

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

**HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM  
PLAQUETAS DE PACIENTES COM  
DIFERENTES NÍVEIS DE COLESTEROL E SUA  
RELAÇÃO COM O PROCESSO INFLAMATÓRIO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MARTA MARIA MEDEIROS F. DUARTE**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM  
PLAQUETAS DE PACIENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE  
COLESTEROL E SUA RELAÇÃO COM O  
PROCESSO INFLAMATÓRIO**

**por**

**Marta Maria Medeiros F. Duarte**

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

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Lúcia Loro  
Co - orientadores: Profa. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger  
Prof. Dra. João Batista Teixeira da Rocha

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2006

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

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

**HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM PLAQUETAS DE  
PACIENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE COLESTEROL E SUA  
RELAÇÃO COM O PROCESSO INFLAMATÓRIO**

elaborada por  
**Marta Maria Medeiros F. Duarte**

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

**Comissão examinadora:**

---

**Profª. Dra. Vânia Lúcia Loro**  
(Presidente/Orientador)

---

**Profª. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse (UFRGS)**

---

**Profª. Dra. Solange Cristina Garcia Pomblum (UFSM)**

Santa Maria, 10 de outubro de 2006.

## **DEDICATÓRIA**

**Ao Paulo, grande incentivador e amigo.  
Obrigado pelo teu companheirismo e  
dedicação, pois sem a atenção e a ternura ,  
os obstáculos se tornariam mais fortes que  
os meus ideais.**

**Ao meu filho Thiago, peço perdão por não  
ter dado atenção e carinho nos momentos  
que me solicitava.  
Obrigado por tua compreensão.**

**Aos meus pais, Antônio e Maria de Lurdes,  
obrigado pelo estímulo, esforço e por  
acreditar que o aperfeiçoamento  
profissional é o caminho para uma saúde  
mais digna.**

**Ao meu irmão Rafael, pela nossa união e  
amizade.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus que proporcionou a minha existência e a energia necessária para realizar os meus ideais.

À minha família, que é a razão única da minha persistência.

À professora orientadora Vânia Lúcia Loro, cujo zelo, disponibilidade, eficiência e incentivo contribui de maneira decisiva na realização deste trabalho.

Sejam também consignados os melhores agradecimentos aos co-orientadores, professora Maria Rosa Chitolina Schetinger, pelos ensinamentos incondicionais transmitidos e ao professor João Batista Teixeira da Rocha, pela inestimável ajuda na análise estatística.

Aos Diretores do Labimed, os quais me incentivaram, confiaram no meu trabalho, oportunizando o meu crescimento profissional.

À funcionária do Labimed Solange Maria dos Santos, grande profissional, que muitas vezes abdicou de seu tempo livre, para auxiliar na minha pesquisa.

Aos amigos Alessandra Barbieri e Luciano Terra pelo fornecimento de kits e conteúdos teóricos e técnicos, sem o qual este trabalho não teria se materializado.

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

Aos professores do Programa de Pós Graduação de Bioquímica Toxicológica, pelo espírito empreendedor e pela luta constante para a qualificação profissional de seus alunos.

Aos colegas pela convivência, companheirismo e amizade que certamente continuará por toda nossa existência.

As professoras Angela Terezinha de Souza Wyse e Solange Cristina Garcia Pomblum por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Aos amigos cujo apoio e palavras de incentivo, me auxiliaram a manter forte o desejo de conquistar meus objetivos e realizar os meus sonhos, a minha eterna gratidão.

**“É muito melhor arriscar coisas grandiosas mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito e nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta, sem conhecer vitória nem derrota”.**

(Franklin D. Roosevelt)

## RESUMO

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

### **HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE COLESTEROL E SUA RELAÇÃO COM O PROCESSO INFLAMATÓRIO**

Autora: MARTA MARIA MEDEIROS F. DUARTE

Orientadora: Vânia Lúcia Loro

Co – Orientadores: MARIA ROSA SCHETINGER

JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

Data e local de Defesa: Santa Maria, 10 de outubro de 2006.

A atividade da NTPDase (EC 3.6.1.5, apyrase, CD39) foi verificada em plaquetas de pacientes com diferentes níveis de colesterol. Uma possível associação entre os níveis de colesterol e os marcadores inflamatórios como LDL oxidado (oxLDL), proteína C reativa ultrasensível (hsCRP) e anticorpos anti-LDL oxidado (Anti-oxLDL) foi investigado. Os seguintes grupos foram estudados: grupo I (< 150 mg/dl), grupo II (151 a 200 mg/dl); grupo III: (201 a 250 mg/dl); grupo IV (> 251 mg/dl) de colesterol. Os resultados demonstraram que a hidrólise dos nucleotídeos (ATP e ADP) aumentou em função dos níveis de colesterol. Os níveis de LDL aumentaram concomitantemente com os níveis de colesterol total. Os níveis de triglicerídeos foram elevados no grupo com colesterol total acima de 251 mg/dl. Os níveis de oxLDL foram elevados nos grupos II, III and IV. A hsCRP foi elevada no grupo com colesterol maior que 251 mg/dl. Os Anti-oxLDL foram elevados nos grupos III e IV. O conteúdo de TBARS foi aumentando em função dos níveis de colesterol. Em resumo, a hipercolesterolemia está associada com o aumento da resposta inflamatória e hidrólise de ATP e ADP. O aumento da atividade da NTPDase está possivelmente relacionado com uma resposta compensatória ao estado inflamatório e pró-oxidativo associado com a hipercolesterolemia.

Palavras chave: NTPDase; CD39; colesterol; hsCRP; oxLDL; anti-oxLDL.

**ABSTRACT**

Master Dissertation  
Toxicological Biochemistry Post-Graduation  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with different cholesterol levels and inflammatory processes**

Author: MARTA MARIA MEDEIROS F. DUARTE

Oriented by: VÂNIA LÚCIA LORO

Co-oriented by: MARIA ROSA SCHETINGER

JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

Date and place of the defense: Santa Maria, October 10nd, 2006.

The activity of NTPDase (EC 3.6.1.5, apyrase, CD39) was verified in platelets from patients with increasing cholesterol levels. A possible association between cholesterol levels and inflammatory markers, such as oxidized low density lipoprotein (oxLDL), highly sensitive C-reactive protein (hsCRP) and oxLDL autoantibodies was also investigated. The following groups were studied: group I (< 150 mg/dl), group II (151 to 200 mg/dl); group III: (201 to 250 mg/dl); group IV (> 251 mg/dl) of cholesterol. The results demonstrated that both ATP and ADP hydrolysis were enhanced as a function of cholesterol levels. The LDL levels increased concomitantly with total cholesterol levels. The triglyceride levels were increased in the group with total cholesterol above 251 mg/dl. oxLDL levels were elevated in groups II, III and IV. hsCRP was elevated in the group with cholesterol higher than 251 mg/dl. oxLDL autoantibodies were elevated in groups III and IV. TBARS content was enhanced as a function of cholesterol levels. In summary, hypercholesterolemia is associated with an enhanced of inflammatory response and ATP and ADP hydrolysis. The increase in NTPDase activity is possibly related to a compensatory response to the inflammatory and pro-oxidative state associated with hypercholesterolemia.

Keywords: NTPDase; CD39; cholesterol; hsCRP; oxLDL; oxLDL autoantibodies.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 01 – Resposta imune a oxidação do colesterol LDL .....	12
FIGURA 02 – Adesão, ativação, agregação e formação do trombo plaquetário.....	14
FIGURA 03 – Estrutura das enzimas da família NTPDase.....	16
FIGURA 04 – Papel fisiológico da NTPDase no endotélio vascular.....	18

### MANUSCRITO

FIGURA 1A – ATP hydrolysis of patients with hypercholesterolemia.....	38
FIGURA 1B – ADP hydrolysis of patients with hypercholesterolemia.....	39
FIGURA 2A– Correlation analysis between cholesterol levels and ATP hydrolysis...	40
FIGURA 2B – Correlation analysis between cholesterol levels and ADP hydrolysis.	41
FIGURA 3 – Correlation between cholesterol levels and TBARS .....	42

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

TABLE 1– HDL, LDL, triglyceride and glucose (mg/dl) levels of patients with different cholesterol levels.....36

TABLE 2– oxLDL (mg/dL), hsCRP (mg/L) and oxLDL autoantibodies (mg/L) in patients with different cholesterol levels.....36

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACR – Região conservada da apyrase  
ADP – Adenosina difosfato  
AMP – Adenosina monofosfato  
Anti-ox LDL – Anticorpos anti LDL oxidado  
ApoB – 100 – Apolipoproteína B  
ATP – Adenosina trifosfato  
CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio  
CETP – Proteína de transferência de colesterol esterificado  
CRP – Proteína C reativa  
DNA – Ácido desoxiribunucleico  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
HDL – Lipoproteína de alta densidade  
HEPES – Ácido N-2-hidroxietilpiperazina  
HMG-CoA redutase – Hidróxi-metil-glutaril CoA redutase  
hsCRP – Proteína C reativa ultrasensível  
ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular - 1  
IDL– Lipoproteína de muito baixa densidade  
IFN- $\gamma$  – Interferom  $\gamma$   
IL-1 – Interleucina 1  
IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 $\beta$   
IL-2 – Interleucina - 2  
IL-6 – Interleucina 6  
KCl – Cloreto de potássio  
LCAT– Lecitina colesterol acil transferase  
LDH – Lactato desidrogenase  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
MCP-1– Proteína quimiotática de monócitos-1  
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade.  
NaCl – Cloreto de sódio  
NTPDase – Nucleosídeo trifosfato dihidrolase

oxLDL – Colesterol LDL oxidado  
PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio  
Pi – Fosfato inorgânico  
PRP – Plasma rico em plaquetas  
RLP – Receptor LDL relacionado à proteína  
RNA – Ácido ribonucléico  
SR – Receptores scavenger  
TCA – Ácido tricloroacético  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
TNF- $\beta$  – Fator de necrose tumoral  $\beta$   
VCAM -1 – Molécula de adesão da célula vascular - 1  
VLDL – Lipoproteína de baixa densidade  
vWF – Fator von Willebrand

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>02</b>
<b>2.1. Objetivos.....</b>	<b>05</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>06</b>
<b>3.1. Perfil lipídico.....</b>	<b>06</b>
<b>3.2. Hipercolesterolemia.....</b>	<b>08</b>
<b>3.3. Arteriosclerose.....</b>	<b>09</b>
<b>3.4. Resposta imune a oxidação do colesterol LDL.....</b>	<b>09</b>
<b>3.5. Fatores tromboembólicos e hemostasia.....</b>	<b>12</b>
<b>3.6. Enzima ectonucleosídeo trifosfato dihidrofosfoidrolase .....</b>	<b>15</b>
<b>3.6.1. Famílias NTPDase.....</b>	<b>15</b>
<b>3.6.2. Estrutura enzimática e propriedades catalíticas da NTPDase.....</b>	<b>16</b>
<b>3.6.3. Papel fisiológico da NTPDase.....</b>	<b>17</b>
<b>3.6.4. Receptores purinérgicos.....</b>	<b>19</b>

<b>4. MANUSCRITO</b> Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes: Marta Medeiros Frescura Duarte, Vânia Lúcia Loro, João Batista Teixeira da Rocha, Andreza Fabro de Bem, Aracéli Dorneles, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger.....	20
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	45
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46

## 1. APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **MANUSCRITO**. As seções Materiais e Métodos e Resultados, encontram-se no próprio artigo.

Os itens **DISCUSSÃO, CONCLUSÕES e REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** encontram-se no final desta dissertação.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E DISCUSSÃO** desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica **European Journal of Biochemistry** a qual foi submetido.

## 2. INTRODUÇÃO

A hipercolesterolemia é um fator determinante para o surgimento da arterosclerose, principal causa do infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose, angina e demais doenças isquêmicas. Pode afetar artérias do cérebro, coração (Manolio et al.,1999) e rins (Jungers et al.,1997; Tonelli et al., 2001; London et al., 2002). Atinge, principalmente, artérias de grande e médio calibre (Ross, 1993); também foi descrita em pequenas veias (vênulas) de diferentes tecidos animais, estando presente em toda a árvore vascular (Stary et al.,1995). A arterosclerose é uma doença inflamatória que está associada à ativação da célula endotelial (Ross,1999). O endotélio ativado produz fatores de crescimento, expressão de moléculas de aderência dos leucócitos (ICAMS, VCAMS, integrinas e selectinas) (Scalia et al., 1998; Liyama et al.,1999). No processo de ativação endotelial ocorre a migração e a proliferação de macrófagos e linfócitos T, facilitado a transmigração para o espaço subendotelial. A oxidação das partículas de LDL, forma células espumosas (foam cell) e agregação plaquetária, com distúrbios da função antitrombogênica (Hansson et al.,1991). Estes eventos levam à disfunção dos fatores óxido nítrico e endotelina-1, reguladores do tônus da célula muscular lisa (SMC) da camada média (Sakai et al., 1997; Bloodsworth et al., 2000), promovendo o espessamento da camada íntima, com rompimento da camada média, conduzindo a formação de trombos (Ross,1999; Armstrong et al., 2006 b).

Classicamente, os fatores de desenvolvimento da arterosclerose são: elevados níveis de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), LDL-oxidado, triglicérides, baixos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) (Brewer, 2004; Forrester et al., 2005), marcadores inflamatórios (Libby 2002), homocisteína e a agregação plaquetária (Furman et al.,1998). O LDL permanece na circulação por vários dias e nestes períodos pode adentrar a parede vascular (Mayr et al., 2005). O acúmulo de lipídios nos macrófagos e nas SMC é o aspecto central da aterogênese. A oxidação do LDL é induzida pelos radicais livres produzidos pelos macrófagos, células endoteliais ou SMC (Heinecke, 1998). Ocorre uma mudança oxidativa do LDL e a absorção das partículas de lipoproteínas modificadas pelos



macrófagos que, por sua vez, se transformam em células carregadas, ricas em colesterol (Lusis, 2000).

A oxidação do LDL é uma fase obrigatória para a formação das células espumosas. O LDL oxidado (oxLDL) é reconhecido pelo macrófago através de receptores scavenger tipo SR-AI, SR-AII, CD36 (Lougheed et al., 1997) e receptor LDL relacionado à proteína (LRP) (Kounnas et al., 1992). Os macrófagos fagocitam as moléculas de lipoproteínas, tornando-se ricos em conteúdo lipídico, formando assim, a célula espumosa (Libby, 2000; Witztum & Steinberg, 2001). Os anticorpos contra o oxLDL foram encontrados em vários estudos no plasma humano, coelho e em lesões arterioscleróticas (Rosenfeld et al., 1990; Dijkstra et al., 1996; Shaw et al., 2003). Além disso, o oxLDL induz a formação de anticorpos, produção de mediadores inflamatórios como proteína C reativa (CRP), Interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Foi sugerida uma correlação positiva entre CRP e LDL oxidado em seres humanos (Holvoet et al., 1998; Armstrong et al., 2006 a).

A CRP é um marcador de fase aguda de processos inflamatórios, estando presente na doença arterial coronária, implicando em risco elevado de infarto agudo do miocárdio em pacientes com angina instável (Toss et al., 1997; Ford & Giles, 2000) e acidente vascular cerebral em homens e mulheres (Ridker, 2001; Yasmin et al., 2004). A produção de CRP é regulada pela Interleucina-1 (IL-1), IL-6 e TNF- $\alpha$  (Prabhu, 2004; Napoli et al., 2005; Prasad, 2006).

As plaquetas podem acumular-se nas lesões arterioscleróticas, recrutando plaquetas adicionais para formar trombos, quando níveis de colesterol sanguíneos estão elevados (Stormorken & Sakariassen, 1997; Arakawa et al., 2005; Armstrong et al., 2006 c). As plaquetas, angiotensina II e o receptor CD36 são contribuintes com a patogênese das doenças cardiovasculares (Lorenzi, 2003; Granger et al., 2004). As plaquetas representam uma importante fonte dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP que atuam na agregação plaquetária (Stafford et al., 2003). Estes nucleotídeos parecem regular a homeostase através da ativação e cooperação de três receptores purinérgicos plaquetários do tipo P2, chamados P2Y, P2X e ainda P2T (Di Virgilio et al., 2001). A concentração desses nucleotídeos depende da quantidade liberada, do efeito da diluição no espaço extracelular e da atividade de enzimas de hidrólise, tais como as

ectonucleotidases (Gordon, 1986). Existem muitas enzimas que hidrolisam ATP e ADP separadamente (Battastini, 1990). A NTPDase (CD39 , EC.3.6.1.5) é uma enzima capaz de degradar tanto o ADP quanto o ATP (Meyerhof,1945; Robson et al., 2006). Além disto, a 5'-Nucleotidase (CD73, E.C.3.1.3.5), catalisa especificamente a hidrólise de AMP até adenosina. Assim, estas enzimas agem na regulação da formação do tampão primário (Zimmermann, 2001). Estudos têm demonstrado a presença de uma NTPDase nas células endoteliais e que esta pode inibir a agregação plaquetária através da hidrólise de ADP (Marcus et al., 1997; Birk et al., 2002). Assim, a presença de um mecanismo enzimático, capaz de hidrolisar os nucleotídeos na circulação é importante para limitar a agregação plaquetária e a conseqüente formação de trombos induzidos por esses agentes (Pilla et al., 1996; Marcus et al. 2001; Wagner & Burger, 2003). Vários trabalhos relatam que a NTPDase é um agente anti-agregante e que juntamente com outros fatores participa na trombo-regulação (Gayle et al., 1998; Marcus et al., 2001; Marcus et al., 2003; Araújo et al., 2004).

A relação entre a arterosclerose e possíveis fatores desencadeantes, já foram avaliados em alguns estudos (Dijkstra et al.,1996; Holvoet et al., 1998; Ford et al., 2000; Armstrong et al., 2006 a), porém a maioria destes, relaciona os níveis de colesterol LDL-oxidado com o processo inflamatório. Vários outros fatores podem estar relacionados com a formação das placas de ateroma. O presente estudo pretende avaliar se diferentes níveis de colesterol total afetam a atividade da enzima NTPDase (CD39) em plaquetas. Este estudo também pretende verificar a concentração de colesterol capaz de induzir a produção de marcadores inflamatórios.

## 2.1 OBJETIVOS

### 2.1.1. Objetivo geral

Verificar a relação da atividade da enzima NTPDase em plaquetas de pacientes com diferentes níveis de colesterol e sua relação com o processo inflamatório.

### 2.1.2. Objetivos específicos

- Verificar a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP em plaquetas de pacientes com níveis elevados de colesterol.
- Relacionar os níveis de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos com a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP.
- Verificar se os níveis de colesterol total relacionam-se com os níveis de LDL, LDL oxidado, anticorpos anti-LDL e hsCRP.
- Relacionar a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP com os níveis de LDL oxidado, anticorpos anti-LDL oxidado e hsCRP.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PERFIL LIPÍDICO

O perfil lipídico utilizado na rotina laboratorial é composto pelas dosagens de colesterol total, lipoproteínas (LDL-colesterol - colesterol transportado pela lipoproteína de baixa densidade, HDL-colesterol - colesterol transportado pela lipoproteína de alta densidade) e triglicerídeos (Simons & Toomre, 2000). O colesterol é encontrado em praticamente todas as células e líquidos orgânicos. Ele é um álcool sólido que contém 27 átomos de carbono e possui o esqueleto tetracíclico do ciclopentano peridrofenantreno. É o ponto de partida de muitas vias metabólicas, que incluem a síntese de vitamina D, dos hormônios esteróides e do metabolismo dos ácidos biliares. Como componente estrutural importante das membranas celulares, influencia na sua fluidez e no estado de ativação de enzimas ligadas a membranas (Qui et al., 2006).

As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte dos lipídeos no plasma e são compostas por lipídeos e proteínas, as chamadas apolipoproteínas. Existem quatro grandes classes de lipoproteínas: as maiores e menos densas ricas em triglicerídios, os quilomícrons, de origem intestinal, e as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) de origem hepática. As lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e as lipoproteínas de densidade alta (HDL). Existe ainda uma quinta classe, as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). Os quilomícrons são os responsáveis pelo transporte dos lipídeos da dieta (via exógena) (Cooper, 1997; Kamoun et al., 2006). O transporte de lipídeos de origem hepática ocorre por meio da VLDL e LDL, que caracteristicamente contém lipoproteína apo B-100 (via endógena). Os triglicerídios das VLDL, assim como os dos quilomícrons, são hidrolizados pela lipase lipoprotéica (Goldberg, 1996). Os ácidos graxos são liberados para os tecidos e metabolizados. Os quilomícrons se transformam em remanescentes que são removidos pelo fígado por receptores específicos, sendo que o mais aparente é o receptor da LDL (Cooper, 1997).

Uma parte das VLDL se transforma em LDL após a perda de componentes de superfície lipídicos e protéicos. As VLDL trocam triglicerídios por ésteres de colesterol com as HDL e LDL por intermédio da proteína de transferência de colesterol

esterificado (CETP) (Tall, 1993; Wilsie et al., 2006). Tanto as VLDL como as LDL serão removidas no fígado por intermédio de ligação com receptores específicos (Brown & Goldstein, 1986; Melchior et al., 2005). A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima HMG-CoA redutase (hidróxi-metil-glutaril CoA redutase) que é a enzima limitante da síntese do colesterol hepático (Pease & Leiper, 1996).

A LDL normalmente transporta 70% do total de colesterol do plasma. Quando as concentrações de LDL estão elevadas, ocorre um aumento do risco de arterosclerose (Lusis, 2000; Farmer & Gotto, 2002; Armstrong et al., 2006 a), pois promove a ativação plaquetária e a expressão do fator tecidual (Ray & Rosendaal, 2001). As partículas de HDL são constituídas predominantemente por proteínas e fosfolipídeos, são formadas no plasma e compartimento extravascular. A apo A-I e a apo A-II, constituem o principal conteúdo protéico da HDL. O colesterol livre da HDL é esterificado pela ação da lecitina colesterol acil transferase (LCAT). A HDL transporta o colesterol dos tecidos para o fígado, que faz a conversão desse colesterol para sais biliares. O colesterol será eliminado no chamado transporte reverso do colesterol (Fielding & Fielding, 1995). O aumento dos níveis de HDL confere um efeito protetor contra a cardiopatia isquêmica (Junyent et al., 2006; Yokoyama, 2006). Apresenta também propriedades anti-trombóticas por inibir a agregação plaquetária, redução da viscosidade do sangue, supressão da atividade do fator tecidual e do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) e aumento da inativação do fator de coagulação V pela ativação da proteína C (Carine et al., 2004).

Os triglicerídios são a forma de armazenamento energético mais importante no organismo, constituindo depósitos no tecido adiposo e muscular (Hokanson & Austin, 1996). Constituem aproximadamente 95% do tecido adiposo em peso, sendo a principal forma de armazenamento de lipídeos no homem (Marcovina et al., 1994). Os triglicerídios parecem contribuir também para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, pois aumentariam os níveis do fator VII de coagulação, PAI-1 e a viscosidade do sangue (Griffin et al., 2001). Os triglicerídeos também contribuem para aterogenicidade, pois são os constituintes principais dos quilomícron e das VLDL. As

VLDL contribuem para o acúmulo de lipídios nos macrófagos humanos, promovendo a formação das "x" (células espumosas) (Moore & Freeman, 2006).

As lipoproteínas têm um papel específico no transporte de lipídeos na circulação. Entretanto, algumas vezes, ocorrem distúrbios que promovem uma diminuição das lipoproteínas (hipolipoproteinemia) ou um aumento das mesmas (hiperlipoproteinemia), o que é mais comum. A hiperlipoproteinemia pode ser primária ou secundária. As formas primárias são determinadas geneticamente (Dastani et al., 2006). Em decorrência dessa alteração genética, podem ocorrer defeitos em apolipoproteínas, sítios de receptores ou em algumas das enzimas utilizadas pelo sistema de transporte dos lipídeos (Forcheron, et al., 2005; Wung et al., 2006). As formas secundárias de hiperlipoproteinemia são decorrentes de outras afecções, incluindo doenças e alguns fatores ambientais. Entre as causas mais freqüentes, destaca-se o hipotireoidismo, Diabetes Mellitus, alcoolismo, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, hepatopatia e o uso de alguns fármacos (Ascaso et al., 1999; Hirany, et al., 2000; Alexander et al., 2003; Gazi et al., 2006). Podem ocorrer também variações nos níveis de colesterol e lipoproteínas de acordo com a idade e com o gênero do paciente (Danesh et al., 2000; Jaffer et al., 2002).

### **3.2 HIPERCOLESTEROLEMIA**

Os tecidos periféricos sintetizam aproximadamente 9 mg de colesterol, por quilograma do peso corporal, por dia e este deve ser removido para o fígado para o efetivo metabolismo. As distorções no transporte do colesterol podem favorecer seu depósito na parede das artérias e vasos, contribuindo para o desenvolvimento da arterosclerose (Dietschy et al., 1993; Eckardstein et al., 2001). Considera-se hipercolesterolemia quando o nível de colesterol total sanguíneo for maior ou igual a 200 mg/dL (Hamasaki et al., 2000). É considerada como um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, sendo uma das principais causas de mortalidade mundial (Stamler et al., 1986; Al-Shaer et al., 2004; Bhatt et al., 2006).

### **3.3 ARTEROSCLEROSE**

A arterosclerose é uma doença inflamatória crônica, subclínica, presente já na infância e que avança, de forma generalizada, durante toda a vida. Ao comprometer os vasos, predispõe ao aparecimento de doença cardiovascular, cerebrovascular, renovascular ou arterial periférica (Berliner et al., 1995).

A inflamação crônica na parede vascular é representada por monócitos, macrófagos e linfócitos T ativados (Hansson et al., 1989; Libby & Hansson, 1991; Ross, R, 1993). A secreção de citocinas pró-inflamatórias; produção de anticorpos (Hansson, 2001), marcadores inflamatórios, como CRP, proteína sérica amilóide A (Ridker, 1998, 2001), fibrinogênio (Toss et al., 1997) e agregação plaquetária (Barlage, et al., 2006), são componentes que também contribuem para a formação da placa aterosclerótica.

Os fatores clássicos no desenvolvimento da arterosclerose são elevação nas taxas de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), LDL-oxidado, triglicerídeos, baixos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) (Brewer, 2004; Forrester et al., 2005), aumento dos níveis dos marcadores inflamatórios, homocisteína (Libby, 2002) e agregação plaquetária (Sevit, 1986; Furman et al., 1998).

### **3.4 RESPOSTA IMUNE A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL LDL**

A hipercolesterolemia favorece um recrutamento de células do sistema imune para a parede dos vasos, ocorrendo depósito do LDL no espaço subendotelial (Boren et al., 2000; Skalen et al., 2002). O LDL depositado associa-se com os materiais da matriz extracelular e sofre oxidação, formando o LDL oxidado (Harrison, 1997; Holvoet et al., 1998). A oxidação do LDL é induzida pelos radicais livres produzidos pelos macrófagos, células endoteliais ou SMC (Heinecke, 1998; Harrison et al., 2003; Armstrong et al., 2006 b). A peroxidação lipídica, inicia nos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidios, propagando-se aos lípidios do núcleo, como o colesterol livre e ésteres de colesterol (Albertini et al., 2002). A presença de oxLDL aumenta a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais, quimiotaxia de monócitos, expressão de

genes das proteínas inflamatórias e desestabilização das placas. Estimula a liberação de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e Interleucina - 6 (IL-6) (Hulthe & Griendling & Ushio-Fukai,1998; Fagerberg, 2002).

O oxLDL induz as células endoteliais a expressar o ICAM-1 (molécula de adesão intercelular -1 ) e VCAM -1 (molécula de adesão da célula vascular -1), permitindo que os monócitos e linfócitos T possam se aderir às células endoteliais, através de seus receptores MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) (Scalia et al 1998). Ocorre a migração dos monócitos do sangue periférico para o espaço subendotelial. Quando o LDL é oxidado, transforma-se em um auto-antígeno. Os receptores scavenger (SRA-I, SRA-II, LRP e CD 36) localizados na superfície dos macrófagos, reconhecem oxLDL e este é internalizado pelos macrófagos, formando as células espumosas. Os macrófagos processam o auto-antígeno promovendo a ativação dos linfócitos T e secreção de citocinas (Kounnas et al.,1992; Qin et al., 2006). Os macrófagos ativados secretam citocinas pro-inflamatórias como IFN -  $\gamma$  (interferon -  $\gamma$ ), fator de necrose tumoral -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, as quais podem potencializar a expressão dos receptores scavenger, induzir fatores pró-coagulantes, fibrinolíticos e aumentar as propriedades adesivas das células endoteliais (Geng & Hansson, 1992; Liao et al., 1999; Persson et al., 2006).

Os linfócitos T (CD4) ativados proliferam e passam também a secretar as citocinas pró-inflamatórias como, TNF -  $\alpha$  e  $\beta$ , Interleucina - 2 (IL-2) e IFN -  $\gamma$ , que causam ainda uma maior ativação de macrófagos, ativação vascular e inflamação (Frostegård et al., 1999). O IFN -  $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 estimulam a proliferação das SMC e a síntese de colágeno, as quais se agregam as células espumosas, completando a formação da placa ateromatosa (Libby et al., 1988; Schachter, 1990; Tingström et al., 1992). Os ateromas podem progredir para formar placas fibrosas. Neste processo de formação, as células espumosas começam a se prostrar entre as células endoteliais e entram no lúmen em virtude da ruptura da junção da célula endotelial. As células espumosas podem agir como pontos trombogênicos, com formação de microtrombos de plaquetas nas superfícies expostas. O conteúdo lipídico é um fator importante na determinação da susceptibilidade à ruptura da placa fibrosa (Kusumoto, 2001).

A IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$ , induzem a expressão dos gens hepáticos a sintetizarem, as proteínas de fase aguda como a CRP e soro amiloide A (Amberger et al., 1997).



Concentrações elevadas de CRP atuam diretamente no recrutamento de leucócitos e apoptose na parede do vaso (Ikeda et al., 1992; Pasceri et al., 2000; Verma et al., 2004). A CRP provoca efeitos pró-inflamatórios e pró-arterosclerótico no endotélio vascular. Seus níveis elevados aumentam a síntese das moléculas de adesão leucocitária e plaquetária (E-selectina e P-selectina), estimulando a quimiotaxia e favorecendo a transmigração leucocitária para a íntima vascular e a adesão plaquetária (Pasceri et al., 2000; Ley et al., 2003; Prasad, 2006). A presença de CRP em altas concentrações inibe a síntese do óxido nítrico nas células endoteliais, facilitando a apoptose destas células e bloqueia a angiogênese (Verma et al., 2002). Seus efeitos pró-aterogênicos são evidenciados por estimular a migração, proliferação das SMC, e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Wang et al., 2003; Verma et al., 2004). Os linfócitos T (CD8), também participam da resposta imune, causam um ataque citotóxico nas SMC, quando as mesmas estão apresentando fragmentos lipídicos associados a proteínas de classe I do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), levando a apoptose destas células (Geng et al., 1997). Os linfócitos B podem ocorrer na camada adventícia e no tecido conectivo, sendo os responsáveis pela síntese dos anticorpos anti-oxLDL (Parums et al., 1986; Hansson et al., 1984; Hansson, 2001). Os Anti-oxLDL, desempenham uma função imunoprotetora, contra o desenvolvimento da arterosclerose, pois neutralizam e catabolizam o ox-LDL (Fukumoto et al., 2000; Matsuura, 2006), (Fig.1).

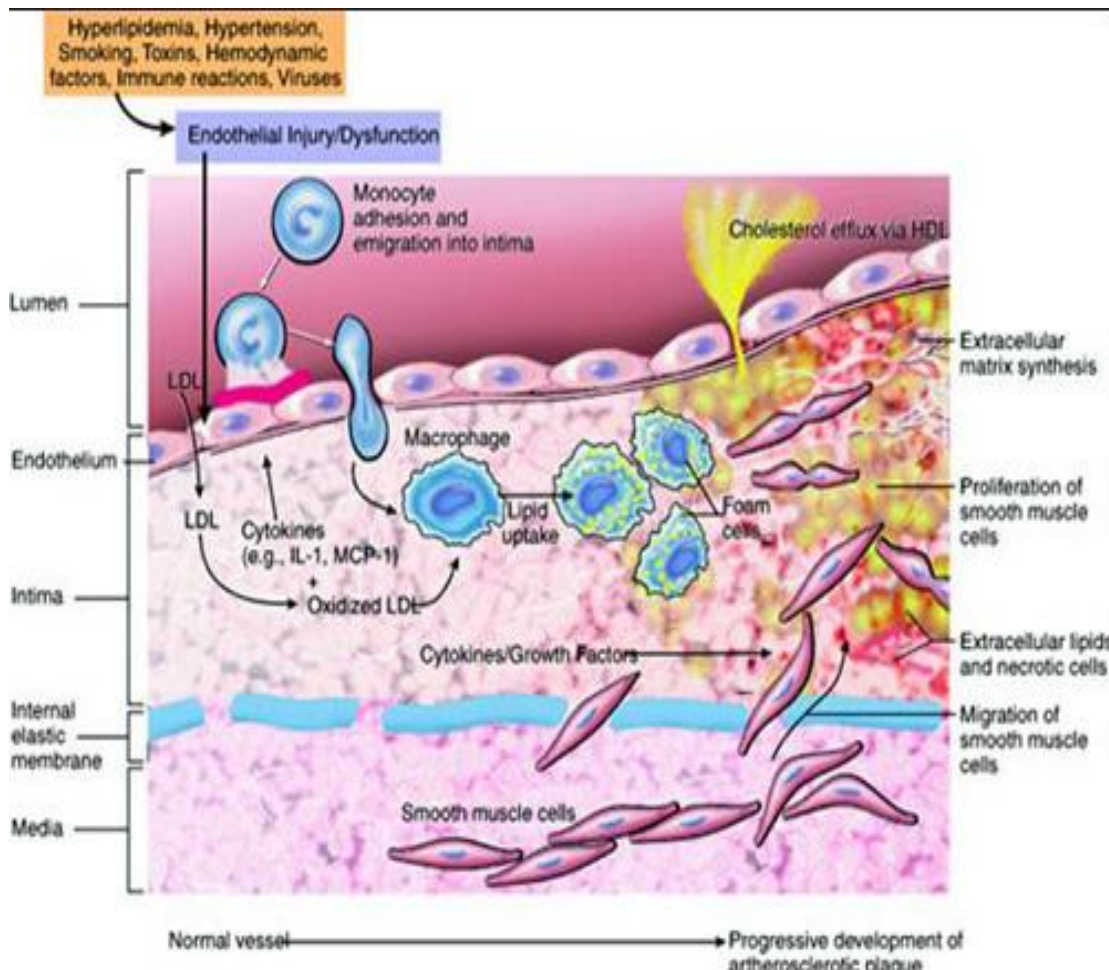


Figura 1 – Resposta imune à oxidação do colesterol LDL. Adaptado de Kumar et al. (2004)

### 3.5 FATORES TROMBOEMBÓLICOS E HEMOSTASIA

A hipercolesterolemia, oxLDL e proteínas de fase aguda como a CRP, são fatores predisponentes à adesão, ativação e agregação plaquetária (Tousoulis et al., 2003, 2006). Após a ruptura da placa aterosclerótica, as plaquetas aderem aos tecidos conectivos subendoteliais expostos. As microfibrilas subendoteliais ligam-se ao fator von Willebrand (vWF), o qual se liga ao complexo Ib da membrana da plaqueta. As plaquetas movimentam-se ao longo da superfície dos vasos até que a GPIa/IIa reage com o colágeno, fazendo com que ocorra a adesão plaquetária (Simoons, 2001). Após

a adesão, as plaquetas, formam pseudópodes, aumentando a interação entre as plaquetas adjacentes. A ativação é realizada pela glicoproteína IIb/IIIa (integrina  $\alpha_{IIb}/\beta_3$ ), que liga o fibrinogênio para produzir a agregação plaquetária. O complexo do receptor IIb/IIIa, também é um sítio secundário de ligação com o vWF, promovendo maior adesão (Li et al., 2006). A exposição ao colágeno e a ação da trombina, resultam na secreção do conteúdo dos grânulos das plaquetas, incluindo ADP, serotonina, fibrinogênio, enzimas lisossômicas,  $\beta$ -tromboglobulina e fator de neutralização de heparina (fator plaquetário 4). As plaquetas também sintetizam prostaglandinas e tromboxano  $A_2$ . O tromboxano potencializa a reação de agregação e tem intensa atividade vasoconstritora (Freedman, 2005)

A liberação do ADP, ATP e do tromboxano  $A_2$ , causa agregação adicional de plaquetas no local da lesão vascular. O ADP provoca engurgitamento das plaquetas e estimula a adesão entre as membranas das plaquetas adjacentes, ocorrendo ainda mais liberação de ADP e tromboxano  $A_2$ . Esta retroalimentação positiva resulta na formação de massa de plaquetas suficientemente grande para ocluir a região da lesão vascular (Leon et al., 2004). Depois da agregação das plaquetas, o fosfolípido exposto na membrana (fator plaquetário 3), fica disponível para as duas reações da cascata de coagulação. A primeira envolve os fatores IXa, VIIIa e X na formação do fator Xa. A segunda resulta na formação de trombina a partir da interação dos fatores Xa, Va e protrombina (fator II). Deste modo ocorre a coagulação sanguínea proporcionando a formação do coágulo intravascular, favorecendo a vasoconstrição, aumento da capacidade pró-coagulante do endotélio, estimulando a inflamação local (Gailani et al., 2001), (Fig.2).

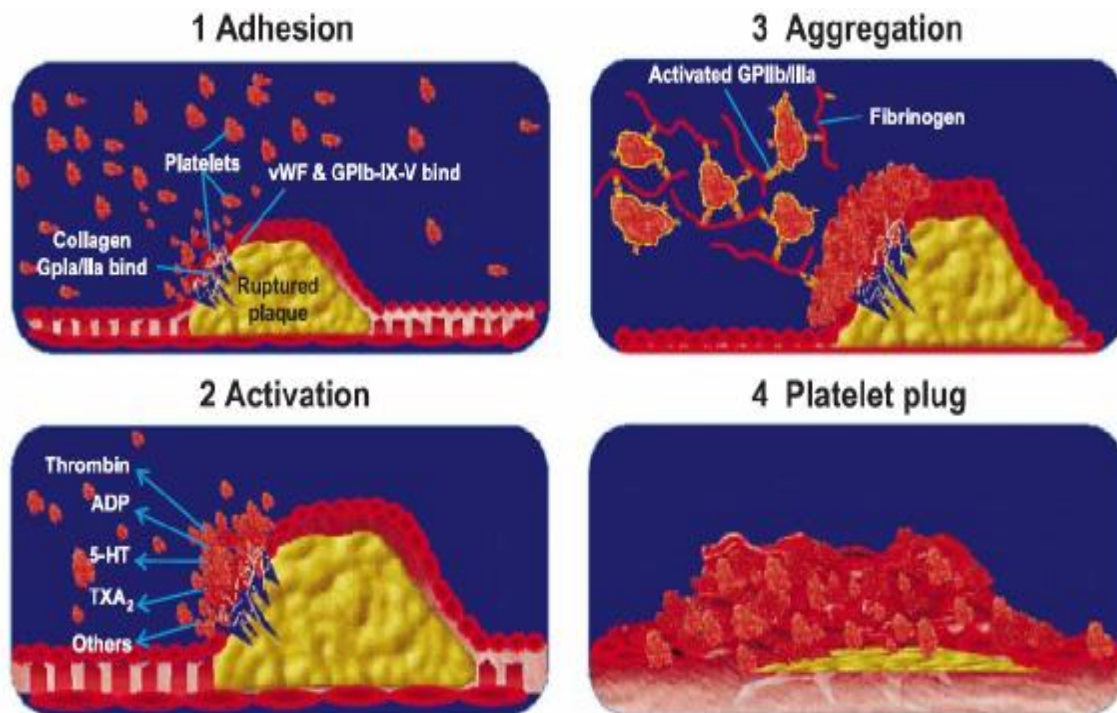


Figura 2 – Adesão, ativação, agregação e formação do trombo plaquetário. Adaptado de Brass (2001)

Esta hiperatividade no endotélio faz com que as células endoteliais injuriadas expressem na sua superfície a nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase, CD39), uma ecto enzima com atividade ATPase e ADPase (Kansas et al., 1991; Kaczmarek et al., 1996; Gayle et al., 1998; Marcus et al., 1991, 1997; Di Virgilio et al., 2001; Robson et al., 2006). A NTPDase hidrolisa o ATP e ADP, liberado pelas plaquetas ativadas. A remoção do ATP e ADP inibem o recrutamento de plaquetas, fazendo com que as mesmas retornem ao seu estado inativado. No processo de hidrólise do ATP, ADP e AMP, a adenosina é liberada. A adenosina inibe a agregação plaquetária, expressão do fator tecidual ou moléculas de adesão. Inibe também a liberação de citocinas pelas células endoteliais ativadas (Kawashina et al., 2000; Armstrong et al., 2006 b). Em função de sua atividade, torna-se um agente protetor dos vasos e artérias, protegendo os mesmos da instalação da placa arterosclerótica (Marcus & Safier, 1993; Kaneider et al., 2002; Spronk et al., 2004).

### **3.6 ENZIMA ECTONUCLEOSÍDIO TRIFOSFATO DIHIDROFOSFOIDROLASE (NTPDase, ATP difosfoidrolase, Apirase, Ecto/CD39, E.C. 3.6.1.5)**

Os nucleotídeos de adenina extracelulares são hidrolisados por enzimas conhecidas como ecto-nucleotidases. Dentre estas, destacam-se a NTPDase (apirase, CD39, ATP difosfoidrolase) e a 5'-nucleotidase (CD73, E.C.3.1.3.5), duas enzimas capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como ATP, ADP e AMP aos seus receptores específicos (Zimmermann, 2001).

E-NTPDases (Ecto – nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase) é o termo genérico para designar uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (Papanikolaou et al., 2005). Esta enzima hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Chan et al., 1986; Ziganshin et al., 1994). O AMP é subseqüentemente convertido para adenosina pela 5'- nucleotidase, com a liberação de fosfatos inorgânicos (Robson et al., 2006).

As NTPDases são enzimas amplamente distribuídas na natureza, tendo sido bem caracterizadas em plantas, parasitas, insetos e em vários tecidos e células de mamíferos, como por exemplo em córtex cerebral, linfócitos, células endoteliais e plaquetas (Battastini et al., 1991; Sarkis et al., 1995; Pilla et al., 1996; Wang & Guidotti, 1998; Leal et al., 2005).

#### **3.6.1 Família NTPDase**

A família das NTPDases são sintetizadas pelos genes ENTPD. Quatro das NTPDases, estão localizadas na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular (NTPDase1, 2, 3, 8). As NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular e NTPDase 4 e 7 são enzimas intracelulares cujos centros ativos estão direcionadas para o lúmen das organelas citoplasmáticas (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006), (Fig. 3). A NTPDase 1 é a principal ectonucleotidase presente na rede



vascular, podendo também estar presente a NTPDase 2 (Enjoji et al., 1999, Robson et al., 2006).

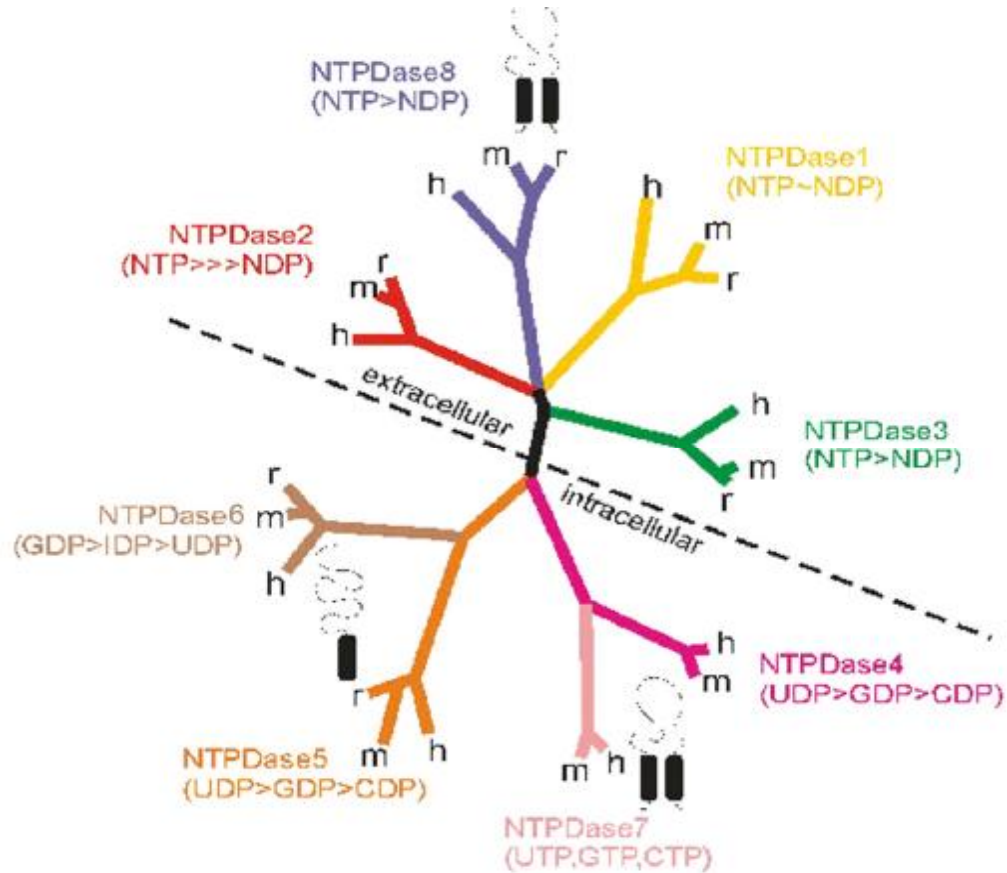


Figura 3 - Estrutura das enzimas da família NTPDase. Adaptado de Robson et al. (2006).

### 3.6.2 Estrutura enzimática e propriedades catalíticas da NTPDase

A análise das seqüências de todas as NTPDases mostra a existência de cinco regiões conservadas as quais foram chamadas de “apyrase conserved regions” ACR (ACR I – ACR V) e estão envolvidos na formação do sítio catalítico da enzima, para que ocorra a hidrólise dos nucleotídeos tri e di fosfato (Schulte et al., 1999; Zimmerman, 2001; Sévigny et al., 2002; Robson et al., 2006).

As regiões ACR I e ACR IV são similares aos domínios de ligação de fosfato  $\beta$  e  $\gamma$  da actina-hsp 70 hexoquinase. Uma mutação em um resíduo de ácido aspártico da região conservada ACR I e ACR IV reduz a atividade hidrolítica da NTPDase em mais de 90% (Flaherty et al., 1991; Smith & Kirley, 1999). As NTPDases são proteínas oligoméricas, cujos domínios transmembrana são responsáveis pela formação de tetrâmeros. Apresentam dois domínios transmembrana (domínio I e domínio II), de tamanhos similares, com segmentos NH<sub>2</sub> e COOH terminais citoplasmáticos e um grande domínio extracelular com a atividade enzimática formando uma grande fenda que compõe o sítio catalítico (Vorhoff et al., 2005). As NTPDases 1,2,3 e 8 estão firmemente ancoradas na membrana através dos domínios transmembranas, os quais interagem entre seus monômeros (Grinthal & Guidotti, 2002). Estes domínios podem movimentar-se durante o processo de ligação da enzima com o nucleotídeo e durante sua hidrólise (Bork et al., 1992).

Os subtipos da NTPDase, diferem quanto a sua localização e função. As formas NTPDase 1,2,3,8, são diferenciadas de acordo com a preferência pelo substrato sendo dependentes de íons cálcio ou magnésio, para realizarem sua atividade máxima (Zimmermann, 2001). A NTPDase 1, hidrolise tanto de ATP como de ADP na mesma proporção, NTPDase 3 e 8, preferem mais o ATP do que o ADP como substrato, mas a NTPDase 2 apresenta uma alta preferência pelo ATP, sendo classificada como uma ecto-ATPase (Kukulski et al., 2005; Robson et al., 2006).

### **3.6.3 Papel fisiológico da NTPDase**

Os nucleotídeos modulam várias funções teciduais, como o fluxo sangüíneo, secreções, inflamação e reações imunes. Influem nos processos que afetam o metabolismo celular, na adesão, ativação e migração celular (Luthje, 1989; Neary & Abbracchio, 2001). A sinalização purinérgica exerce um profundo impacto na proliferação, diferenciação e apoptose celular, pois influenciam na secreção de fatores de crescimento celular, citocinas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão e na síntese de ácido nítrico (Erlinge, 1998; Hou et al., 2002). No sistema vascular a

sinalização purinérgica está associada com o controle do tônus vascular pela liberação de ATP dos nervos e das células vasculares. A migração, proliferação e apoptose das células vasculares constituem um importante papel no desenvolvimento das doenças arteriais como a arterosclerose (Schachter, 1990). A NTPDase1 sendo uma enzima que hidrolisa nucleotídeos desempenha um importante papel na trombo-regulação e controle dos processos inflamatórios nos pacientes que apresentam hipercolesterolemia (Papanikolaou et al., 2005). Estas enzimas inibem a agregação plaquetária, regulam a liberação de fatores mitogênicos das SMC e fatores de crescimento plaquetário e a secreção de citocinas inflamatórias ao hidrolizar os nucleotídeos na membrana vascular (Marcus et al., 2003; Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2004; Robson et al., 2006), (Fig. 4).

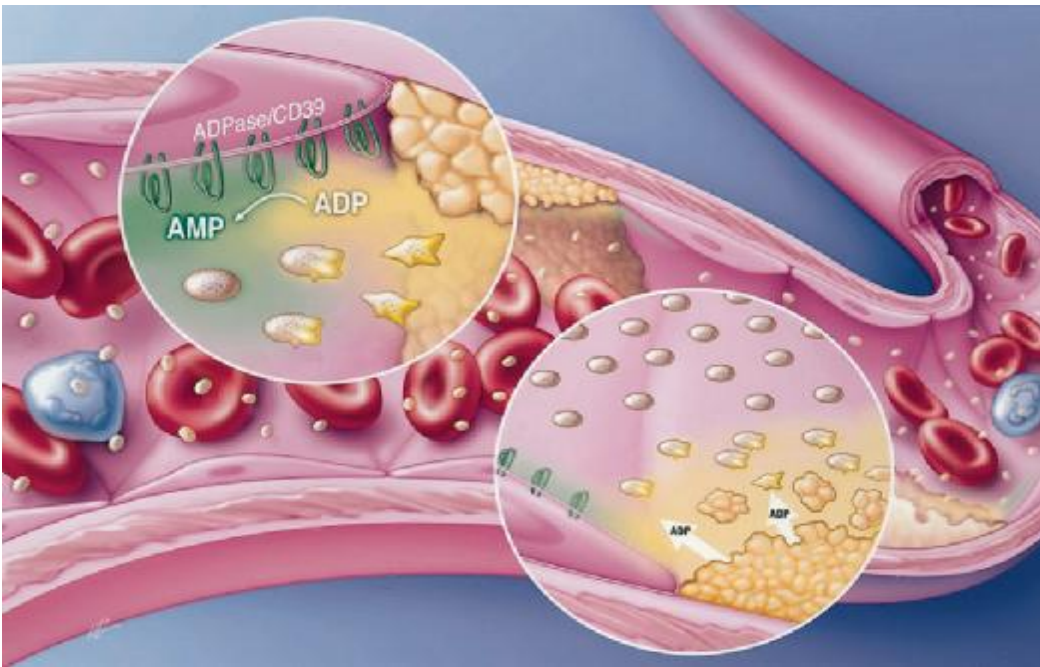


Figura 4 – Papel fisiológico da NTPDase no endotélio vascular. Adaptado de Marcus et al. (1997).



### 3.6.4 Receptores purinérgicos

Os nucleosídeos e nucleotídeos exercem um papel de moléculas sinalizadoras extracelulares em vários tecidos, através dos receptores purinérgicos (Burnstock & Knight, 2004). Os receptores que ligam nucleotídeos e nucleosídeos são divididos em receptores de adenosina ou P1 (subdivididos em A1, A2A, A2B e A3); em receptores P2, que são subdivididos em dois grandes grupos, os receptores ionotrópicos P2X (P2X1-7); e os 6 receptores metabotrópicos P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11). Os receptores P2X ligam preferencialmente ATP e/ou UTP e P2Y podem ser ativados por ATP, ADP, UTP, UDP, ITP e nucleotídeos glicosados (Burnstock, 2002; Robson et al., 2006). A adenosina inibe a proliferação das células musculares lisas, a síntese de colágeno e a agregação plaquetária, especialmente pelos receptores, A2B e P2Y diminuindo a oclusão vascular (Crowley et al., 1994; Dubey et al., 1999).

### 3. MANUSCRITO

#### **Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes**

Marta Medeiros Frescura Duarte\*, Vânia Lúcia Loro\*\*, João Batista Teixeira da Rocha\*\*, Andreza Fabro de Bem\*, Aracéli Dorneles\*\*, Vera Maria Morsch\*\*, Maria Rosa Chitolina Schetinger\*\*§

*<sup>a</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas.*

*<sup>b</sup>Students of the Toxicologic Biochemistry Post Graduation Program from Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

**Running title:** Cholesterol and NTPDases activities

§Corresponding author:

Maria Rosa Chitolina Schetinger

Fax: + 55-5532-208031

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

E-mail: [mariaschetinger@gmail.com](mailto:mariaschetinger@gmail.com)

## Abstract

The activity of NTPDase (EC 3.6.1.5, apyrase, CD39) was verified in platelets from patients with increasing cholesterol levels. A possible association between cholesterol levels and inflammatory markers, such as oxidized low density lipoprotein (oxLDL), highly sensitive C-reactive protein (hsCRP) and oxLDL autoantibodies was also investigated. Lipid peroxidation was estimated by the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum. The following groups were studied: group I (< 150 mg/dl), group II (151 to 200 mg/dl); group III: (201 to 250 mg/dl); group IV (> 251 mg/dl) of cholesterol. Results demonstrated that both ATP and ADP hydrolysis were enhanced as a function of cholesterol levels. LDL levels increased concomitantly with total cholesterol levels. Triglyceride levels were increased in the groups with total cholesterol above 251 mg/dl. oxLDL levels were elevated in groups II, III and IV. hsCRP was elevated in the group with cholesterol higher than 251 mg/dl. oxLDL autoantibodies were elevated in groups III and IV. TBARS content was enhanced as a function of cholesterol levels. In summary, hypercholesterolemia is associated with an enhanced of inflammatory response, oxidative stress and ATP and ADP hydrolysis. The increase in CD39 activity is possibly related to a compensatory response to the inflammatory and pro-oxidative state associated with hypercholesterolemia.

Key words: NTPDase, CD39, Cholesterol hsCRP, oxLDL, oxLDL Autoantibodies

Abbreviations: oxLDL: oxidized low density lipoprotein; hsCRP: highly sensitive C-reactive protein; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; LDL: Low-density lipoprotein; TNF: tumor necrosis factor; E-selectin: endothelial selectin.

## Introduction

Hypercholesterolemia is widely accepted as one of the major risk factors for the development of ischemic heart disease, angina, and myocardial infarction. Although the risks imposed by hypercholesterolemia seem to be manifold, most attention has been devoted to its role in atherosclerosis [1]. Atherosclerosis is an inflammatory disease that is associated with endothelial cell activation, oxidative stress, and the accumulation of leukocytes in the walls of arteries [2-5]. The inflammatory process induced by hypercholesterolemia is not limited to large arteries. Endothelial cell adhesion molecule expression, enhanced oxidant production, and leukocyte– endothelial cell adhesion have been demonstrated in postcapillary venules of different tissues of hypercholesterolemic animals [6- 8]. An atherosclerotic lesion is a process that involves multiple cell types and a variety of cytokines, T lymphocytes and macrophages have been implicated in the lesion formation induced by hypercholesterolemia in humans and mice [9-11].

Low-density lipoprotein (LDL), is a major carrier of cholesterol in the circulation, and can play an important role in atherogenesis if it undergoes oxidative modification by endothelial cells, vascular smooth muscle, or macrophages within the arterial wall [12]. Several studies support the concept that oxLDL may be a key antigen in atherosclerosis. oxLDL is taken up by specific scavenger receptors in macrophages, which develop into s. Anti-oxLDL are present in the atherosclerotic lesions and plasma [13-14]. oxLDL as well as oxLDL autoantibodies have been found in several studies in atherosclerotic lesions in both human and rabbit plasma [3,6,13]. A further role of oxLDL in atherosclerosis could be to initiate and affect inflammatory mediators such as hsCRP, interleukin (IL)-6, and the tumor necrosis factor (TNF). A positive correlation between hsCRP and oxLDL in humans has been suggested [13,15-16]. The hsCRP enhances the binding of oxLDL to monocytic/macrophage-like cells through Fc $\gamma$  receptors [17] and also hsCRP has been found to have predictive power for future myocardial infarction and stroke in middle-aged men and women without clinical cardiovascular diseases [18-19].

Platelets also accumulate within atherosclerotic lesions and can recruit additional platelets to form a thrombus, indicating that the arterial wall can assume both an inflammatory and prothrombogenic phenotype when blood cholesterol levels are elevated [20-21]. Platelets are one of the most important blood components that participate in and regulate thrombus formation by releasing active substances, such as ADP [20-22]. Micromolar concentrations of ADP are sufficient to induce human platelet aggregation, and in the coagulation cascade, ATP is hydrolyzed to adenosine, which has an important function in the regulation of platelet aggregation [23-26]. Furthermore, the roles of nucleotides and nucleosides as extracellular signaling molecules have been well established. Extracellular nucleotides have become recognized for the significant role that they play in modulating a variety of processes related to vascular inflammation and thrombosis [27]. In this vein, recent data from our laboratory have indicated changes in nucleotide hydrolysis by platelets from patients carrying diseases generally associated with changes in coagulation/homeostasis [25, 26, 28]. More recently, there is growing interest in the long-term effects of extracellular nucleotides and nucleosides on cell growth, proliferation and death [29, 30].

NTPDase (EC 3.6.1.5, CD39, ecto-apyrase, ATP diphosphohydrolase) is a glycosylated membrane bound enzyme that hydrolyzes ATP and ADP to adenosine monophosphate (AMP), which is subsequently converted to adenosine by 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73). NTPDases are located in various tissues including the platelet membrane [24-31]. NTPDase and CD73 play an important role in the regulation of blood flow and thrombogenesis by regulating ADP catabolism [24, 32]. Another aspect that must be emphasized here is the fact that CD39 rapidly metabolizes ADP released from platelet activation, and this event is very important, considering that ADP is the final pathway for platelet recruitment and thrombus formation [33]. In fact, CD39 has been recognized to play an important role in thromboregulation through the inhibition of platelet aggregation by hydrolyzing ADP. In a recent study, Papanikolaou et al. [34] showed that the depletion or the sequestration of membrane cholesterol results in a strong inhibition of CD39 and that this was reversed by the replenishment with pure cholesterol.

Thus, one question that could be made is could the different cholesterol levels observed in human blood affect CD39 activity? This study was performed in an attempt to answer this question. The activity of CD39 was measured on platelets of human donors with cholesterol levels ranging from less than 150 to higher than 251 mg/dL. Furthermore, we studied whether cholesterol levels induce inflammatory marker production, for example, hsCRP, and induce lipid peroxidation.

## **Materials and methods**

### *Chemicals*

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

### *Patients*

The sample consisted of patients with different cholesterol levels and ages ranging from 40 to 70 years, from LABIMED Santa Maria - RS. We chose non-smoking patients not undergoing hypo-lipemic or anti-inflammatory treatment, with glucose levels ranging from 70-95 mg/dl. The sample was divided into four groups constituted by female (50%) and male (50%), as follows.

Group 1: Cholesterol levels < 150 mg/dl (n=40); Group 2: Cholesterol levels ranging from 151 to 200 mg/dl (n= 40); Group 3: Cholesterol levels ranging from 201 to 250 mg/dl (n= 40); Group 4: Cholesterol levels > 251 mg/dl (n= 40). 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, Federal University of Santa Maria (Protocol number: 015/2004). Eight milliliters of blood were obtained from each participant and used for biochemical and hematological determinations and platelet-rich plasma preparations.

### *Biochemical determinations:*

Serum total cholesterol and triglycerides concentrations were measured using standard enzymatic methods with the use of Ortho-Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson

reagents, with a fully automated analyzer (Vitros 950<sup>®</sup>- dry chemistry, Rochester, New York). High-density lipoprotein cholesterol was measured in the supernatant plasma after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride according to [45]. Low-density lipoprotein cholesterol was estimated by the Friedewald equation [46]. hsCRP was measured by the methods of immunoluminometry (IMMULITE<sup>®</sup> 2000 – Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). oxLDL was determined by a capture ELISA according to manufacturer's instructions (Mercodia AB) as described by [47]. oxLDL autoantibodies were determined using ELISA as described by [48].

#### *Platelet-rich plasma (PRP) preparation*

Platelet-rich plasma was prepared from human donors by the methods of Pilla et al. [31] and Lunkes et al. [25]. Briefly, blood was collected into 0.129 M citrate and centrifuged at 160 x *g* for 10 min. The platelet-rich plasma was centrifuged at 1400 x *g* for 15 min and washed twice with 3.5 mM HEPES isosmolar buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl, and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES buffer and protein was adjusted to 0.3–0.5 mg/ml, where 6–10 µg of protein was used per tube to ensure linearity in the enzyme assay. NTPDase is an ecto-enzyme and thus platelet viability and integrity were confirmed by the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity using the enzymatic Vitros 950<sup>®</sup> (Ortho-Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson, Rochester, New York).

#### *NTPDase activity*

Twenty microliters of the PRP preparation (10–15 µg protein) were added to the reaction mixture of NTPDase and preincubated for 10 min at 37°C, to a final volume of 200 µL. NTPDase activity was determined by the method of [31], in a reaction medium containing 5.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 6 mM glucose, and 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1.0 mM. The reaction was stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The inorganic phosphate (Pi) released by ATP and ADP hydrolysis was measured by the method of

[49] using  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as standard. Controls were prepared to correct for nonenzymatic hydrolysis by adding PRP after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme activities are reported as nmol Pi released/min/mg protein.

#### *Hematological determinations*

Quantitative determinations of platelets obtained by venipuncture were performed using an analyzer Pentra 120<sup>®</sup> (ABX, Montpellier, France). Platelet aggregation was performed by the technique of [50] consisting of the in vitro macroscopic visualization of aggregates at intervals of 15 to 50 s by the addition of ADP to platelet-rich preparation (PRP).

#### *Determination of lipid peroxidation*

The lipid peroxidation was estimated by the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum samples by modifications of the method of Jentzsch et al. [51]. In short, 0.2 mL of serum was added to the reaction mixture containing 1 mL of 1% orto-phosphoric acid, 0.25 mL alkaline solution of thiobarbituric acid -TBA (final volume 2.0 mL) followed by 45 min heating at 95°C. After cooling, samples and standards of malondialdehyde were read at 532 nm against the blank of the standard curve. The results were expressed as nmol MDA/mL.

#### *Protein determination*

Protein was determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard [52].

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Duncan test. Differences between groups were considered to be significant when  $P < 0.05$ . Linear correlation between variables was also carried out.



## Results

Glucose levels were in the normal range in all the groups studied. The patients presented values ranging from 88-98 mg/dl. No significant differences were observed in the HDL cholesterol levels among the groups. On the other hand, LDL levels were increased concomitantly with the increase in total cholesterol levels. A significant difference was observed in groups with total cholesterol higher than 201 mg/dl. Triglyceride levels were increased in the groups with total cholesterol above 251 mg/dl (Table 1).

oxLDL was elevated in groups II, III and IV (Table 2). hsCRP was elevated in the fourth group (cholesterol higher than 251 mg/dl). oxLDL autoantibodies were elevated in groups III and IV (Table 2). The lipid peroxidation estimated by TBARS levels in patients with hypercholesterolemia is shown in figure 3A statistically significant relationship was found between the cholesterol levels and TBARS production. The data showed a positive correlation between hypercholesterolemia and TBARS indicating an oxidative stress in the patients.

ATP hydrolysis was modified by cholesterol levels above 151 mg/L and post-hoc comparisons by Duncan's test revealed that ATP hydrolysis was significantly higher in patients from groups II, III and IV. Furthermore, these groups were significantly different from each other (Figure 1A). Similar results were observed in the ADP hydrolysis. *Post-hoc* comparisons by Duncan's multiple range test revealed that patients from groups II, III and IV presented higher ADP hydrolysis, as none of the groups were similar to the others (Figure 1B). Correlation analysis indicated a positive correlation between increasing cholesterol levels and platelet ATP and ADP hydrolysis (Figure 2A and 2B).

Analyzing ATP and ADP hydrolysis and inflammatory markers there was a statistically significant correlation between the ATP and ADP hydrolysis and oxLDL ( $r=0.82$ ,  $P<0.01$ ;  $r=0.91$ ,  $P<0.001$ ), hsCRP ( $r=0.82$ ,  $P<0.01$ ,  $r=0.91$ ,  $P<0.001$ ), and oxLDL autoantibodies ( $r=0.85$ ,  $P<0.01$ ,  $r=0.96$ ,  $P<0.001$ ), respectively. The ATP and ADP hydrolysis also were correlated with tryglyceryde levels ( $r=0.819$ ,  $P<0.001$ ,  $r=0.92$ ,  $P<0.001$ ).

## Discussion

The present study clearly indicated that cholesterol levels are associated with increased oxLDL, anti-oxLDL formation and inflammatory markers. oxLDL plays a major role in atherosclerosis development. The accumulation of oxLDL in the vessel wall stimulates the overlying endothelial cells to produce a number of pro-inflammatory molecules, such as the intercellular and vascular adhesion molecule-1 and endothelial selectin (E-selectin). These components contribute to the recruitment of platelets and leukocytes and determine atherogenic properties *in vivo* [12, 35]. oxLDL also stimulates the production of auto-antibodies by B cells. oxLDL auto-antibodies are present in healthy individuals, as well as in patients with atherosclerosis and cardiovascular disease [36,37]. The results of this study reveal that patients with high cholesterol may have a predisposition to atheroma plaque development, which corroborates with Lehtimäki et al. [38], who found that oxLDL autoantibodies were significantly higher in subjects with hypercholesterolemia. The results of the present study also show a positive correlation between cholesterol levels and oxLDL and hsCRP production, which is in accordance with literature data [12]. In several studies, hsCRP has been shown to be an additional marker used for prognostic information at all levels of LDL and at all levels of risk factors as determined by the Framingham Risk Score [19]. Our study confirmed the hypothesis that increased levels of cholesterol may be associated with hsCRP and oxLDL autoantibodies, which are good indicators of increased risk for atherosclerosis development. In the inflamed vasculature, hsCRP may directly affect the expression of adhesion molecules and alter endothelial dysfunction, which may induce platelet aggregation and activation. These processes may cause leukocyte damage, which in turn could cause the release of their granule content [19, 39-41].

The present results show that nucleotide hydrolysis was enhanced in platelets of patients with hypercholesterolemia. Probably, high cholesterol levels increase platelet ATP and ADP hydrolysis as a compensatory mechanism to inhibit platelet aggregation and limit thrombus formation in patients with a pre-disposition to atheroma development. In fact, our laboratory, in a previous study, demonstrated that diabetic, hypertensive and diabetic/hypertensive patients presented elevated nucleotide hydrolysis by platelets [25,

28]. Taken together, we can suppose that these co-associated pathological conditions may change platelet nucleotide hydrolysis. Platelets are one of the components of the thrombus microenvironment and of the process of thromboregulation. It is known that platelet nucleotide hydrolysis is not the highest in the circulation, mainly when compared to endothelium. However, considering the function and the mobility of platelets we can understand their active role in this process and the importance of such hydrolysis. Literature data indicate that adenine nucleotides and adenosine could be two of several regulatory factors in the development of atherosclerosis [29]. Recently, it was shown that induced upregulation of CD39/NTPDase1 has beneficial effects on the platelet and on endothelial cell activation, and this may be observed in the case of vascular inflammation [30]. Of importance, Papanikolaou et al. [34] showed that the modulation of cholesterol levels by drugs that either delete or sequester membrane cholesterol results in a strong inhibition of enzymatic and anti-platelet activity of CD39. We agree with this statement and also showed that cholesterol levels present in the circulation enhance platelets CD39 activity. In fact, we observed a positive correlation between ATP and ADP hydrolysis and cholesterol levels (Figure 2A and B). Papanikolaou et al. [34] suggested that cholesterol may affect the ability of this enzyme to undergo conformational changes required for nucleotide hydrolysis. Probably, it enhances the interaction between the enzyme and the substrates.

In the literature there are some works showing that the levels of cholesterol or its oxidation status can affect ATPase activities [42,43]. However, a direct role of plasmatic cholesterol levels on platelet ecto-CD39 has never been established. Lijnen et al. [44] suggest that cholesterol lowering in hypercholesterolemic patients may result in a significant decrease in erythrocyte and platelet membrane cholesterol content. Perhaps, in our study the same is occurring. When the cholesterol level is enhanced, the platelet membrane cholesterol content is enhanced, increasing the conformational stability of the transmembrane CD39 protein, promoting activation.

Taking into account the importance of cholesterol, in its physiological (lipidic bilayer component) or pathological (factor related with atherogenesis) functions, as well as the importance of the platelets and the importance of CD39, we suggested with this

study to what degree platelets can modulate their activities *in vivo* when exposed to different cholesterol levels.

In conclusion, our study demonstrated that the hydrolysis of adenine nucleotides is modified in platelets from hypercholesterolemia patients, and we can suggest that it is beneficial by preventing thrombus formation. Furthermore, this activation was associated with oxLDL, oxLDL autoantibodies and hsCRP levels observed in these patients.

## References

- 1 Tailor A & Granger DN (2003) Hypercholesterolemia Promotes P-Selectin-Dependent Platelet-Endothelial Cell Adhesion in Postcapillary Venules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; **23**, 675-680.
- 2 Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809.
- 3 Hansson GK, Seifert PS, Olsson G & Bondjers G (1991) Immunohistochemical detection of macrophages and T lymphocytes in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler. Thromb.* **11**, 745-750.
- 4 Liyama K, Hajra L, Liyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD & Cybulsky MI (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ. Res.* **85**, 199-207.
- 5 Libby P (2000) Changing concepts of atherogenesis. *J. Int. Med.* **247**, 349-358.
- 6 Scalia R, Appel JZ, 3<sup>rd</sup> & Lefer AM (1998) Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 093-1100.
- 7 Stokes KY, Clanton EC, Russell JM, Ross CR & Granger DN (2001) NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial cell adhesion. *Circ. Res.* **88**, 499-505.
- 8 Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U & Hansson GK (1999) Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance

- of proinflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines, *Atherosclerosis*; **145**, 33-43.
- 9 Lessner SM, Prado HL, Waller EK & Galis SZ (2002) Atherosclerotic lesions grow through recruitment and proliferation of circulating monocytes in a murine model. *Am. J. Pathol.* **160**, 2145-2155.
- 10 Song L, Leung C & Schindler C (2001) Lymphocytes are important in early atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* **108**, 251-259.
- 11 Zhao Z., Beer MC, Cai L, Asmis R, Beer FC, Villiers WJS & Westhuyzen DRV (2005) Low-Density Lipoprotein From Apolipoprotein E-Deficient Mice Induces Macrophage Lipid Accumulation in a CD36 and Scavenger Receptor Class A-Dependent Manner. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 168-173.
- 12 Hulthe J & Fagerberg B (2002) Circulating Oxidized LDL is Associated With Subclinical Atherosclerosis Development and Inflammatory Cytokines (AIR Study), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 62-167.
- 13 Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler S, Picard S, Steinberg D & Witztum J (1994) Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL, *Arterioscler. Thromb.* **14**, 32- 40.
- 14 Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL & Hansson GK (1995) T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3893-3897.
- 15 Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL & Steinberg D (1989) Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* **84**, 1086-1095.
- 16 Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew, TE, Steinberg D & Witztum JL (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 1372-1376.
- 17 Tits LV, Graaf J, Toenhake H, Heerde WV & Stalenhoef A (2005) C-Reactive Protein and Annexin A5 Bind to Distinct Sites of Negatively Charged Phospholipids Present in Oxidized Low-Density Lipoprotein, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 717-722.

18. Ridker PM & Haughey P (1998) Prospective studies of C-reactive protein as a risk factor for cardiovascular disease, *J. Invest. Med.* **46**, 391-395.
- 19 Ridker PM, Wilson PWF & Grundy SM (2004) Should C-Reactive Protein Be Added to Metabolic Syndrome and to Assessment of Global Cardiovascular Risk? *Circulation* **109**, 2818-2825.
- 20 Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Loren M, Konrad I, Nieswandt B & Gawaz M (2002) A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J. Exp. Med.* **196**, 887-896.
- 21 Wagner DD & Burger PC (2003) Platelets in Inflammation and Thrombosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 2131-2137.
- 22 Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly Jr ES, Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JFH, Price VL, Marcus AJ & Maliszewski CR (2002) Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* **109**, 1031-1040.
- 23 Zimmermann H (1999) Two novel families of ectonucleotidases: molecular structure, catalytic properties and a search for function, *TIPS* **20**, 231-236.
- 24 Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JFH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C & Levi R (2003) Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J. Thromb. Haemost.* **1**, 2497-2509.
- 25 Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch VM, Mazzanti CM & Schetinger MRC (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb. Res.* **109**, 189-194.
- 26 Araújo MC, Rocha JBT, Morsch A, Zanin R, Bauchspiess R, Morsch VM & Schetinger, MRC (2004) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients, *Biochem. Biophysic. Acta* **1740**, 421-426.
- 27 Robson SC, Enyoji K, Goepfert C, Imai M, Lin Y, Sevigny J & Warny M (2001) Modulation of extracellular nucleotide-mediated signaling by CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, *Drug Dev. Res.* **53**, 193-207.

- 28 Lunkes GI, Lunkes D, Morsch VM, Mazzantti CM, Morsch A, Miron VR & Schetinger MRC (2004) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **65**, 1-6.
- 29 Burnstock G (2002) Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death, *Arteriosclerosis and Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 364-373.
- 30 Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K & Robson SC (2006) Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets, *Blood Cells Mol. Dis.* **36**, 217-222.
- 31 Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD & Sarkis JJF (1996) ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets, *Platelets* **7**, 225-230.
- 32 Kawashina Y, Nagasawa T & Ninomiya H (2000) Contribution of ecto-5' nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells, *Blood* **96**, 2157-2162.
- 33 Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Pinsky DJ, Islam N, Gayle III RB & Maliszewski CR (2001) Thromboregulation by Endothelial Cells: Significance for Occlusive Vascular Diseases. *Arteriosclerosis Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 178 -182.
- 34 Papanikolaou A, Papafotika A, Murphy C, Papamarcaki T, Tsolas O, Drab M, Kurzchalia TV, Kasper M & Christoforidis S (2005) Cholesterol-dependent Lipid Assemblies Regulate the Activity of the Ecto-nucleotidase CD39, *J. Biol. Chem.* **280**, 26404-26414.
- 35 Tsimikas S & Witztum JL (2001) Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation* **103**, 1930-1932.
- 36 Shoenfeld Y, Wu R, Dearing LD & Matsuura E (2004) Are Anti-Oxidized Low-Density Lipoprotein Antibodies Pathogenic or Protective? *Circulation* **110**, 2552-2558.
- 37 Gonçalves I, Gronholdt MLM, Söderberg I, Ares MPS, Nordestgaard BG, Bentzon JF, Fredrikson GN & Nilsson J (2005) Humoral Immune Response Against Defined Oxidized Low-Density Lipoprotein Antigens Reflects Structure and Disease Activity of Carotid Plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1250-1255.
- 38 Lehtimäki T, Lehtinen S, Solakivi T, Nikkilä M, Jaakkola O, Jokela H, Ylä-Herttuala S, Luoma JS, Koivula T & Nakkari T (1999) Autoantibodies Against Oxidized Low Density



- Lipoprotein in Patients With Angiographically Verified Coronary Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 23–27.
- 39 Li JJ & Fang CH (2004) C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases. *Med. Hypotheses* **62**, 499-506.
- 40 Kannan S (2002) E-NTPase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation. *Med. Hypotheses* **58**, 527-528.
- 41 Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida Jr, Anderson TJ & Verma S (2003) New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I, *Circulation* **108**, 1917-1923.
- 42 Wood WG, Igbavboa U, Rao AM, Schroeder F & Avdulov NA (1995) Cholesterol oxidation reduces  $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$  - ATPase activity, interdigitation, and increase fluidity of brain synaptic plasma membranes. *Brain Res.* **683**, 36-42.
- 43 Ortega A, Santiago-García J, Mas-Oliva J & Lepock JR (1996) Cholesterol increases the thermal stability of the  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  - ATPase of cardiac microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1283**, 45-50.
- 44 Lijnen P, Echevaria-Vazquez D & Petrov V (1996) Influence of cholesterol-lowering on plasma membrane lipids and function. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **18**, 123-126.
- 45 Bachorik PS & Albers JJ (1986) Methods Enzymol.: Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Pharmacogenetics and Genomics* **129**, 78-100.
- 46 Friedewald WT & Levy RI (1972) Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**, 499-502.
- 47 Holvoet P, Stassen JM, Van Cleemput J, Collen D & Vanhaecke J (1998) Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 100-107.
- 48 Wu R & Lefvert AK (1995) Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein (oxLDL): characterization of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL. *Clin. Exp. Immunol.* **102**, 174-180.
- 49 Chan K, Delfret D & Junges K (1986) A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activity, *Anal. Biochem.* **157**, 375-380.



- 50 Biggs R (1975) in: L. Millan (Ed.), *Coagulación sanguínea, hemostasia y trombosis*, vol. 595, Editorial JIMS, Barcelona, pp. 606-651
- 51 Jentzsch AM, Bachmann H, Furst P & Biesalski H (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med.* **2**, 251-256.
- 52 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 218-254.

Table1. HDL, LDL, triglyceride and glucose (mg/dl) levels of patients with different cholesterol levels<sup>a</sup>.

Blood parameters	Cholesterol groups			
	I (< 150)	II (151-200)	III (201-250)	IV (> 251)
mg/dl				
LDL cholesterol	70.8 ± 13.2	105.5 ± 17.5	134.3 ± 48.3*	209 ± 46*
HDL cholesterol	44.8 ± 10.3	48.8 ± 10.4	57.3 ± 14.8	54 ± 14.8
Triglycerides	88.2 ± 25	121 ± 46	124 ± 54.5	286 ± 33.9*
Glucose	88 ± 15.5	98 ± 27.8	93 ± 27	98 ± 32

<sup>a</sup>Results are expressed as the mean ± SE (n= 40 for each group). \*Indicates significant difference at  $P < 0.05$  between groups.

Table 2. oxLDL (mg/dL), hsCRP (mg/L) and oxLDL autoantibodies (mg/L) in patients with different cholesterol levels<sup>a</sup>.

Parameters	Cholesterol Levels			
	I (< 150)	II (151-200)	III (201-250)	IV (> 251)
oxLDL	0.082 ± 0.21	0.42 ± 0.25*	0.48 ± 0.26*	0.78 ± 0.08*
hsCRP	0.42 ± 0.12	0.46 ± 0.06	0.68 ± 0.16	2.06 ± 0.08*
Anti-oxLDL	6.2 ± 1.5	7.26 ± 2.5	21.1 ± 3.5*	38.66 ± 8.5*

<sup>a</sup>Results are expressed as the mean ± SE (n= 40 for each group). \*Indicates significant difference at  $P < 0.05$  between groups.

## Figure Legends

Figure 1. ATP (A) and ADP (B) hydrolysis of patients with hypercholesterolemia (n=40). Results are expressed as nmol Pi/min/mg of protein. Different letters indicates a significant difference at  $P < 0.05$  between groups.

Figure 2. Correlation analysis between cholesterol levels and ATP (A) ( $r=0.75$ ,  $P < 0.01$ ).  $Y = 2.06 + 0.078x$ , where  $y =$  ATP hydrolysis and  $x =$  cholesterol levels and ADP (B) ( $r=0.85$ ,  $P < 0,01$ ).  $Y = 1.85 + 0,056x$ , where  $Y =$  ADP hydrolysis and  $x =$  cholesterol levels (n=40).

Figure 3. Correlation between cholesterol levels and TBARS (n=40), ( $r=0.74$ ,  $P < 0.01$ ).  $Y = 4.37 + 0.077x$ , where  $y =$  MDA production (nmol/mL) and  $x =$  cholesterol levels.

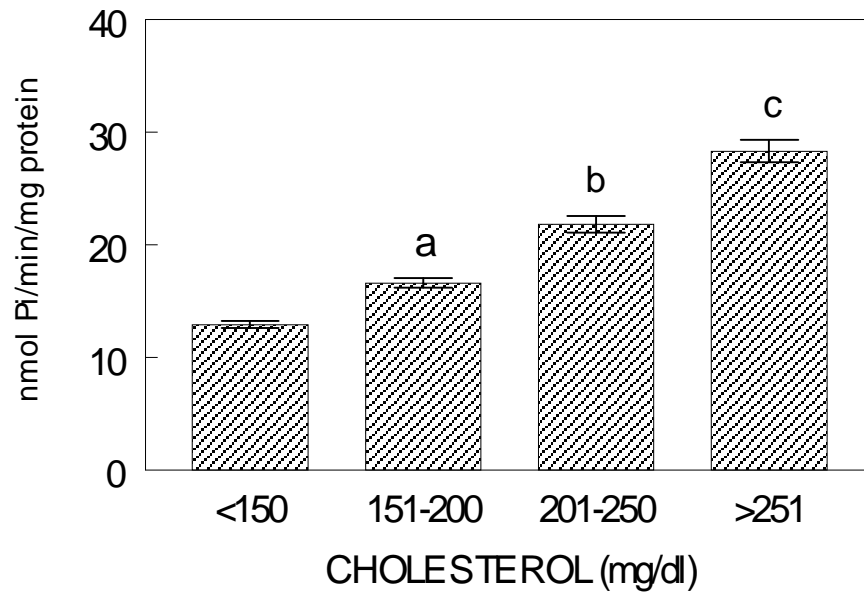


Figura 1A. ATP hydrolysis of patients with hypercholesterolemia (n=40). Results are expressed as nmol Pi/min/mg of protein. Different letters indicates a significant difference at  $P < 0.05$  between groups.

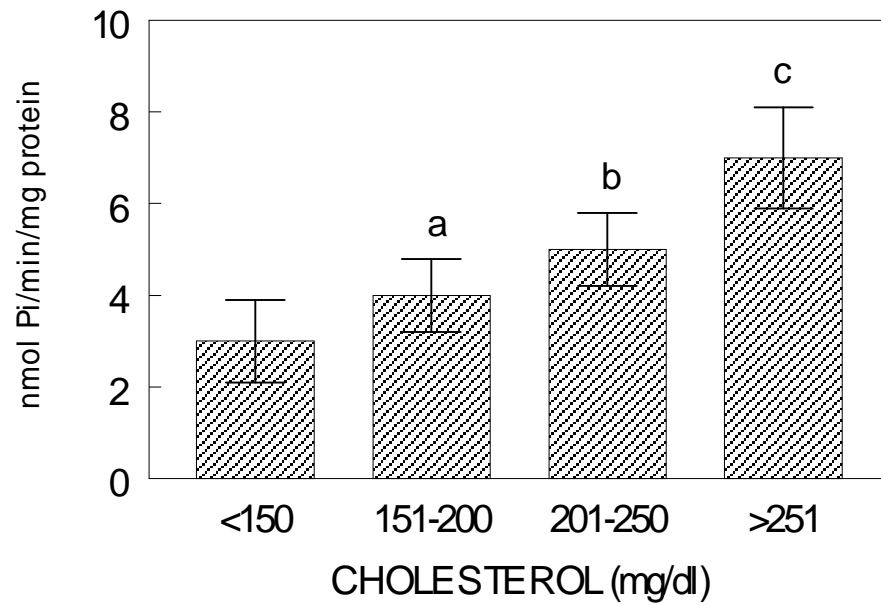


Figura 1B. ADP hydrolysis of patients with hypercholesterolemia (n=40). Results are expressed as nmol Pi/min/mg of protein. Different letters indicates a significant difference at  $P < 0.05$  between groups.

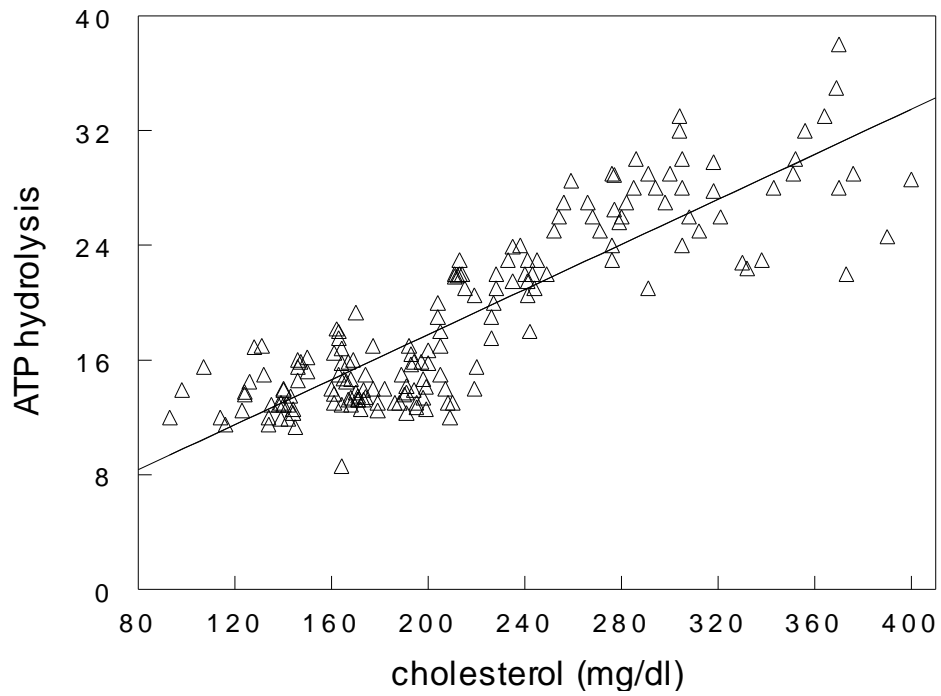


Figura 2 A. Correlation analysis between cholesterol levels and ATP hydrolysis (n=40), (r=0.75, P < 0.01).  $Y = 2.06 + 0.078x$ , where y= ATP hydrolysis and x= cholesterol levels.

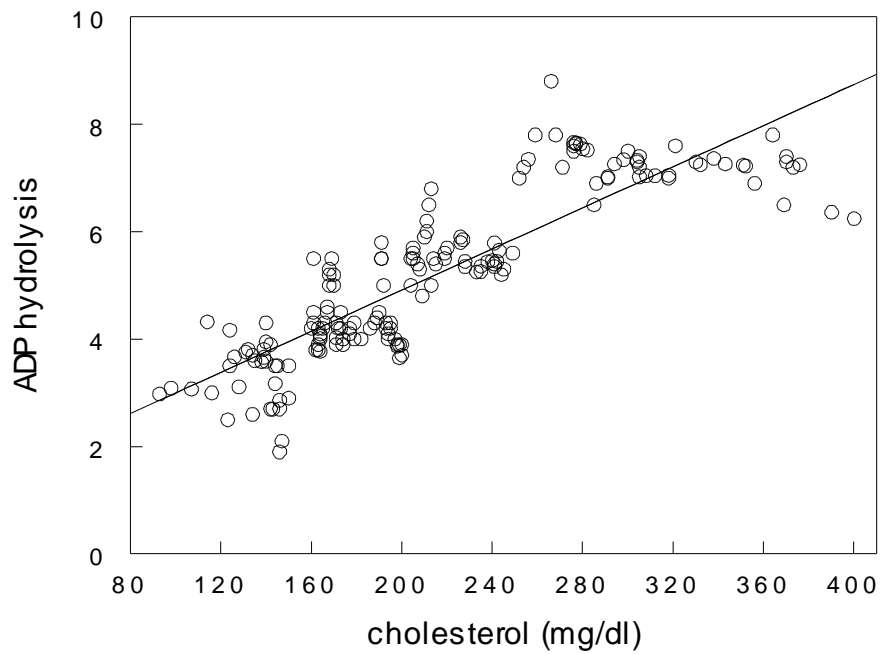


Figura 2B. Correlation analysis between cholesterol levels and ADP hydrolysis (n=40), ( $r=0.75$ ,  $P < 0.01$ ).  $Y = 1.85 + 0,056x$ , where  $y$ = ADP hydrolysis and  $x$ = cholesterol levels.

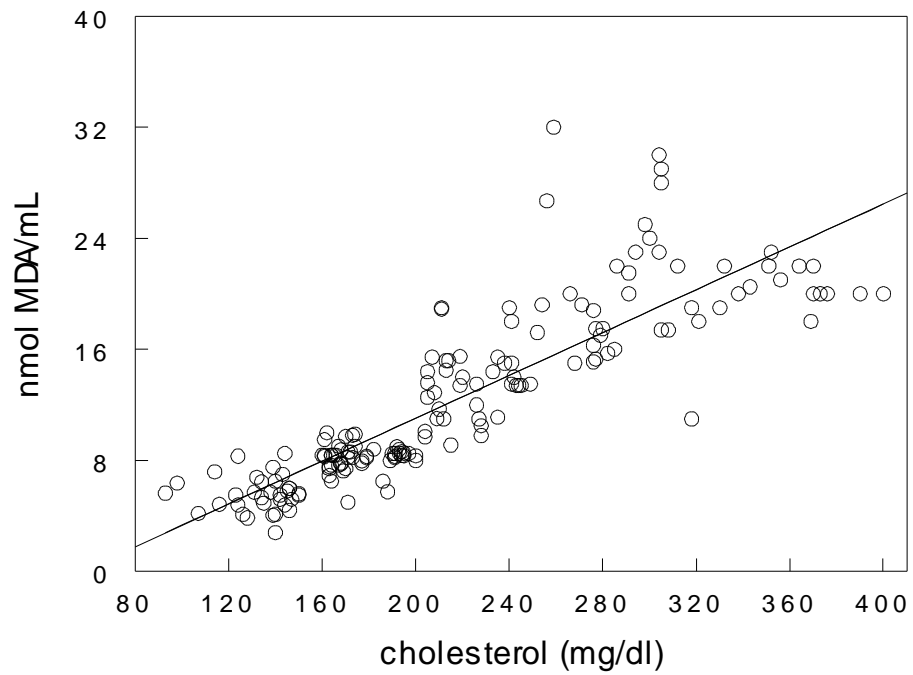


Figura 3. Correlation between cholesterol levels and TBARS (n=40), ( $r=0.74$ ,  $P < 0.01$ ).  
 $Y = 4.37 + 0.077x$ , where  $y$  = MDA production (nmol/mL) and  $x$  = cholesterol levels.



## 5. DISCUSSÃO

A enzima NTPDase vem sendo estudada em muitas condições patológicas (Bonan et al., 2001; Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2004; Leal et al., 2005), no entanto, não foi encontrado na literatura um estudo que relacionasse a atividade desta enzima com a hipercolesterolemia e o processo inflamatório.

Nosso estudo demonstrou que os níveis de colesterol estão associados com o aumento do oxLDL, anti-oxLDL e hsCRP. O oxLDL possui um papel importante no desenvolvimento da arterosclerose (Tsimikas & Witztum 2001; Hulthe & Fagerberg 2002; Armstrong et al., 2006 b). O acúmulo de oxLDL na parede dos vasos estimula as células endoteliais a produzirem moléculas de adesão intracelular e vascular, o recrutamento de leucócitos e plaquetas e a produção de anticorpos pelas células B. (Lehtimäki et al., 1999; Shoenfeld et al., 2004; Angelique et al., 2005).

Os resultados obtidos também mostram uma correlação positiva entre os níveis de colesterol e a produção de oxLDL e hsCRP, o que está de acordo com dados da literatura (Hulthe & Fagerberg 2002; Armstrong et al., 2006 a). Em vários estudos, a hsCRP tem sido colocada como um marcador adicional utilizado para o prognóstico da arterosclerose (Ridker et al., 2004; Napoli et al., 2005). Na vasculatura inflamada, hsCRP pode afetar diretamente a expressão de moléculas de adesão e alterar a função endotelial, induzindo ativação e agregação plaquetária (Szmitko et al., 2003; Li & Fang 2004).

Um outro importante aspecto a ser discutido neste estudo é com relação à hidrólise dos nucleotídeos da adenina, onde resultados mostraram que a hidrólise do ATP e ADP estavam aumentadas em plaquetas de pacientes com níveis de colesterol superior a 150 mg/dL, (Fig. 1A e 1B). Provavelmente, a hidrólise aumentada de ATP e ADP seria um mecanismo compensatório para inibir a agregação plaquetária e limitar a formação de trombos em pacientes com pré-disposição ao desenvolvimento de ateroma (Papanikolaou et al., 2005; Atkinson et al., 2006). Considerando a função e a mobilidade das plaquetas, podemos entender seu papel ativo no processo de trombo-regulação e a importância da hidrólise dos nucleotídeos. Os dados da literatura indicam que os nucleotídeos da adenina e a adenosina podem ter fatores regulatórios

no desenvolvimento da arterosclerose (Burnstock, 2002). Recentemente, foi demonstrado que o aumento da atividade da CD39/NTPDase-1 tem efeitos benéficos na plaqueta e na ativação celular endotelial, e isto pode ser observado nos casos de inflamação vascular (Atkinson, et al., 2006; Robson 2006). Pananikolaou et al. (2005) mostrou que a modulação dos níveis de colesterol por drogas que eliminam ou sequestram colesterol da membrana resulta em uma inibição importante da atividade da CD39 em plaquetas. Este estudo está de acordo com estes achados, uma vez que se observou que níveis aumentados de colesterol na circulação aumentam a atividade da CD39 nas plaquetas. De fato, uma correlação positiva entre a hidrólise de ATP e ADP com os níveis de colesterol (Fig. 2A e 2B). Papanikolaou et al (2005) sugeriram que o colesterol pode aumentar a interação entre a enzima CD39 e seus substratos.

Na literatura, de uma maneira geral, poucos estudos mostram que os níveis de colesterol ou sua oxidação podem afetar a atividade de ATPases (Wood et al., 1995; Ortega et al., 1996). Entretanto, uma relação direta entre os níveis de colesterol plasmático e a atividade da CD39 em plaquetas parece não estar bem estabelecido. Lijnen et al. (1996) observou que ao aumentar os níveis de colesterol em pacientes com hipercolesterolemia, resultou em redução no conteúdo de colesterol nos eritrócitos e nas membranas de plaquetas. Talvez, em nosso estudo este efeito pode ter acontecido. Quando os níveis de colesterol aumentam, aumenta a estabilidade conformacional da proteína transmembrana CD39, promovendo sua ativação.

Considerando a importância do colesterol em seu papel fisiológico (componente da bicamada lipídica das membranas), ou patológico (relacionado com a aterogênese), as quais refletem na importância das plaquetas e da enzima CD39, pode-se propor que as plaquetas podem modular sua atividade *in vivo* quando expostas a diferentes níveis de colesterol.

Finalizando, neste estudo foi demonstrado que a hidrólise de nucleotídeos da adenina é modificada em pacientes com altos níveis de colesterol, oxLDL, anti-oxLDL e hsCRP. Pode-se assim, sugerir que a modulação desta atividade tem um papel fundamental como um sistema preventivo na formação de trombos em pacientes hipercolesterolêmicos.

## 6. CONCLUSÕES

Aumento na atividade da enzima NTPDase foi observado em pacientes com hipercolesterolemia o que indica que uma importante plasticidade na atividade das ectonucleotidases pode ocorrer para diminuir os níveis extracelulares de ATP e ADP e aumentar os níveis de adenosina durante uma possível indução da formação da placa de ateroma.

A hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP se apresentou significativamente aumentada com a elevação dos níveis de triglicerídios e do colesterol LDL.

O aumento dos níveis de colesterol total, apresentaram uma correlação positiva com os níveis de oxLDL, anti-oxLDL e hsCRP.

A presença de elevados níveis de oxLDL, anticorpos anti-oxLDL e hsCRP, estão relacionados com o aumento da hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP.

Conclui-se, portanto que níveis aumentados de colesterol apresentam forte relação com a atividade da NTPDase em plaquetas e com o processo inflamatório.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, R.; MORATTI R.; DE LUCA G. Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies. **Current Molecular Medicine**, v. 2, p. 579 –592, 2002.

ALEXANDER, C. M.; LANDSMAN, P. B.; TEUTSCH, S. M.; HAFFNER, S. M. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. **Diabetes**, v. 52, p. 1210 – 1214, 2003.

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

AMBERGER, A.; MACZEK, C.; JURGENS, G. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. **Cell Stress Chaperones**, v. 2, p. 94–103, 1997.

ANGELIQUE, C. M.; JANSEN, E. S.; VAN AALST-COHEN, M. W. T.; TANCK, S. C.; FONTECHA, M. R.; JOEP, J. L.; DEFESCHE, C.; KASTELEIN, J. J. P. Genetic determinants of cardiovascular disease risk in familial hypercholesterolemia **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 1475 – 1481, 2005.

ARAKAWA, H.; QIAN, J. Y.; BAATAR, D.; KARASAWA, K.; ASADA, Y.; SASAGURI, Y.; MILLER E.R.; WITZTUM, J. L.; UENO, H. Local expression of platelet-activating factor-acetylhydrolase reduces accumulation of oxidized lipoproteins and inhibits inflammation, shear stress-Induced thrombosis, and neointima formation in balloon-Injured carotid arteries in nonhyperlipidemic rabbits. **Circulation**, v. 111, p. 3302–3309, 2005.

ARAÚJO, M. C.; ROCHA, J. B. T.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochim Biophys Acta**, v. 1740, n. 3, p. 421–426, 2004.

ARMSTRONG, E. J.; MORROW, D. A.; SABATINE, M. S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part I: introduction and cytokines. **Circulation**, v.113, p.72–75, 2006. (a)

ARMSTRONG, E. J.; MORROW, D. A.; SABATINE, M. S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part II: acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation. **Circulation**, v.113, p.152 –155, 2006. (b)

ARMSTRONG, E. J.; MORROW, D. A.; SABATINE, M. S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part IV: matrix metalloproteinases and biomarkers of platelet activation. **Circulation**, v. 113, p. 382 – 385, 2006. (c)

ASCASO, J. F.; REAL, J. T.; CARMENA, R. Insulin resistance and familial dyslipidaemias. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 1, p. 323 – 330, 1999.

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

BARLAGE, S.; BOETTCHER, D.; BOETTCHER, A.; DADA, A.; SCHMITZ, G. High density lipoprotein modulates platelet function. **Cytometry**, v. 69, p. 196-199, 2006.

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

BERLINER, A. B.; NAVAB, M.; FOGELMAN A. M. Atherosclerosis: basic mechanismsoxidation, inflammation, and genetics. **Circulation**, v. 91, p. 2488–2496, 1995.

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

BIRK, A. V.; BUBMAN, D.; BROEKMAN, M. J.; ROBERTSON, H. D., DROSOPOULOS, J. H.; MARCUS, A. J.; SZETO, H .H. Role of a novel souble nucleotide phosphohydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: Hemostasis, thrombosis, and vascular biology. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, p. 116–124, 2002.

BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V. B.; FREEMAN, B. A. nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, p. 1707–1715, 2000.

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

BOREN, J.; GUSTAFSSON, M.; SKALEN, K.; FLOOD, C.; Innerarity, T. L. Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 11, p. 451– 456, 2000.

BORK, P.; SANDER, C.; VALENCIA, A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 7290–7294, 1992.

BRASS, S. Cardiovascular biology: small cells, big issues. **Nature**, v. 409, p. 145-147, 2001.

BREWER, H. B. Focus on high-density lipoproteins in reducing cardiovascular risk. **American Heart Journal**, v. 148, p. 14–18, 2004.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, p. 34–37, 1986.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p. 364–373, 2002.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Revue de Cytologie Clinique**, , v. 240, p. 231–304, 2004.

CARINE, J. M.; DOGGEN, N. L.; SMITH, R. N.; LEMAITRE, S. R.; HECKBERT, F. R. ROSENDAAL, BRUCE, M. P. Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, p. 1970–1975, 2004.

CHAN, K.; DELFRET, D.; JUNGES, K. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, p. 375–380, 1986.

COOPER, A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p. 2173–2192, 1997.

CROWLEY, S. T.; DEMPSEY, E. C.; HORWITZ, K. B.; HORWITZ, L. D. Platelet-induced vascular smooth muscle cell proliferation is modulated by the growth amplification factors serotonin and adenosine diphosphate. **Circulation**, v. 90, p.1908–1918, 1994.

DANESH, J.; COLLINS, R.; PETO, R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. **Circulation**, v. 102, p. 1082–1085, 2000.

DASTANI, Z.; QUIOGUE, L.; PLAISIER, C.; ENGERT, J. C.; MARCIL, M.; GENEST, J.; PAJUKANTA, P. Evidence for a gene influencing high-density lipoprotein cholesterol on chromosome 4q31.21. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 392 – 397, 2006.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J. M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O. R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, p. 587–600, 2001.

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

DIJKSTRA, J.; SWARTZ G. M.; RANEY, J. B. J.; ANIAGOLU, J.; TORO, T.; NACY, C. A.; GREEN S. J. Interaction of anti-cholesterol antibodies with human lipoproteins. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 2006–2013, 1996.

DUBEY, R. K.; GILLESPIE, D. G.; JACKSON, E. K. Adenosine inhibits collagen and total protein synthesis in vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 33, p. 190–194, 1999.

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

ENJYOJI, K.; SEVIGNY, J.; LIN, Y.; FRENETTE, P. S.; CHRISTIE, P. D.; ESCH, J. S. I. I.; IMAI, M. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v. 5, p. 1010–1017, 1999.

ERLINGE, D. Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. **General Pharmacology**, v. 1, p. 1–8, 1998.

FARMER, J. A.; GOTTO, A. M. J. Dyslipidemia and the vulnerable plaque. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 44: p. 415–428, 2002.

FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **Journal of Lipid Research**, v. 36, p. 211–228, 1995.

FLAHERTY, K. M.; MCKAY, D. B.; KABSCH, W. Similarity of the three dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 5041–5045, 1991.

FORCHERON, F.; LEGEDZ, L.; CHINETTI, G.; FEUGIER, P.; LETEXIER, D.; BRICCA, G.; BEYLOT, M. Genes of Cholesterol Metabolism in Human Atheroma: Overexpression of Perilipin and Genes Promoting Cholesterol Storage and Repression of ABCA1 Expression. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 1711 – 1717, 2005.

FORD, E. S.; GILES, W. H. Serum C-reactive protein and self-reported stroke : findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, p. 1052–1056, 2000.

FORRESTER, J. S.; MAKKAR, R.; SHAH, P. K. Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition. **Circulation**, v. 111, p. 1847–1854, 2005.

FREEDMAN, J. E. Molecular Regulation of Platelet-Dependent Thrombosis. **Circulation**, v. 112, p. 2725 – 2734, 2005.



FROSTEGÄRD, J.; ULFGREN, A. K.; NYBERG, P.; HEDIN, U.; SWEDENBORG, J.; ANDERSSON, U.; HANSSON, G. K. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. **Atherosclerosis**, v. 145, p. 33–43, 1999.

FUKUMOTO, M.; SHOJI, T.; EMOTO, M. Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, p. 703–707, 2000.

FURMAN, M. I.; BENOIT, S. E.; BERNARD, M. R.; VALERI, C. R.; BORBONE, M. I.; BECKER, R. C.; HECHTMAN, H. B.; MICHELSON, A. D. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, p. 352–358, 1998.

GAILANI, D.; HO, D.; SUN, M. F.; CHENG, Q.; WALSH, P. N. Model for a factor IX activation complex on blood platelets: dimeric conformation of factor XIa is essential. **Blood**, v. 97, p. 3117–3122, 2001.

GAYLE III, R. B.; MALISZEWSKI, C. R.; GIMPEL, S. D.; SCHOENBORN, M. A.; CASPARY, R. G.; RICHARDS, C.; BRASEL, K.; PRICE, V.; DROSOPOULOS, J. H. F.; ISLAM, N.; ALYONCHEVA, T. N.; BROEKMAN, M. J.; MARCUS, A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness **Nature Medicine**, v. 101, 1851–1859, 1998.

GAYLE, III R. B.; MALISZEWSKI, C. R.; GIMPEL, S. D. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, 1851–1859, 1998.

GAZI, I.; TSIMIHODIMOS, V. FILIPPATOS, T. D. ; SAOUGOS, V. G. ; BAIRAKTARI, E. T.; TSELEPIS, A. D. ; ELISAF, M. LDL cholesterol estimation in patients with the metabolic syndrome . **Lipids in Health and Disease**, v. 5, n. 8, p. 1–6, 2006.

GENG, Y. J.; HENDERSON, L. E.; LEVESQUE, E. B.; MUSZYNSKI, M.; LIBBY, P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 17, p. 2200–2208, 1997.

- GENG, Y. J.; HANSSON, G. K. Interferon-  $\gamma$  inhibits scavenger receptor expression and formation in human monocyte-derived macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, p. 1322–1330, 1992.
- GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. **Journal of Lipid Research**, v. 37, p. 693–707, 1996.
- GORDON, J. Extracellular ATP: effects, sources and fate. **Biochemical Journal**, v. 233, p. 309–319, 1986.
- GRANGER, D. N.; VOWINKEL, T.; PETNEHAZY, T. Modulation of the inflammatory response in cardiovascular disease. **Hypertension**, v. 43, p. 924–926, 2004.
- GRIENDLING, K. K.; USHIO-FUKAI, M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 132, p. 9–15, 1998.
- GRIFFIN, J. H.; FERNANDEZ, J. A.; DEGUCHI, H. Plasma lipoproteins, hemostasis and thrombosis. **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, v. 86, p. 386–394, 2001.
- GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras. **Biochemical Journal**, v. 41, p. 1947–1956, 2002.
- HAMASAKI, S.; HIGANO, S. T.; SUWAIDI, J. A.; NISHIMURA, R. A.; MIYAUCHI, K.; HOLMES, D. R.; LERMAN, J. A. Cholesterol-lowering treatment is associated with improvement in coronary vascular remodeling and endothelial function in patients with normal or mildly diseased coronary arteries. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, p. 737–743, 2000.
- HANSSON, G. K.; HOLM, J.; KRAL, J. G. Accumulation of IgG and complement factor C3 in human arterial endothelium and atherosclerotic lesions. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 92, p. 429–435, 1984.
- HANSSON, G. K.; HOLM, J.; JONASSON, L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. **American Journal of Pathology**, v. 135, p. 169 – 175, 1989.

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

HANSSON, G. K. Immune Mechanisms in Atherosclerosis **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 1876-1890, 2001.

HARRISON, D. G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2153–2157, 1997.

HARRISON, D.; GRIENGLING, K. K.; LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **American Journal of Cardiology**, v. 91, p. 7A–11A, 2003.

HEINECKE, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidised low density lipoprotein hypothesis. **Arteriosclerosis**, v. 141, p. 1–15, 1998.

HIRANY, S.; O'BYRNE, D.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Remnant-like particle-cholesterol concentrations in patients with type 2 Diabetes Mellitus and endstage renal disease. **Clinical Chemistry**, v. 46, p. 667 – 672, 2000.

HOKANSON, J. E.; AUSTIN, M. A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of populationbased prospective studies. **Journal of Cardiovascular Risk**, v. 3, p. 213–219, 1996.

HOLVOET, P.; VANHAECKE, J.; JANSSENS, S.; VAN DE WERF, F.; COLLEN, D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. **Circulation**, v. 98, p. 1487–1494, 1998.

HOU, M.; HARDEN, T. K. T.; KUHN, C. M.; BALDETORP, B.; LAZAROWSKI, E.; PENDERGAST, W.; MÖLLER, S.; EDVINSSON, L.; ERLINGE, D. UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P2Y<sub>6</sub> receptors **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, p. H784–H792, 2002.

HULTHE, J.; FAGERBERG, B. circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR study). **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p.162–1167, 2002.

IKEDA, U.; IKEDA, M.; SEINO, Y.; TAKAHASHI, M.; KANO, S.; SHIMADA, K. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of genetically hyperlipidemic rabbits. **Atherosclerosis**, v. 92, p. 213–218, 1992.

JAFFER, F. A.; O'DONNELL, C. J.; LARSON, M. G.; CHAN, S. K.; KISSINGER, K. V.; KUPKA, M. J.; SALTON, C.; BOTNAR, R. M.; LEVY, D.; MANNING, W. J. Age and sex distribution of subclinical aortic atherosclerosis: a magnetic resonance imaging examination of the Framingham Heart Study. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p. 849–854, 2002.

JUNGERS, P.; MASSY, Z. A.; KHOA, T. N. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 12, p. 2597–2602, 1997.

JUNYENT, M.; COFÁN, M.; NÚÑEZ, I.; GILABERT, R.; ZAMBÓN, D.; ROS, E. Influence of HDL cholesterol on preclinical carotid. atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 1107–1113, 2006.

KACZMAREK, E.; KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; SIEGEL, J. B.; ANRATHER, J.; BEAUDOIN, A. R.; BACH, F. H. Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 33116–33122, 1996.

KAMOUN, P. L. ; ALAIN - VERNEUIL, H. D. **Bioquímica e Biologia Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KANEIDER, N. C.; EGGER, P.; DUNZENDORFER, S. Reversal of thrombin-induced deactivation of CD39/ATPase in endothelial cells by HMG-CoA reductase inhibition: effects of Rho-GTPase and adenosine nucleotide metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p. 894–900, 2002.

KANSAS, G. S.; WOOD, G. S.; TEDDER, T. F. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.146, p. 2235–2244, 1991.

KAWASHINA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5' nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood.**, v. 96, p. 2157– 2162, 2000.

KOUNNAS, M. Z.; MORRIS, R. E.; THOMPSON, M. R.; FITZGERALD, D. J.; STRICKLAND, D. K.; SAELINGER, C. B. The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor- related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 12420-12423, 1992.

KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; LAVOIE E', G. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDase 1, 2, 3 and 8. **Purinergic Signalling**, v.1, p. 193–204, 2005.

KUMAR, V.; FAUSTO; ABBAS. **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 7<sup>th</sup>. Philadelphia:WB Saunders, 2004, p. 521-524.

KUSUMOTO, F. M. **Fisiopatologia cardiovascular**. México: Novo México, 2001.

LANE, D. A.; PHILIPPOU, H.; HUNTINGTON, J. A. Directing thrombin. **Blood**, v. 106, p. 2605 – 2612, 2005.

LEAL, D.; STREHER, C.; NEU, T.; BITTENCOURT, F.; LEAL, C.; SILVA, J.; MORSCH, V.; SCHETINGER, M. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochim Biophys Acta**, v.1721, p.9-15, 2005.

LEHTIMÄKI, T.; LEHTINEN, S.; SOLAKIVI, T.; NIKKILÄ, M.; JAAKKOLA, O.; JOKELA, H.; YLÄ-HERTTUALA, S.; LUOMA, J.S.; KOIVULA, T.; NIKKARI, T. Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, p. 23–27, 1999.

LEON, C.; ALEX, M.; KLOCKE, A.; MORGENSTERN, E.; MOOSBAUER, C.; ECKLY, A.; SPANNAGL, M.; GACHET, C.; ENGELMANN, B. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. **Blood.**, v. 103, p. 594 – 600, 2004.

LEY, K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, p. 263–268, 2003.

LI, J. J.; FANG, C. H. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases. **Medical Hypotheses**, v. 62, p. 499–506, 2004.

LIAO, H. S.; MATSUMOTO, A.; ITAKURA, H.; DÓI, T.; HONDA, M.; KODAMA, T.; GENG, Y. J. Transcriptional inhibition by interleukin-6 of the class A macrophage scavenger receptor in macrophages derived from human peripheral monocytes and the THP-1 monocytic cell line. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, p. 1872–1880, 1999.

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

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p. 868–874, 2002.

LIBBY, P.; WARNER, S.; FRIEDMAN, G. B. Interleukin-1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. **Journal of Clinical Investigation**, v. 81, p. 487–498, 1988.

LIBBY, P.; HANSSON, G. K. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. **Laboratory Investigation**, v. 64, p. 5–15, 1991.

LIJNEN, P.; ECHEVARIA-VAZQUEZ, D.; PETROV, V. Influence of cholesterol-lowering on plasma membrane lipids and function. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v.18, p.123–126, 1996.

LIYAMA, K.; HAJRA, L.; LIYAMA, M.; LI, H.; DICHIARA, M.; MEDOFF, B. D.; CYBULSKY, M. I. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. **Circulation Research**, v. 85, p. 199–207, 1999.

LONDON, G. M.; MARCHAIS, S. J.; GUERIN, A. P.; Arterial structure and function in end-stage renal disease. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 17, p. 1713–1724, 2002.

LORENZI. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Ed. Medsi, 2003.

LOUGHEED, M.; LUM, C. M.; LING, W.; SUZUK, I. H.; KODAMA, T.; STEINBRECHER, U. High affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I/II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 12938–12944, 1997.

LUNKES, G. I.; LUNKES, D.; MORSCH, V. M; MAZZANTTI, C. M.; MORSCH, A.; MIRON, V. R.; SCHETINGER, M. R. C. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 65, p.1–6, 2004.

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

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-241, 2000.

LUTHJE J. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. **Klinische Wochenschrift**, v. 67, p. 317–327, 1989.

MANOLIO, T. A.; BURKE, G. L.; O'LEARY, D. H.; EVANS, G.; BEAUCHAMP, N.; KNEPPER, L.; WARD, B. Relationships of cerebral mri findings to ultrasonographic carotid atherosclerosis in older adults: The cardiovascular health study. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, p. 356–365, 1999.

MARCOVINA, S. M; GAUR, V. P. ; ALBERS, J. J. Biological variability of cholesterol, triglyceride, low and high-density lipoprotein cholesterol, lipoprotein (a), and apolipoproteins A-I and B. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 574–578, 1994.

MARCUS, A. J.; SAFIR, L. B.; HAJJAR, K. A.; Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase: thromboregulation by endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 1690–1696, 1991.

MARCUS, A. J.; SAFIER, L. B. Thromboregulation:multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. **Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, p. 516–522, 1993.



MARCUS, A. J.; BROEKMAN, M. J.; DROSOPOULOS, J. H.; ISLAM, N.; ALYONYCHEVA, T. N.; SAFIER, L. B.; HAJJAR, K. A. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. **Journal of Clinical Investigation**, v. 996, p. 1351–1360, 1997.

MARCUS, A. J.; BROEKMAN, M. J.; DROSOPOULOS, J. H. F.; PINSKY, D. J.; ISLAM, N.; GAYLE III, R. B.; MALISZEWSKI, C. R. Thromboregulation by endothelial cells : significance for occlusive vascular diseases. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 178–182, 2001.

MARCUS, A. J.; BROEKMAN, M. J.; DROSOPOULOS J. H .F, ISLAM, N.; PINSKY, D.J.; SESTI, C.; LEVI, R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD 39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 12, p. 2497–2509, 2003.

MATSUURA, E.; KOBAYASHI, K.; TABUCHI, M.; LOPEZ, L. R. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. **Progress in Lipid Research**, v. 45, p. 466-86, 2006.

MAYR, M.; CHUNG, Y. L.; MAYR, U.; YIN, X.; LY, L.; TROY, H.; FREDERICKS, S.; HU, Y.; GRIFFITHS, J.R.; XU, Q. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 2135–2142, 2005.

MELCHIOR, C. N.; BERTHIL, H. C. M. T.; PRINSEN, J. R.; VELDMAN, R. J.; KUIVENHOVEN, J. A.; KASTELEIN, J. P.; SAIN-VAN DER VELDEN, M. G. M.; STROES, E. S. G. Enhanced conversion of triglyceride-rich lipoproteins and increased low-density lipoprotein removal in LPLS447X carriers. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 2410 –2415, 2005.

MEYERHOF, O. The origin of reaction of harden young in cell-free alcoholic fermentation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 157, p. 105–119, 1945.

MOORE, K. J.; FREEMAN, M. W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis: Beyond Lipid Uptake. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p.1702 – 1711, 2006.



NAPOLI, M. D.; SCHWANINGER, M.; CAPPELLI, R.; CECCARELLI, E.; GIANFILIPPO, G. D.; DONATI, C.; EMSLEY, H. C. A.; FORCONI, S.; HOPKINS, S. J.; MASOTTI, L.; MUIR, K. W.; PACIUCCI, A.; PAPA, F.; RONCACCI, S.; SANDER, D.; SANDER, K.; SMITH, C. J.; STEFANINI, A.; WEBER, D. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: A statement for health care professionals from the hsCRP pooling project members. **Stroke**, v. 36, p. 1316-1329, 2005.

NEARY, J. T.; ABBRACCHIO, M. P. Trophic roles of purines and pyrimidines. In: HANDBOOK OF PHARMACOLOGY: PURINERGIC AND PYRIMIDINERGIC SIGNALLING. Berlin, Germany: **Springer**, p. 305–338, 2001.

ORTEGA, A.; SANTIAGO-GARCÍA, J.; MAS-OLIVA, J.; LEPOCK, J. R. Cholesterol increases the thermal stability of the  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of cardiac microsomes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1283, p. 45–50, 1996.

PAPANIKOLAOU, A.; PAPAFOITIKA, A.; MURPHY, C.; PAPAMARCAKI, T.; TSOLAS, O.; DRAB, M.; KURZCHALIA, T. V.; KASPER, M.; CHRISTOFORIDIS, S. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 26404–26414, 2005.

PARUMS, D. V.; CHADWICK, D. R.; MITCHINSON, M. J. The localization of immunoglobulin in chronic periaortitis. **Atherosclerosis**, v. 61, p. 117–123, 1986.

PASCERI, V.; WILLERSON, J. T.; YEH, E. T. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. **Circulation**, v. 102, p. 2165–2168, 2000.

PEASE, R. J.; LEIPER, J. M. Regulation of hepatic apolipoprotein-B-containing lipoprotein secretion. **Current Opinion in Lipidology**, v. 7, p. 132–138, 1996.

PERSSON, J.; NILSSON, J.; LINDHOLM, M. W. Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages. **Lipids in Health and Disease**, v. 5, n. 17, p. 1–8, 2006.

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

PRABHU, S. D. Cytokine-induced modulation of cardiac function. **Circulation Research**, v. 95, p. 1140–1153, 2004.

PRASAD, K. C-reactive protein (CRP)-lowering agents. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 24, p. 33– 50, 2006.

QIN, C.; NAGAO, T.; GROSHEVA, I.; MAXFIELD, F. R.; PIERINI, L. M. Elevated plasma membrane cholesterol content alters macrophage signaling and function. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 372–378, 2006.

RAY, J. G.; ROSENDAAL, F. R. The role of dyslipidemia and statins in venous thromboembolism. **Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine**, v. 2, p. 165–170, 2001.

RIDKER, P. M. C-reactive protein and the risks of future myocardial infarction and thrombotic stroke. **European Heart Journal**, v. 19, p. 1– 3, 1998.

RIDKER, P. M. High sensitivity C-reactive protein. Potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. **Circulation**, v. 3, p. 1813– 1818, 2001.

RIDKER, P. M.; WILSON, P. W. F.; GRUNDY, S. M. Should C-Reactive Protein Be Added to Metabolic Syndrome and to Assessment of Global Cardiovascular Risk? **Circulation**, v. 109, p. 2818-2825, 2004.

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

ROSENFELD, M. E.; PALINSKI, W.; YLA-HERTTUALA, S.; BUTLE, R. S.; WITZTUM, J. L. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. **Arteriosclerosis**, v. 10, p. 336– 349, 1990.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362, p. 801– 809, 1993.

ROSS, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **American Heart Journal** v. 138, p. 419–420, 1999.

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

SARKIS, J. J. F.; BATTASTINI, A. M. O.; OLIVEIRA, E. M.; FRASSETTO, S. S.; DIAS, R. D. ATP-Diphosphohydrolase : an overview. **Journal Brazil Associated and Advanced**, v. 47, p. 131–136, 1995.

SCALIA, R., APPEL, J. Z., LEFER, A. M. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 18, p. 1093–1100, 1998.

SCHULTE AM ESCH, J.; SÉVIGNY, J.; KACZMAREK, E. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. **Biochemical Journal**, v. 38, p. 2248–2258, 1999.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N.; Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. **Blood**, v. 99, p. 2801–2809, 2002.

SEVITT, S. Platelets and s in the evolution of atherosclerosis: histological and immunohistological studies of human lesions. **Atherosclerosis**, v. 61, p. 107–115, 1986.

SHAW, P. X.; GOODYEAR, C. S.; CHANG, M. K.; WITZTUM, J.;L.; SILVERMAN, G. J. The autoreactivity of anti-phosphorylcholine antibodies for atherosclerosis-associated neo-antigens and apoptotic cells. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 6151–6157, 2003.

SHOENFELD, Y.; WU, R.; DEARING, L. D.; MATSUURA, E. Are Anti-Oxidized Low-Density Lipoprotein Antibodies Pathogenic or Protective? **Circulation**, v. 110, p. 2552–2558, 2004.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 31–39, 2000.

SIMOONS, M. L. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker abciximab on outcome in patients with acute coronary syndromes without early coronary revascularisation: the GUSTO IV-ACS randomised trial. GUSTO IV-ACS Investigators. **Lancet**, v. 357, p. 1915–1924, 2001.

SKALEN, K.; GUSTAFSSON, M.; RYDBERG, E. K.; HULTEN, L. M.; WIKLUND, O.; INNERARITY, T. L.; BOREN, J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. **Nature**, v. 417, p. 750–754, 2002.

SCHACHTER, M. Endothelium and smooth muscle: trophic interactions and potential for therapeutic intervention. **Journal of Human Hypertension**, v. 4, p. 17–21, 1990.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-ATPase: Evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. **Biochemical Journal**, v. 38, p. 321–328, 1999.

SPRONK, H. M. H.; van der VOORT, D.; ten CATE, H. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. **Thrombosis Journal**, v. 2, p. 1–10, 2004.

STAFFORD, N. P.; PINK, A. E.; WHITE, A. E.; GLENN, J. R.; HEPTINSTALL, S. Mechanisms involved in adenosine triphosphate-induced platelet aggregation in whole blood **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.23, p. 1928–1933, 2003.

STAMLER, J.; WENTWORTH, D.; NEATON, J. D. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded?: findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFTT). **Journal of the American Medical Association**, v. 256, p. 2823–2828, 1986.

STARY, H. C.; CHANDLER, A. B.; DINSMORE, R. E.; FUSTER, V.; GLAGOV, S.; INSULL, W.; ROSENFELD, M. E.; SCHWARTZ, C. J.; WAGNER, W. D. ; WISSLER, R. W. A Definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis : A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.15, p. 1512–1531, 1995.

STORMORKEN, H.; SAKARIASSEN, K. S. Hemostatic risk factors in arterial thrombosis and atherosclerosis: the thrombin-fibrin and platelet-vWF axis. **Thrombosis Research**, v. 88, p. 1–25, 1997.

SZMITKO, P. E.; WANG, C. H.; WEISEL, R. D.; ALMEIDA, J. R.; ANDERSON, T. J.; VERMA, S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I, **Circulation**, v. 108, p.1917-1923, 2003.

TALL, A. R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. **Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 1255–1274, 1993.

TINGSTRÖM, A.; REUTERDAHL, C.; LINDAHL, P.; HELDIN, C. H.; RUBIN, K. Expression of platelet-derived growth factor- $\alpha$  receptors on human fibroblasts: regulation by recombinant platelet-derived growth factor-BB, IL-1, and tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Journal of Immunology**, v.148, p. 546–554, 1992.

TONELLI, M.; BOHM, C.; PANDEYA, S. Cardiac risk factors and use of cardioprotective medications in patients with chronic renal insufficiency. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 37, p. 484–489, 2001.

TOSS, H.; LINDAHL, B.; SIEGBAHN, A.; WALLENTIN, L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. **Circulation**, v. 96, p. 4204–4210,1997.

TOUSOULIS, D.; DAVIES, G.; STEFANADIS, C.; TOUTOUZAS, P.; AMBROSE, A. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. **Heart**, v. 89, p. 993–997, 2003.

TOUSOULIS, D.; CHARAKIDA, M.; STEFANADIS, C. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. **Heart**, v. 92, p. 441–444, 2006.

TSIMIKAS, S.; WITZTUM, J. L. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. **Circulation**, v. 103, p 1930-1932, 2001.

VERMA, S.; SZMITKO, P. E.; YEH, E. T. H. C-reactive protein: structure affects function. **Circulation**, v.109, p. 1914 –1917, 2004.

VERMA, S.; WANG, C. H.; LI, S. H. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. **Circulation**, v.106, p. 913–919, 2002.

VORHOFF, T.; ZIMMERMANN, H.; PELLETIER, J. Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to members of the E-NTPDase family and actin. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 259–270, 2005.

WAGNER, D. D.; BURGER, P. Platelets in inflammation and thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.23, p.2131-2137, 2003.

WALLENFELDT, K.; FAGERBERG, B.; WIKSTRAND, J.; HULTHE J. Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically healthy men. **Internal Medicine Journal**, v. 256, p. 413– 420, 2004.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto- (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)-apyrase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 9898–9901, 1996.

WANG, C. H.; LI, S. H.; WEISEL, R. D. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. **Circulation**, v. 7, p. 1783–1790, 2003.

WILSIE, L. C.; GONZALES, A. M.; ORLANDO, R. A. Syndecan-1 mediates internalization of apoE-VLDL through a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-independent, non-clathrin-mediated pathway. **Lipids in Health and Disease**, v. 5, n. 23, p. 1–8, 2006.

WITZTUM, J. L., STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 11, p. 93–102, 2001.

WOOD, W. G.; IGBAVBOA, U.; RAO, A. M; SCHROEDER, F.; AVDULOV, N. A. Cholesterol oxidation reduces Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>. ATPase activity, interdigitation, and increase fluidity of brain synaptic plasma membranes. **Brain Research**, v. 683, p. 36–42, 1995.

WUNG, S. F.; KULKARNI, M. V.; PULLINGER, C. R.; MALLOY, M. J.; KANE, J. P.; AOUIZERAT, B. E. The lipoprotein lipase gene in combined hyperlipidemia: evidence of a protective allele depletion. **Lipids in Health and Disease**, v. 5, p. 19, p.1–7, 2006.

YASMIN; McENIERY, C. M.; WALLACE, S.; MACKENZIE, I. S.; COCKCROFT, J. R.; WILKINSON, I. B. C-reactive protein is associated with arterial stiffness in apparently healthy individuals. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.24, p. 969–974, 2004.

YOKOYAMA, S. Assembly of high-density lipoprotein. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 20 – 27, 2006.

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

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