GAYLE III, R.B. et. al. Inhibition of platelet unction by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. **J Clin Invest.** v.101, n.9, 1998, p.1851-1859.
- [8] MARCUS, A.J. et al., Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **J Thromb Haemost.** n.1, 2003, p.2497-2509.
- [9] REX, S; FREEDMAN, J.E. Inhibition of platelet function by the endothelium. **Platelets.** 2007, p.251-279.
- [10] PILLA C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets.** v.7, 1996, p.225-230.
- [11] SCHETINGER, M.R.C. et al. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comp Biochem Physiol.** v.128, 2001, p.731–741.
- [12] [BALZ, D. et al. In vitro effects of L-arginine and guanidine compounds on NTPDase1 and 5-nucleotidase activities from rat brain synaptosomes, **Int J Dev Neurosci.** v.21, 2003, p.75–82.
- [13] ROBSON, S.C. et al. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal.** v.2, 2006, p.409-430.

- [14] FRASETTO, S.S. et al. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets, **Mol Cell Biochem.** v.129,1993, p.47–55.
- [15] LUNKES, G.I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thromb Res.** v.109, 2003, p.189-194.
- [16] EL-OMAR, M.M. et al. The ratio of ADP-to ATP-ectonucleotidase activity is reduced in patients with coronary artery disease. **Thromb Res.** v.116, n.3, 2005, p.199-206.
- [17] ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic target. **Blood Cells Mol Dis.** v.36, n.2, 2006, p.217-222.
- [18] LEAL, C.A. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk fro thrombosis. **Mol Cell Biochem.** v.304, n.1-2, p. 325-330, 2007.
- [19] DUARTE, M. M. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS J.** v.274, n.9, 2007, p.2707-2714.
- [20] BLANN, A.D. et al. Pharmacological modulation of platelet function in hypertension. **Hypertension**, v.42, n.1, 2003.
- [21] CRIMI, E. et al. Microcirculation and oxidative stress. **Free Radic Res.** v.41, n.12, 2007, p.1364-1375.
- [22] FÜRSTENAU, C.R. et al. The effects of angiotensin II and genetic hypertension upon extracellular nucleotide hydrolysis by rat platelet ectoenzymes. **Thromb Res.** v.120, 2007, p.877-884.
- [23] BATLOUNI, M.; RAMIRES, J.A.F. **Farmacologia e Terapêutica Cardiovascular.** São Paulo: Atheneu, 1999.
- [24] PRELI, R. et al., Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. **Atherosclerosis**, v.162, 2002, p.1-15.
- [25] IYU, D. et al.; Altered calcium signaling in platelets from nitric oxide-deficient hypertensive. **Cell Commun Signal.** v.2, n.1, 2004.
- [26] ANFOSSI, G. et al. Studies on inhibition of human platelet function by sodium nitroprusside. Kinetic evaluation of the effect on aggregation and cyclic nucleotide content. **Thromb Res.** v.102, 2001, p.319-330.
- [27] MORGAN, R. O.; NEWBY, A. C. Nitroprusside differentially inhibits ADP - stimulated calcium influx and mobilization in human platelets. **Biochem J.** v.258, 1989, p.447-454.

- [28] GUDMUNDSDÓTTIR, I. J. et al. Sildenafil potentiates nitric oxide mediated inhibition of human platelet aggregation. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 337, n.1, 2005, p. 382-385.
- [29] BANG, L. et al. Hydralazine-induced vasodilatation involves opening of high conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. **Eur J Pharmacol.** v.361, 1998, p. 43-49.
- [30] ROBINSON, M.A. et al. Differential effects of sodium nitroprusside and hydralazine in rat model of topical FeCl_3 -induced carotid artery thrombosis. **Thromb Res.** v.111, 2003, p. 59-64.
- [31] CRANE, M.S. et al. A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMP-independent inhibition of human platelet aggregation: biochemical and pharmacological considerations. **Br J Pharmacol.** v.144, n.6, 2005, p.849-859.
- [32] SMALL, R. Systemic Pharmacology - Antihypertensive drugs. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine.** v. 7, n.8, 2006, p.298-302.
- [33] SHARMA, J.N.; ABBAS, S.A. A bradykinin antagonist abolishes beneficial effect of captopril on duration of survival after acute coronary artery ligation in hypertensive rats. **Pharmacol Res.** v.52, n.3, 2005, p.211-215
- [34] PERSSON, K et al. Nitric oxide donors and angiotensin-converting enzyme inhibitors act in concert to inhibit human angiotensin-converting enzyme activity and platelet aggregation in vitro. **Eur J Pharmacol.** v.406, 2000, p.15-23.
- [35] CHAN, K. et al. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. **Anal Biochem.** v.157, 1986, p.375-380.
- [36] BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v.72, 1976, p. 218-254.
- [37] LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J Am Chem Soc.** v.56, 1934, p.658-666.
- [38] DIXON, M.; WEBB, E.C. **Enzyme Kinetics.** 2nd. ed. Longman, London, U.K., 1964.
- [39] RAMAMURTHI, A. et. al., Effects of nitric oxide (NO) and soluble nucleoside triphosphohydrolase (NTPDase) on inhibition of platelet deposition in vitro. **Thromb Res.** v.102, 2001, p. 331-341.
- [40] VASTA, V. et al. Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. **Biochem Biophys Res Commun.** v.206, n.3, 1995, p.878-884.

- [41] DE MEIRELLES, L.T. et al. Inhibitory effects of endogenous L-arginine analogues on nitric oxide synthesis in platelets: role in platelet hyperaggregability in hypertension. **Clinic Exp Pharmacol Physiol.** v.34, n.12, 2007, p.1267-1271.
- [42] BATLOUNI, M. Ativação plaquetária e trombose arterial. **Arq Bras Cardiol.** v.60, n.6, 1993, p.425-431.
- [43] LAGES, B.; WEISS, H.J. Enhanced increases in cytosolic Ca²⁺ in ADP-stimulated platelets from patients with delta-storage pool deficiency--a possible indicator of interactions between granule-bound ADP and the membrane ADP receptor. **Thromb Haemost.** v.77, n.2, 1997, p.376-82.
- [44] SAUSBIER, M, et al. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. **Circ Res.** v.87, 2000, p. 825.
- [45] ELLERSHAW, D.C.; GURNEY, A.M. Mechanisms of hydralazine induced vasodilation in rabbit aorta and pulmonary artery. **Br J Pharmacol.** v.134, 2001, 621- 631
- [46] GENDRON, F.P., et al. Ca²⁺-channel blockers and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) influence of diltiazem, nifedipine, and verapamil. **Biochem Pharmacol.** v.60, n.12, 2000, p.1959-1965.
- [47] ZURBANO, M.J. et al. Captopril administration reduces thrombus formation and surface expression of platelet glycoprotein IIb/IIIa in early post myocardial infarction stage. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.19, n.1,1999, p.1791-95.
- [48] SOMEYA N. et al. Suppressive effect of captopril on platelet aggregation in essential hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol.** v.6, 1984, p.840-43.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of arginine on NTPDase activity from human platelet preparation of control and hypertensive groups with ATP (A) and ADP (B) as substrate. Arginine was used in the 0.025 mM – 3.0 mM range. Conditions are described in Section 2. Data represent the mean \pm S.D. Results of hypertensive group were different between groups and considered statistically significant $P < 0.0001$ (n=10). The activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

Figure 2: Effect of SNP on NTPDase activity from human platelet preparation of control and hypertensive group with ATP (A) and ADP (B) as substrate. SNP was used in the 0.01 mM – 2.0 mM range. Conditions are described in Section 2. Data represent the mean \pm S.D. Results were different between groups and considered statistically significant $P < 0.0001$ (n=10). The activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

Figure 3: Effect of hydralazine on NTPDase activity from human platelet preparation of control and hypertensive group with ATP (A) and ADP (B) as substrate. Hydralazine was used in the 20.0 μ M – 90.0 μ M range. Conditions are described in Section 2. Data represent the mean \pm S.D. Results were different between groups and considered statistically significant $P < 0.0001$ (n=10). The activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

Figure 4: Lineweaver – Burk representation of inhibition of NTPDase activity by SNP (1.0mM – 2.0mM) in platelet human preparation. (A) Control group in the presence of ATP substrate; (B) Control group in the presence of ADP substrate; (C) Hypertensive group in the presence of ATP substrate; (D) Hypertensive group in the presence of ADP substrate. The plot represents the means of three experiments (n=10), S.D.<10%.

Table 1: Effect of SNP on K_m and V_{max} of NTPDase activity in platelets of control and hypertensive group.

SNP (mM)	K_m [S]	% Increase	V_{max} (1/V)	% Decrease
<i>Control Group – ATP</i>				
0	21.18	0	11.11	0
1,0	29.4	27.9	9.61	13.5
1,5	33.89	60.0	8.62	22.4
2,0	37.50	77.0	7.69	30.7
<i>Control Group – ADP</i>				
0	33.33	0	8.0	0
1,0	37.33	12.0	6.58	17.7
1,5	43.66	30.9	5.54	30.7
2,0	47.61	42.8	4.45	44.3
<i>Hypertensive Group – ATP</i>				
0	10.75	0	13.83	0
1,0	18.86	75.7	11.11	19.6
1,5	21.73	102.1	11.37	17.7
2,0	24.43	127.2	9.09	34.2
<i>Hypertensive Group – ADP</i>				
0	14.92	0	10.84	0
1,0	30.3	103.0	7.93	26.8
1,5	37.03	148.1	6.66	38.5
2,0	46.08	208.8	4.74	56.2

Table 2: K_i and IC_{50} values for NTPDase activity of platelets of control and hypertensive group.

Substrate/ Subject	K_i (mM)	IC_{50} (mM)
ATP – <i>Control Group</i>	0.345	3.66
ADP – <i>Control Group</i>	0.200	2.64
ATP – <i>Hypertensive Group</i>	0.167	2.08
ADP – <i>Hypertensive Group</i>	0.325	3.15

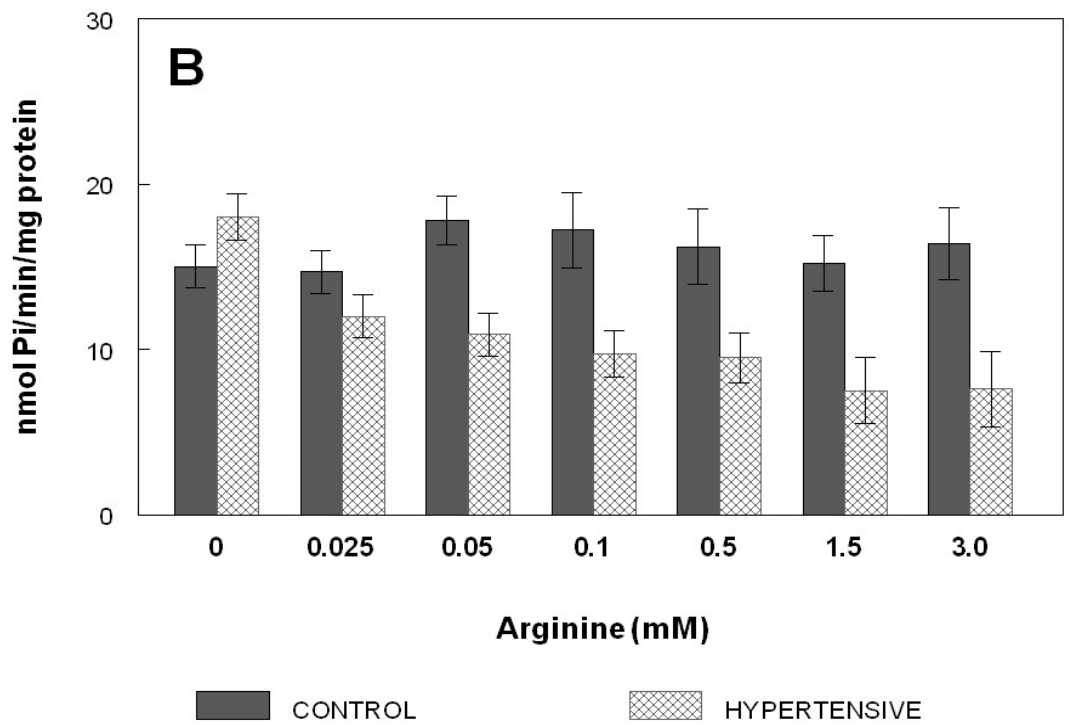
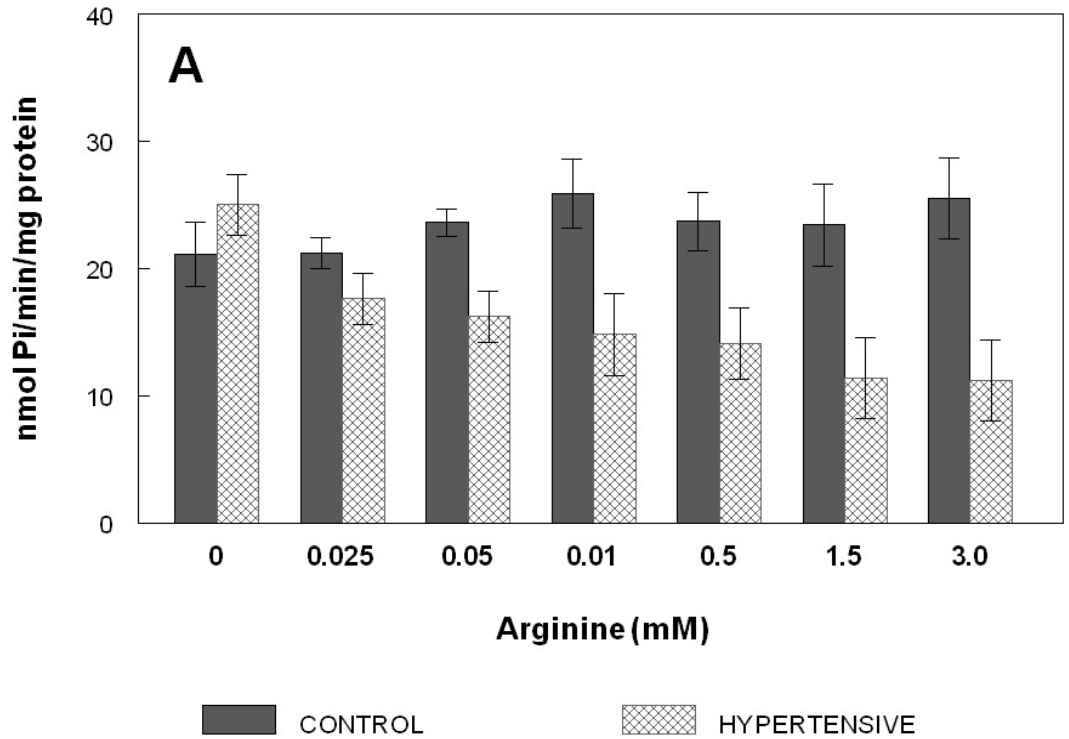


Figure 1

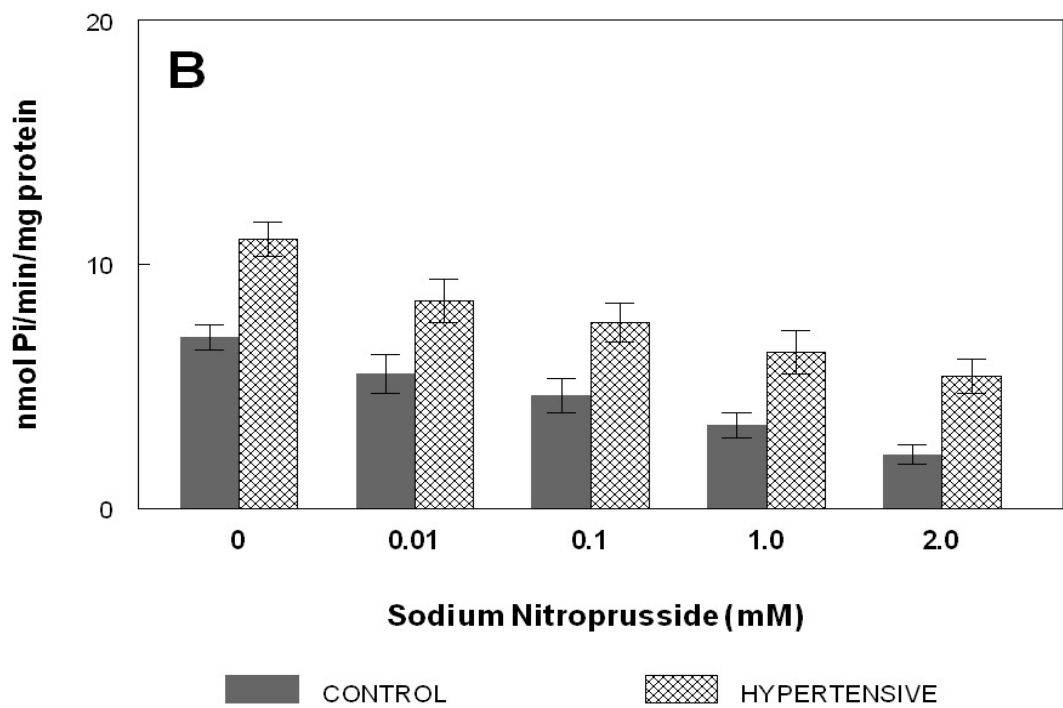
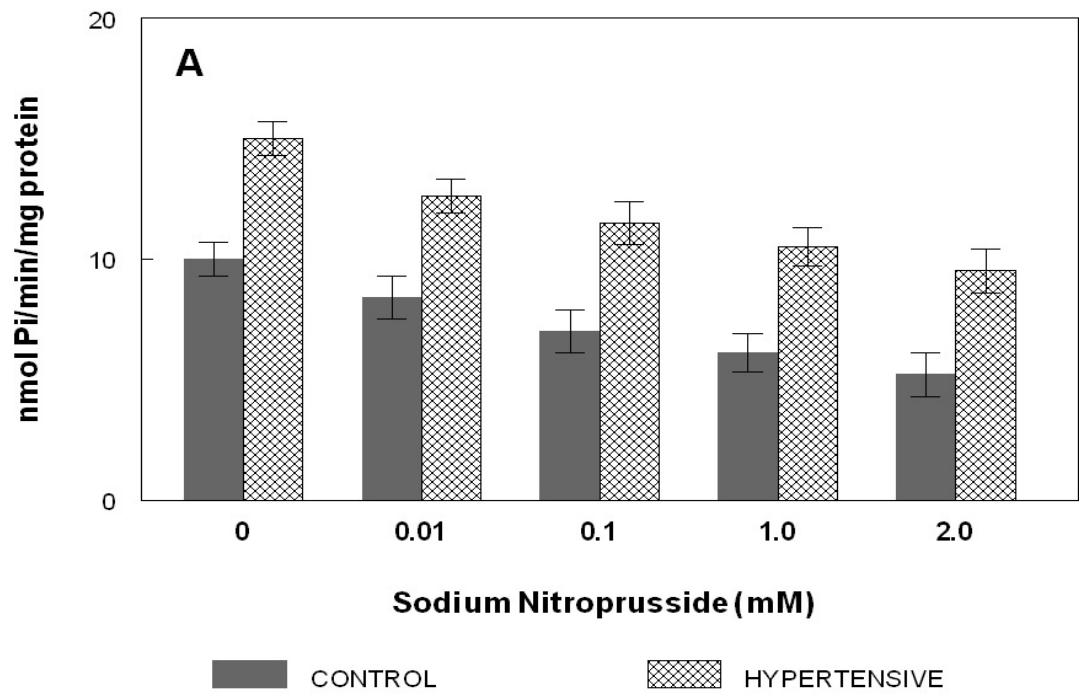


Figure 2

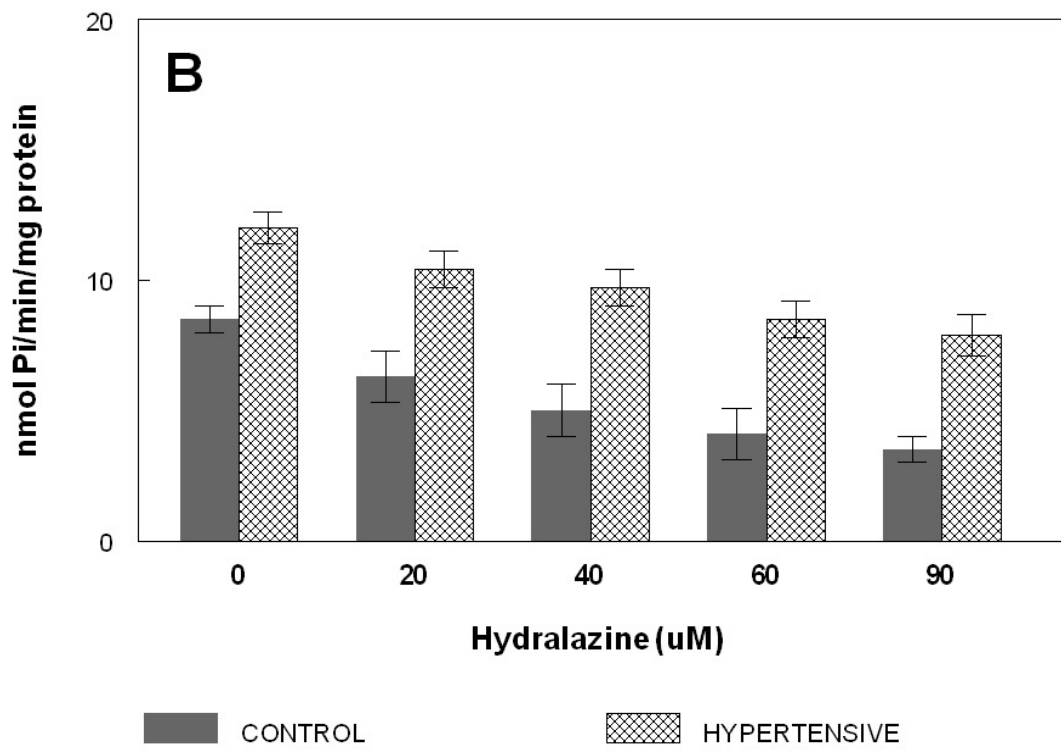
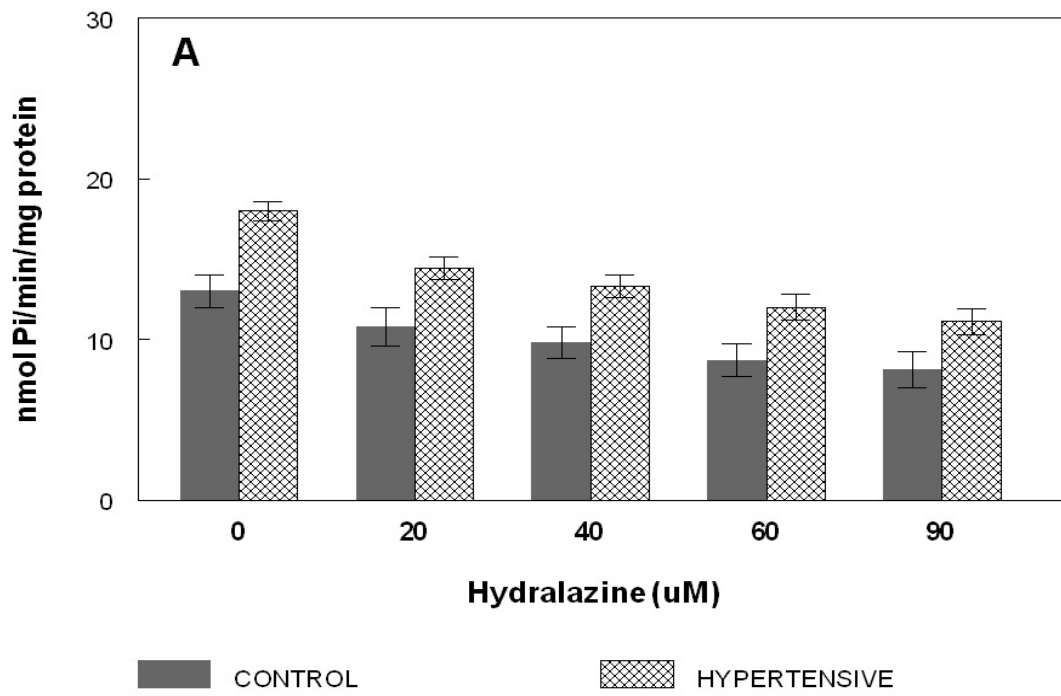
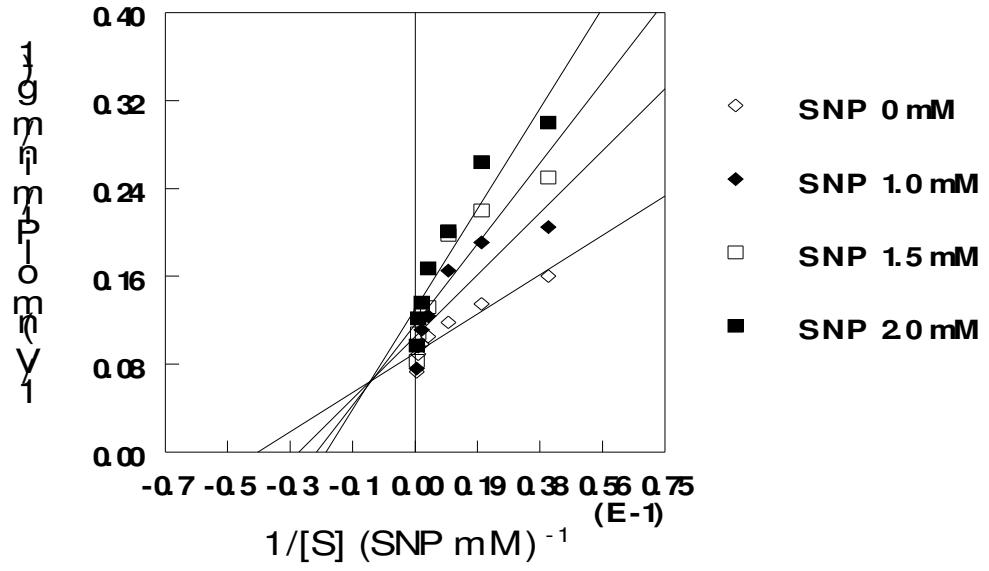
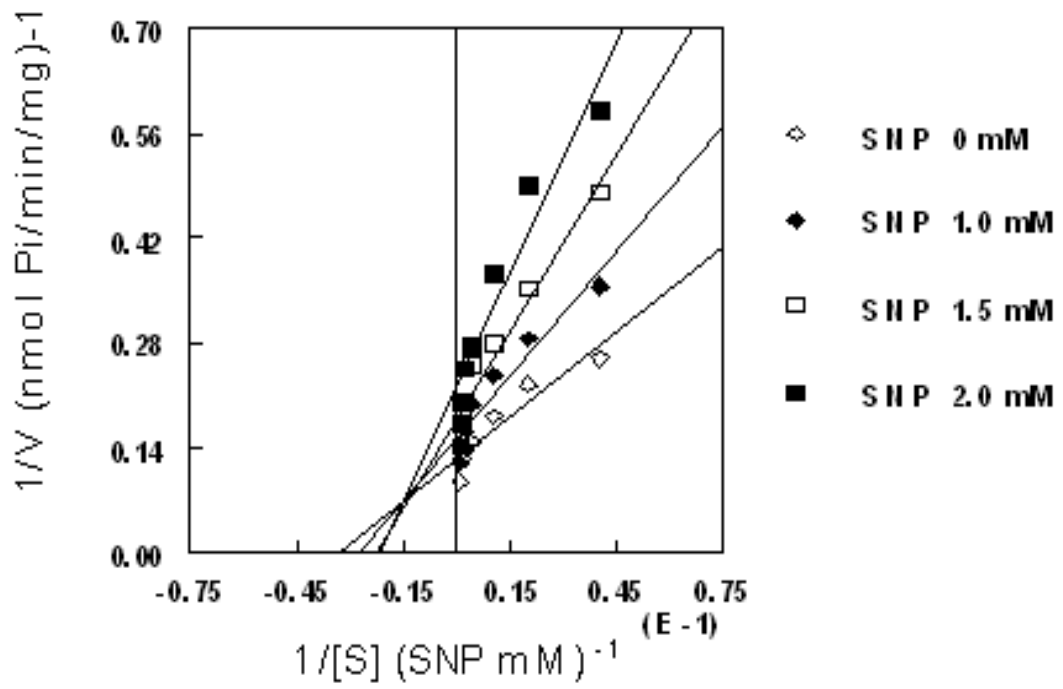
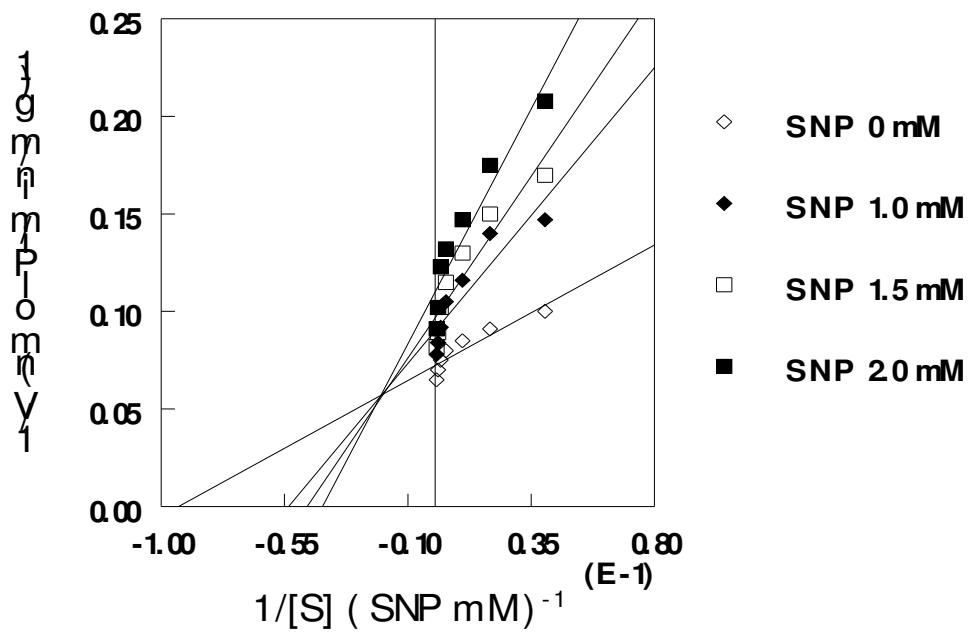
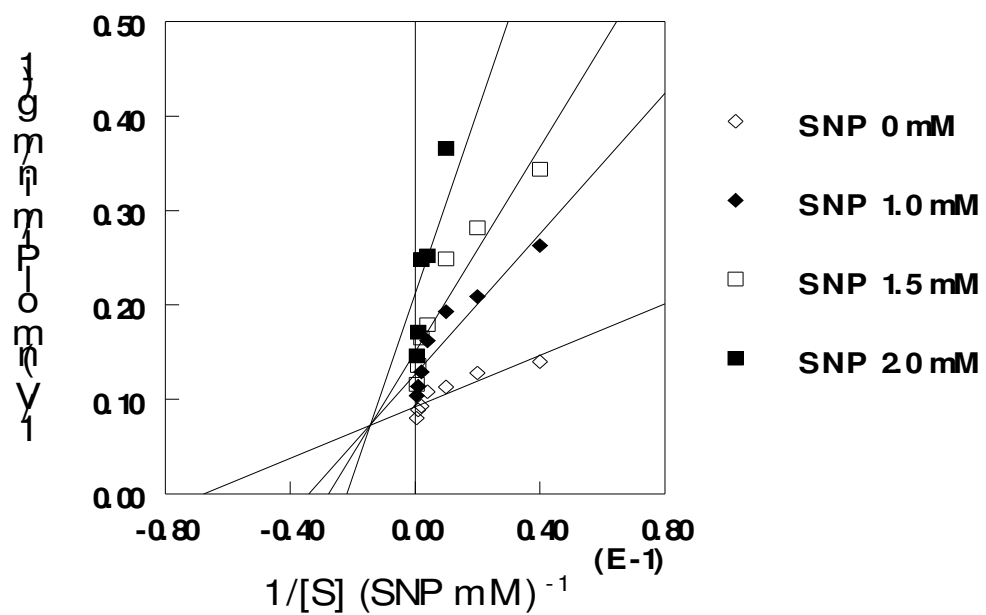


Figure 3

A**B**

C**D****Figure 4**

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho derivam de uma análise *in vitro* da enzima NTPDase em plaquetas de pacientes hipertensos e pacientes controles. A atividade da enzima NTPDase foi analisada para verificar a influência dos fármacos vasodilatadores na hidrólise de nucleotídeos da adenina. A cinética enzimática foi determinada para caracterizar o tipo de inibição promovido pelo vasodilatador de maior efeito inibitório.

Nosso estudo demonstrou que a atividade da enzima NTPDase apresentou-se aumentada, tanto para o substrato ATP, quanto para o ADP, em pacientes hipertensos com relação aos pacientes controles na ausência dos vasodilatadores. Estudos prévios de nosso grupo já haviam determinado um aumento na atividade das ectonucleotidases em pacientes portadores de hipertensão e diabetes (LUNKES et al., 2003). Em outras disfunções patológicas, como processos isquêmicos e câncer, a atividade da enzima NTPDase, também estava aumentada (SCHETINGER et al., 1997).

Os íons cálcio, a NTPDase e o óxido nítrico, podem estar envolvidos em mecanismos que regulam os processos trombogênicos e que promovem a homeostasia vascular (RAMAMURTHI et al., 2001). O tratamento terapêutico, com drogas vasodilatadoras, auxilia no controle da hipertensão e pode influenciar na manutenção da hemostasia. Os benefícios vasculares, exercidos pelos medicamentos, como vasodilatação e inibição da ativação plaquetária, são claramente descritos na literatura (SABETKAR et al., 2008; PODESSER & HALLSTRÖM, 2007; DALAINAS, 2007). Em contrapartida, poucos estudos revelam as alterações enzimáticas observadas em plaquetas, pelo uso destes hipotensores.

Os resultados obtidos pela análise *in vitro* demonstraram que o fármaco arginina não foi capaz de inibir a hidrólise de nucleotídeos da adenina no grupo controle. Porém, em pacientes hipertensos houve uma diminuição da atividade da enzima NTPDase. Diferentes estudos, realizados em modelo experimental e em humanos com hipertensão, têm mostrado que a disfunção endotelial está associada ao aumento das espécies reativas do oxigênio (EROs) (ZHOU et al., 2008). A

ocorrência de hipertensão arterial sistêmica ativa a enzima NADH oxidase, que promove um aumento de EROs a partir da hidrólise de óxido nítrico. A redução da bioviabilidade do óxido nítrico, ocasionada provavelmente pelo excesso de EROs, leva a diminuição da vasodilatação e aumento da adesão das plaquetas (HIGASHI & YOSHIZUMI, 2004).

O dano vascular em pacientes com hipertensão pode ser agravado com a diminuição da função vasoprotetora exercida pelo óxido nítrico. A atividade de NTPDases de plaquetas pode ser influenciada por processos oxidativos (BAKKER et al., 1994; KRÖTZ et al., 2002). A inibição da enzima NTPDase acarreta a elevação da concentração de nucleotídeos extracelular, que reflete no aumento do recrutamento plaquetário e na estimulação do processo trombótico.

Este estudo revelou uma diminuição na hidrólise dos nucleotídeos da adenina em plaquetas de pacientes hipertensos e controles, quando utilizado o vasodilatador nitroprussiato de sódio. De acordo com Kirchner et al. (2001), compostos como o óxido nítrico, podem atuar através de mecanismos de S-nitrosilação, promovendo a inativação de enzimas envolvidas na hidrólise extracelular de ATP, ADP e AMP. A S-nitrosilação constitui a transferência de grupos derivados do óxido nítrico para a sulfidril cisteína, na cadeia protéica (RUIZ et al., 2005). Esta reação pode influenciar a atividade de proteínas ligadas à membrana (IWAKIRI et al., 2006). Provavelmente, a atividade da enzima NTPDase seja alterada pela presença de óxido nítrico, uma vez que o nitroprussiato de sódio é doador deste composto. Com isso, sugere-se que a interação de espécies reativas do óxido nítrico com a enzima NTPDase pode ocorrer por modificação no sítio ativo da enzima.

O nitroprussiato de sódio, dentre todos os fármacos estudados, demonstrou ser o vasodilatador que possui maior atividade inibitória sobre a hidrólise do ATP e ADP em plaquetas intactas de pacientes hipertensos e controle. A análise cinética dos efeitos do nitroprussiato de sódio na hidrólise dos nucleotídeos mostrou uma inibição mista, onde valores de K_m estavam aumentados e valores de V_{max} diminuídos. Os valores de K_i e IC_{50} , indicaram que o nitroprussiato de sódio é um forte inibidor da atividade da NTPDase, mesmo em baixas concentrações. Estudos realizados em plaquetas de modelo experimental, relataram um comportamento cinético não competitivo da NTPDase, quando utilizado como inibidor o ebselen e ácido acetilsalicílico (BUFFON et al., 2004; FÜRSTENAU et al., 2004).

Estudos anteriores demonstraram que o NO apresenta função inibitória da ativação das plaquetas (MARJANOVIC et al., 2005; MORRELL et al., 2005). Por outro lado, recentemente foi demonstrado que os níveis de NO resultante da atividade da eNOS plaquetária estimula a secreção e agregação plaquetária (VANNI et al., 2007). Portanto, estes trabalhos sugerem que NO pode exercer uma atividade bifásica em relação ativação plaquetária. Em nosso trabalho, podemos observar comportamento semelhante do vasodilatador SNP em relação à enzima NTPDase, a qual tem a capacidade de modular a atividade plaquetária.

O mecanismo de ação da hidralazina está associado às alterações do balanço de cálcio através da hiperpolarização de membrana plaquetária (WEI et al., 1997). Este vasodilatador atua promovendo a fosforilação e desfosforilação de proteínas, modulando a abertura de canais de potássio (BANG et al., 1998). A abertura dos canais iônicos induz ao aumento da concentração de potássio extracelular e conseqüente influxo de cálcio para o meio intracelular.

A atividade da NTPDase é dependente dos cofatores Ca^{2+} e Mg^{2+} (CHAMBERS et al., 1967). A supressão dos níveis de cálcio extracelular pode aumentar a contração plaquetária e diminuir a atividade da enzima NTPDase. Essa modulação pode explicar a inibição na hidrólise dos nucleotídeos da adenina, nos pacientes hipertensos e controle, revelado pelo nosso estudo. A inibição na atividade da enzima pode acarretar um incremento na formação do trombo e aumento de desordens cardiovasculares.

O captopril auxilia na manutenção da hipertensão através da inibição da enzima conversora de angiotensina. Este hipotensor é capaz de degradar peptídeos como a bradicinina e aumentar a concentração de cálcio citosólico (SHARMA & ABBAS, 2005). O presente trabalho demonstrou que o captopril não foi capaz de interferir na hidrólise dos nucleotídeos da adenina. Os resultados apresentados estão de acordo com trabalhos prévios realizados em nosso laboratório (LUNKES et al., 2003).

5 CONCLUSÃO

Os vasodilatadores arginina, nitroprussiato de sódio e hidralazina interferiram na atividade da enzima NTPDase de plaquetas de pacientes hipertensos. Em pacientes saudáveis a atividade da enzima foi aumentada pela arginina, por outro lado foi inibida pelos vasodilatadores nitroprussiato de sódio e hidralazina. O captopril não interferiu na atividade da enzima NTPDase de plaquetas de ambos os pacientes estudados.

O nitroprussiato de sódio foi o vasodilatador que apresentou maior influência inibitória na atividade da enzima NTPDase. A inibição promovida pelo vasodilatador foi do tipo mista. O K_m apresentou-se aumentado e $V_{m\acute{a}x}$ apresentou-se diminuído. IC_{50} e K_i indicaram que o nitroprussiato de sódio é um potente inibidor da NTPDase, mesmo em baixas concentrações.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou que a atividade da enzima NTPDase pode ser modificada em plaquetas de pacientes hipertensos. No entanto, mais estudos são necessários para melhor entender os mecanismos envolvidos na possível diminuição da hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP e conseqüente alteração no processo trombótico. Esperamos que esses resultados representem uma importante contribuição para estabelecer a associação dos fármacos com os processos fisiológicos.

REFERENCIAL

ALEXANDER, R. Wayne. Hypertension and the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Hypertension**, v.25, p.155-161,1995.

ANFOSSI, G.; RUSSO, I.; MASSUCCO, P.; MATTIELLO, L.; BALBO, A.; CAVALOT, F.; TROVATI, M. Studies on Inhibition of Human Platelet Function by Sodium Nitroprusside. Kinetic Evaluation of the Effect on Aggregation and Cyclic Nucleotide Content. **Thrombosis Research**, v.102, p.319-330, 2001.

ANGGARD, E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. **Lancet**, v.343, p.1199-1206, 1994.

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S.C. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic target. **Blood cells, Molecules, and Diseases**, v.36, n.2, p.217-222, 2006.

BAKKER, W.W.; POELSTRA, K; BARRADAS, D.P.; MIKHAILIDIS, D.P. Platelets and ectonucleotidases. **Platelets**, v.5, p.121-129, 1994.

BANG, L. ; NIELSEN-KUDSK, J.E. ; GRUHN N. ; TRAUTNER, S.; et al. Hydralazine-induced vasodilation involves opening of high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. **European Journal of Pharmacology**, v.361, p. 43-49, 1998.

BARRETO, A.C.; FRANCHI, S.M.; PEREIRA A.C.; LOPES, A.A. Hipertensão Arterial Pulmonar. Fisiopatologia, Aspectos Genéticos e Resposta ao Uso Crônico do Sildenafil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.85, n.2, p.147-154, 2005.

BARRETO, A.C.; FRANCHI, S.M.; PEREIRA, A.C.; LOPES, A.A. Hipertensão arterial pulmonar. Fisiopatologia, Aspectos Genéticos e Resposta ao Uso Crônico do Sildenafil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.85, n.2, p.147-154, 2005.

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

BATLOUNI, M.; RAMIRES, J.A.F. **Farmacologia e terapêutica cardiovascular**, São Paulo: Atheneu, 1999.

BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T.; BARCELOS, C.K.; DIAS, R.D. et al. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rat. **Neurochemical Research**, v.16, p.1303-1310, 1991.

BILLET H.H. Antiplatelet agents and arterial thrombosis. **Cardiology Clinics**, v. 26, n. 2, p.189-201, 2008.

BIRK, A.V.; BROEKMAN, M.J.; GLADEK, E.M.; ROBERTSON, H.D. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.140, n.3, p.166-75, 2002,.

BLANN, A.D.; NADAR, S.; LIP, G.Y.H. Pharmacological modulation of platelet function in hypertension. **Hypertension**, v.42, n.1, p.1-7, 2003.

BLOCKMANS, D; DECKMYN, H; VERMYLEN, J. Platelet Activation. **Blood Reviews**, v.9, p.143-156, 1995.

BROILLET, M.C. S-nitrosylation of proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p.1036-42, 1999.

BRYDON, L.; MAGID, K.; STEPTOE, A. Platelets, coronary heart disease, and stress. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.20, p.113-119, 2006.

BUFFON, A; RIBEIRO, V.B.; FÜRSTENAU, C.R.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.F. Acetylsalicylic acid inhibits ATP diphosphohydrolase activity by platelets from adult rats. **Clinica Chimica Acta**, v.349, p.53-60, 2004.

CARVALHO, M.H.C.; NIGRO, D.; LEMOS, V.S. TOSTES, R.C.A. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, n.1, p.76-88, 2001.

CASINO, P.R.; KILCOYNE, C.M.; QUYYUMI, A.A.; HOEG, J.M.; PANZA, P.A. Investigation of decreased availability of nitric oxide precursor as a mechanism responsible for impaired endothelium dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients. **Journal of the American College of Cardiology**, v.23, p.844-850, 1994.

CASTRO, C.H.; FERREIRA, B.L.A.; NAGASHIMA, T.; SCHUELER, A. et al., Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.5, p.321-332, 2006.

CHAMBERS, D.A.; SALZMAN, E.W.; NERI, L.L. Characterization of "Ecto-ATPase" of human blood platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n.119, p.173-178, 1967.

CHEUNG, P.K.; VISSER, J.; BAKKER, W.W. Upregulation of antithrombotic ectonucleotidases by aspirin in human endothelial cells in vitro. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.46, p.1032-1034, 1994.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; et al. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. **Hypertension**, v.42, n.1206, p.1206-1252, 2003.

COSTA, A.F. et al. Intravenous apirase administration reduces arterial thrombosis in a rabbit model of endothelial denudation in vivo. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v.15, n.7, p.545-551, 2004.

DALAINAS I Cilostazol in the management of vascular disease. **International Angiology**, v.26, n.1, p.1-7, 2007.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, n.2, v.74, p.323-364, 1994.

DELLES, C.; MILLER, W.H.; DOMINIZAK, A.F; Targeting reactive oxygen species in hypertension. **Antioxid Redox Signal**, v.10, n.6, p.1061-1077, 2008.

DENIS, C.V.; WAGNER, D.D. Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.27, n.4, p.728-739, 2007.

DIAS, P.F.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.;MARASCHIM, R.P.; MARASCHIM, M. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 25, p.28-34, 2002.

V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Epidemiologia da hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.13, n.4, p.260-262, 2006.

V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Prevenção primária da hipertensão e dos fatores de risco associados. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.13, n.4, p.303-305, 2006.

DOCKRELL, M.E.C. ; WALKER, B.R. ; NOON, J.P. ; WATT, G.C.M. ; WILLIAMS, B.C. ; WEBB, D.J. Platelet aggregation in young men with contrasting predisposition to high blood pressure. **American Journal of Hypertension**, v.12, p.115-119, 1999.

DÓREA, E.L.; LOTUFO, P.A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. **Hipertensão**, v.7, n.3, p.86-89, 2004.

EL-OMAR, M.M.; ISLAM, N.; BROEKMAN, J.M.; DOSOPOULOS, J.H.F.; et al. The ratio of ADP-to ATP-ectonucleotidase activity is reduced in patients with coronary artery disease. **Thrombosis Research**, v.116, n.3, p.199-206, 2005.

ENJYOJI, K; SÉVIGNY, J.; LIN, Y; FRENETTE, P.S.; et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v.5, n.9, p.1010-1017, 1999.

ERLINGE D.; BURNSTOCK, G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. **Purinergic Signaling**, v.4, p.1-20, 2008.

EVORA, P.R.B.; PEARSON, P.J.; RODRIGUES, A.J.; VIARO, F.; SCHAFF, H.V. Relaxamento dependente do endotélio causado pela Poli-L-Arginina. Implicações sobre a hiperpolarização como mecanismo de vasodilatação. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.80, n.6, p.621-5, 2003.

FAVARATO, D.; LUZ, P.L. Hipertensão e aterosclerose: aspectos fisiológicos. **Hipertensão**, v.6, n.4, p.126-130, 2003.

FERSHT, A. **Structure and Mechanism in Protein Science** : A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. W. H. Freeman, 1998.

FRASSETTO, S.S.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.129, p.47-55, 1993.

FRASSETO, S.; DIAS R.D.D.; SARKIS, J.F.F. Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP, ADP, of the ATP diphosphohydrolase activity (E.C. 3.6.1.5) from rat blood platelets. **Biochemistry and Molecular Biology Internacional**, v.35, p.499-506, 1995.

FÜRSTENAU, C.R.; SPIER, A.P.; RÜCKER, B.; BERTI, S.L.; et al. The effect of selenium on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats. **Chemico-Biological Interaction**, v.148, p.93-99, 2004.

GACHET, C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. **Thrombosis Haemostasis**, v.99, n.3, p.466-472, 2008.

GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. CD 39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? **Purinergic Signaling**, v.2, n.2, p.391-398, 2006.

GOUMAS, G.; TENTOLOURIS, C.; TOUSOULIS, D.; STEFANADIS, C.; et al. Therapeutic modification of the L-arginine-eNOS pathway in cardiovascular diseases. **Atherosclerosis**, n.154, p.255-267, 2001.

GUCKELBERGER, O.; SUN, X.F.; SÉVIGNY, J.; IMAI, M.; et al. Beneficial effects of CD39/ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. **Thrombosis and Haemostasis**, v.91, n.3, p.576-86, 2004.

GUDMUNDSDÓTTIR, I.J.; McROBBIE, S.J.; ROBINSON, S.D.; NEWBY, D.E.; et al. Sildenafil potentiates nitric oxide mediated inhibition of human platelet aggregation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.337, n.1, p.382-385, 2005.

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.

GUS, I.; HARZHEIM, E.; ZASLAVSKY, C.; MEDINA, C. et al. Prevalência, reconhecimento e controle da hipertensão arterial sistêmica no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.83, n.4, 2004.

GUSMÃO, J.L.; JÚNIOR, D.M.; PIERIN, A.M.G. Avaliação da qualidade de vida do paciente hipertenso: proposta de um instrumento. **Hipertensão**, v.8, n.1, p.22-29, 2005.

GUYTIN, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002, 973p.

HIGASHI, Y.; YOSHIZUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacology & Therapeutics**, v.102, p.87-96, 2004.

ISHII-WATABE, A.; UCHIDA, E.; MIZUGUCHI, H.; HAYAKAWA, T. On the mechanism of plasmin-induced platelet aggregation. Implications of the dual role of granule ADP. **Biochemical Pharmacology**, v.59, n.11, p.1345-1355, 2000.

IWAKIRI Y.; SATOH A.; CHATTERJEE S.; TOOMRE D.K. et al. Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.52, p.19777-19782, 2006.

IYU, D.; ATUCHA, N.M.; MARTINEZ-PIETRO, C.; ORTIZ, C. et al. Altered calcium signaling in platelets from nitric oxide-deficient hypertensive. **Cell Communication and Signaling**, v.2, n.1, 2004.

KIRCHNER, S.M.; BONAN, C.D., BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. Effect of nitric oxide donors on extracellular ATP, ADP e AMP catabolism in rat hippocampal synaptosomes. **Brain Research Bulletin**, v.55, n.4, p.469-473, 2001.

KNOWLES, A.F; NAGY, A.K. Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. **European Journal of Biochemistry**, v.262, p. 349-357, 1999.

KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S.C.; SIEGEL, J.B. et al. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, n.15, p.1538-1544, 1999.

KRÖTZ, F. ; SOHN, H.Y. ; KELLER, M. ; GLOE, T. et al. Despolarization of endothelial cells enhances platelet aggregation through oxidative inactivation of endothelial NTPDase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.22, p.2003-2009, 2002.

KUWAHARA, M. et al. Platelet Shape Changes and Adhesion Under High Shear Flow. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.22, p.329-334, 2002.

LANGER, H.F.; GAWAZ, M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v.99, n.3, p.480-486, 2008.

LEAL, D.B.R.; STREHER C.A.; NEU T.N.; BITTRNCOURT F.P. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in humans lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1721, p.9-11, 2005.

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHEUS, J.W. et al. **Wintrobe Hematologia Clínica**, São Paulo: Manole, 1998, 2623p.

LEE, M.Y; GRIENDLING, K.K.; Redox sinaling, vascular function, and hypertension. **Antioxidante Redox Signaling**, v.10, n.6, p.1045-1059, 2008.

LÉVESQUE, S.A; LAVOIE, E.G; LECKA, J.; BIGONNESSE, F. et al. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. **British Journal Pharmacology**, v.152, n.1, p.141–150, 2007.

LIBERMAN, A. Aspectos epidemiológicos e o impacto clínico da hipertensão no indivíduo idoso. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.14, n.1, p.17-20, 2007.

LOURENÇO, Dayse Maria. Mecanismos envolvidos na formação do trombo. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.7, n.3, 1997.

LUNKES, G.I.; LUNKES, D.S.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v.109, n.4, p.189-194, 2003.

LUNKES, G.I.; LUNKES, D.S.; LEAL, D.; ARAÚJO, M.C. et al. Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.81, n.3, p.351-357, 2008.

MANO, Reinaldo, Temas comuns da cardiologia para médicos de todas as especialidades. **Manuais de Cardiologia**, a.9, 2007.

MARCUS, A.J. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.31, n.2, p.234-246, 2005.

MARCUS, J.A.; BROEKMN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.F.; ISLAM, N. et al. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/Ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.305, n.1, p.9-16, 2003.

MARJANOVIC JA; LI Z; STOJANOVIC A; DU X. Stimulatory roles of nitric-oxide synthase 3 and guanylyl cyclase in platelet activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.45, p.37430-37438, 2005.

MAZELIS, M. Enzymatic degradation of adenosine triphosphate do adenine by cabbage leaf preparations. **British Journal of Pharmacology and Physiology**, v.34, p.153-159, 1959.

MEGHJI, P.; PEARSON, J.D.; SLAKEY, L.L. Kinetics of extracellular ATP hydrolysis by microvascular endothelial cells from rat heart. **Biochemical Journal**, v.308, p.725-731, 1995.

MEZEI, Z; KIS, B.; GECSE, Á.; TELEGDY, G.; ÁBRAHÁM, G. et al. Platelet eicosanoids and the effect of captopril in blood pressure regulation. **European Journal of Pharmacology**, v.340, p.67-73, 1997.

MICHAELIS, I.; MENTEN, M. L. Kinetik der Invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.

MORGAN, R.O.; NEWBY, A.C. Nitroprusside differentially inhibits ADP-stimulated calcium influx and mobilization in human platelets. **The Biochemical Journal**, v.258, p.447-454, 1989.

MORRELL C.N.; MATSUSHITA K.; CHILES K.; SCHARPF R.B. et al. Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.10, p.3782-3787, 2005.

NEGRO, R. Endothelial effects of antihypertensive treatment: focus on irbesartan. **Vascular Health and Risk Management**, v.4, n.1, p.89-101, 2008.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **The American Journal of Physiology**, v.268, p.799-822, 1995.

PACKHAM M.A.; MUSTARD J.F. Platelet aggregation and adenosine diphosphate/adenosine triphosphate receptors: a historical perspective. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.31, n.2, p.129-38, 2005.

PERSSON, K; WHISS, P.A.; NYHLÉN K.; STRIER-JAOBSSON, M. et al. The interaction of vasoactive substances during exercise modulates platelet aggregation in hypertension and coronary artery disease. **BMC Cardiovascular Disorders**, v.8, n.1, p.1-11, 2008.

PETIDIS, K; DOUMA, S.; DOUMAS, M.; BASAGIANNIS, I.; et al. The interaction of vasoactive substances during exercise modulates platelet aggregation in hypertension and coronary artery disease. **BMC Cardiovascular Disorders**, p.8-11, 2008.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v.7, p.225-230, 1996.

PINSKY, D.J.; BROEKMN, M.J.; PESCHON, J.J.; STOCKING, K.L. et al. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v.109, n.8, p.1031-1040, 2002.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: indentities and functions. **International Review of Cytology**, v.158, p.141-214, 1995.

PODESSER B.K; HALLSTRÖM S. Nitric oxide homeostasis as a target for drug additives to cardioplegia. **British Journal of Pharmacology**, v.15, n.7, p.930-940, 2007.

POWERS, D.R.; PAPADAKOS, P.J.; WALLIN, D.J. Parenteral hydralazine revised. **Pharmacology in Emergency Medicine**, v.16, n.2, p.191-198, 1998.

PRELI, R.; KLEIN, K.P.; HERRINGTON, D.M. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. **Atherosclerosis**, v.162, p.1-15, 2002.

PULTE, D.; OLSON, K.E.; BROEKMAN, M.J.; ISLAM, N. et al. CD39 activity correlates with stage and inhibits platelet reactivity in chronic lymphocytic leukemia. **Journal of Translational Medicine**, v.4, p.5-23, 2007

RAMAMURTHI, A.; ROBSON, S.C.; LEWIS, R.S. Effect 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.

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

RUIZ, A.M.; VILLANUEVA, L; ORDUNÁ, C.G.; FERRER, D.L. et al. S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. **PNAS**, v.102, n.24, p.8525-8530, 2005.

RUSSELL, R. Mechanisms of disease: Atherosclerosis – an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v.320, n.2, p.115-126, 1999.

SABETKAR M; LOW S.Y.; BRADLEY N.J.; JACOBS M; et al. The nitration of platelet vasodilator stimulated phosphoprotein following exposure to low concentrations of hydrogen peroxide. **Platelets**, v.19, n.4, p.282-92, 2008.

SARKIS, J.J.F.; BATTASTINI, A.M.O; OLIVEIRA, E.M.; FRASSETTO, S.S. et al. ATP diphosphohydrolases: an overview. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.47, n.3, p.131-136, 1995.

SCHETINGER, M.R.C.; BONAN, C.D.; SCHIERHOLT, R.; WEBBER, A. et al. ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities from hippocampal synaptosomes alter brain ischemia. **Ecto-ATPases**, p.213-19, 1997.

SCHETINGER, M.R.; VIEIRA, V..L.P.; MORSCH, V.M.; BALZ, D. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part**, v.128B, p.731-741, 2001.

SÉVIGNY, J. et al. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase-1) and NTPDase-2 have implications for thromboregulation. **Blood**, v.99, n.8, p.2801-2809, 2002.

SILVA, JORGE LUIZ LIMA. Considerações sobre as classificações da pressão arterial: implicações nas ações de enfermagem. **Informe-se em Promoção da Saúde**, v.03, n.1, p.04-06, 2007.

SHARMA, J.N; ABBAS, S.A. A bradykinin antagonist abolishes beneficial effect of captopril on duration of survival after acute coronary artery ligation in hypertensive rats. **Pharmacological Research**, v.52, n.3, p.211-215, 2005.

SMALL, R. Systemic Pharmacology - Antihypertensive drugs. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 7, n.8, p.298-302, 2006.

SOBOL, A.B.; WATALA, C. The role of platelets in diabetes-related vascular complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.50, p.1-16, 2000.

STAFYLAS, P.C.; SARAFIDIS, P.A. Carvedilol in hypertension treatment. **Vascular Health and Risk Management**, v.4, n.1, p.23-30, 2008.

SUSIC, D; FROHLICH, E.D. The aging hypertensive heart: a brief update. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v.5, n.2, p.104-110, 2008.

TAPIERO, H.; MANTHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Arginine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.56, p.439-445, 2002.

TELES, C.P.S.; TAVARES FILHO, S.C.; SOUSA, A.C.S.; BARRETO-FILHO, J.A.S. Hipertensão: um estudo pró-trombótico. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.14, n.4, p.245-251, 2007.

VALENZUELA, M.A.; LÓPEZ, J.; DEPIX, M.; MANCILHA, M; et al. A transverso-cori Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant source. Characterization of microsomal apyrase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.93B, p.911-919,1989.

VANNI, D.S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A.M.; DAHER, J.P.L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.3, p.181-189, 2007.

VANNI, D.S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A.M.; DAHMER, J.P.L. et al. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.43, n.3, p.181-189, 2007.

VASCONCELOS, E.G.; NASCIMENTO, P.S.; MEIRELLES, M.N.L.; VERJOVSKI, S. et al. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external

surface of the tegument of *shistosoma mansoni*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v.58, p.205-214, 1993.

VORCHHEIMER, D.A.; BECKER, R. Platelets in Atherothrombosis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, n.1, p.59-68, 2006.

WAJCHENBERG, B.L. Disfunção Endotelial no Diabetes do tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.5, 2002.

WAKEFIELD, T.W.; MYERS, D.D.; HENKE P.K. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.28, n.3, p.387-91, 2008.

WEI, S.; KASUYA, Y.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S. et al. Studies on endothelium-dependent vasorelaxation by hydralazine in porcine coronary artery. **European Journal of Pharmacology**, v.321, p.307-314, 1997.

WILLOUGHBY, S.; HOLMES, A.; LOSCALZO, J. Platelets and cardiovascular disease. **European Journal of Cardiovascular Nursing**, v.1, n.4, p.273-288, 2002.

WÖLKART, G.; STESSEL, H.; BRUNNER, F. In vivo administration of D-arginine: effects on blood pressure and vascular function in angiotensin II-induced hypertensive rats. **Atherosclerosis**, v.176, p.219-225, 2004.

YIP, J. et al. Primary platelets adhesion receptors. **IUBMB Life**, v.57, n.2, p.103-108, 2005.

ZEIHER, A.M.; DREXTER, H.; SAURBIER, B. JUST, H. Endothelium mediated coronary blood flow modulation in human: effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**, v.92, p.652-662, 1993.

ZHOU X; BOHLEN H.G.; MILLER S.J. ; UNTHANK J.L. NAD(P)H Oxidase Derived Peroxide Mediates Elevated Basal and Impaired Flow-Induced NO Production in SHR Mesenteric Arteries In Vivo. **American Journal of Physiology**, v.3, 2008.

ZIMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on nomenclature. **Drug Development Research**, v.52, p.44-56, 2

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Título

Interferência de vasodilatadores na hidrólise dos nucleotídeos da adenina em plaquetas de pacientes hipertensos.

2. Objetivos

- a. Verificar a interferência dos vasodilatadores arginina, nitroprussiato de sódio, hidralazina e captopril, na atividade da enzima NTPDase em pacientes hipertensos e saudáveis;
- b. Determinar a cinética da enzima NTPDase frente ao vasodilatador que apresentar maior influência inibitória;

3. Registro

O estudo será desenvolvido no Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, no Laboratório de Enzimologia Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria. O presente estudo envolverá pacientes hipertensos vinculados ao Programa de Assistência aos Pacientes Diabéticos, Hipertensos e Diabéticos-Hipertensos da Secretaria Municipal de Saúde do município de Cruz Alta, RS. Esse estudo com voluntários humanos obteve a aprovação junto a Comissão de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria, com protocolo n° 013/2004.

4. Procedimento

Os pacientes serão submetidos a uma punção venosa com sistema vacutainer. O material biológico, sangue, será destinado para análise de plaquetas, soro e plasma para determinações bioquímicas e de atividade enzimática. As plaquetas serão analisadas no Laboratório de Enzimologia Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

5. Riscos individuais

Os pacientes que voluntariamente se submeterem às punções venosas, poderão em casos de coleta com procedimento errôneo desenvolver flebite, flebotrombose, hematoma local, petéquias.

6. Identificação do paciente voluntário

Nome: _____

Identidade: _____ Ass: _____

7. Cruz Alta, _____ de _____ de 200__.

ANEXO B

ACEITE DO ARTIGO “Effect of different vasodilators on NTPDase activity in healthy and hypertensive patients” PELO PERIÓDICO “Thrombosis Research”

Article title: EFFECT OF DIFFERENT VASODILATORS ON NTPDase ACTIVITY IN HEALTHY AND HYPERTENSIVE PATIENTS

Reference: TR3586

Journal title: Thrombosis Research

Corresponding author: Dr Vera Maria Morsch

First author: Dr. Daniele Sausen Lunkes

Received at Editorial Office: 7-JUL-2008

Article revised: 3-DEC-2008

Article accepted for publication: 3-DEC-2008

Expected dispatch of proofs: 8-JAN-2009

The expected dispatch date of your proofs is 8-JAN-2009. Please note this date is only provided as a guide: it may change due to variations in the production process. You will receive the proofs by e-mail. Please be aware that we cannot accommodate requests to change the dispatch date of the proofs.

When you receive the proofs please use them to check the typesetting and editing, as well as the completeness and correctness of the text, tables and figures. Changes to the article as accepted for publication will not be considered. You may also be asked to answer any questions that have arisen during the preparation of your proofs and these are included in a "query form" which is sent along with the proofs. Please note all corrections to the paper, such as changes to the title, authors or addition of acknowledgements, can be made when you receive the proofs. Please do not reply to this mail requesting changes at this stage.

More detailed information will follow when you receive the proofs.

You can track the progress of your article via our article tracking service at <http://authors.elsevier.com/trackarticle>.

To track your article you will need to provide the following details:

- OUR REFERENCE = TR3586
- CORRESPONDING AUTHOR'S SURNAME = Morsch

Did you know that you can log in and track the status of your article from your homepage? All you need to do is add your article's details to your list of accepted/published articles.

This e-mail has been sent to you from Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands. To ensure delivery to your inbox (not bulk or junk folders), please add support@elsevier.com to your address book or safe senders list.

Copyright (c) 2008 Elsevier B.V. All rights reserved. Please read our privacy policy at <http://www.elsevier.com/privacypolicy>