

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE
DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA E ÉSTERES DE
COLINA E ESTUDO DO PERFIL OXIDATIVO EM
PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA**

TESE DE DOUTORADO

Margarete Dulce Bagatini

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS
DE ADENINA E ÉSTERES DE COLINA E ESTUDO DO PERFIL OXIDATIVO EM
PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA**

por

Margarete Dulce Bagatini

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em
Enzimologia Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**
em Bioquímica Toxicológica.

Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch

Co-orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, RS, Brasil

2010

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de
Doutorado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS
DE ADENINA E ÉSTERES DE COLINA E ESTUDO DO PERFIL OXIDATIVO EM
PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA**

elaborada por
Margarete Dulce Bagatini

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

Comissão examinadora:

Prof^ª. Dra. Vera Maria Melchiors Morsch
(Presidente/Orientador)

Rosilene Rodrigues Kaizer Perin (IFC)

Roselei Fachinetti (UFSM)

Sydney Hartz Alves (UFSM)

Cinthia Melazzo Mazzanti (UFSM)

Santa Maria, 16 de dezembro de 2010

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é
alguém que acredite que ele possa ser realizado.”*

Roberto Shinyashiki

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Luiz e Vanisse

Aos meus irmãos: Márcia e Luciano

Ao meu noivo: Diogo

*Pelo amor, carinho, apoio,
compreensão, companheirismo e
incentivo durante toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo maravilhoso dom da vida e aos meus pais por me criarem com tanto amor, carinho e dedicação.

Aos meus irmãos Márcia e Luciano, ao meu cunhado Gilson, as minhas sobrinhas Daiane e Caroline e ao meu noivo Diogo por estarem sempre presentes me apoiando e incentivando a cada etapa da minha vida.

À professora Vera, minha orientadora, obrigada por todos os ensinamentos, atenção, carinho e compreensão. Obrigada por ser essa professora e orientadora exemplar!

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

A minha querida aluna de iniciação científica Caroline, pela dedicação e companheirismo durante este trabalho. Carol você é muito mais que minha aluna, é uma amiga e companheira para todas as horas.

Aos amigos e colegas do Laboratório 2208, Andréia, Rosélia, Roberta, Jamile, Vanessa, Paula, Lara, Cintia, Daniela, Luciane, Viviane, Jucimara, Amanda, Pauline, Liési, Naiara, Marília, Thaís, Fátima, Eloisa, Jessié, Victor, João, Jeandre, Jader, Cláudio, Gustavo, Jonas, Javed... pelos momentos compartilhados e pela amizade durante o período de convívio.

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

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

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica, pelos ensinamentos, amizade e dedicação.

A CAPES, pela bolsa concedida.

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

RESUMO

Tese de doutorado

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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA E ÉSTERES DE COLINA E ESTUDO DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA

Autora: MARGARETE DULCE BAGATINI

Orientadora: VERA MARIA MELCHIORS MORSCH

Co-Orientadora: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Local e data de defesa: Santa Maria, 16 de dezembro de 2010.

A cardiopatia isquêmica (CI) é uma das principais doenças cardiovasculares. O termo "isquemia" refere-se à falta de oxigênio, secundária à perfusão inadequada do miocárdio, que gera desequilíbrio entre a oferta e a demanda deste gás. A causa mais comum de isquemia miocárdica é a doença aterosclerótica obstrutiva das artérias coronárias, causada por ruptura ou ulceração da placa ateromatosa e consequente formação de trombo. As plaquetas são um dos mais importantes componentes do sangue que participam na regulação dos processos tromboembólicos por liberação de substâncias ativas como os nucleotídeos de adenina, ATP e ADP. Uma vez exercida sua ação esses nucleotídeos são degradados por um grupo de enzimas denominadas de ectonucleotidases. Essas são responsáveis pela hidrólise do ATP e ADP até AMP e consequente formação da adenosina, uma molécula cardioprotetora e anti-inflamatória. Outra importante molécula anti-inflamatória é a acetilcolina (ACh). Entretanto, a ACh é rapidamente hidrolisada pelas enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). Acompanhando a isquemia temos uma produção elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs). Um desequilíbrio entre a produção e a degradação de EROs pode levar a um aumento do estresse oxidativo. Neste trabalho determinaram-se a atividade das enzimas envolvidas na trombo-regulação: NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA, e a atividade de enzimas que degradam ésteres de colina: AChE e BuChE, além dos parâmetros de estresse oxidativo em pacientes cardiopatas e controles. Foi realizada a avaliação do sistema oxidante através da determinação da peroxidação lipídica e da carbonilação protéica e a medida das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas do organismo, em sangue total, plasma e soro destes pacientes. Os resultados demonstraram um aumento na atividade da NTPDase e da 5'-nucleotidase, revelada através da hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP. Para a enzima E-NPP também foi observado um aumento na sua atividade em pacientes cardiopatas. Entretanto, para a ADA observou-se uma diminuição na atividade. Esses resultados sugerem uma resposta orgânica compensatória do organismo frente ao estado patológico formado, com o objetivo de manter os níveis de adenosina, uma molécula cardioprotetora. Para as enzimas que degradam ésteres de colina foi observado um aumento tanto na atividade da AChE quanto da BuChE em pacientes cardiopatas. Um aumento na atividade sérica e no sangue total da atividade da BuChE e da AChE pode refletir indiretamente níveis reduzidos de ACh que, por sua vez, irá reforçar eventos inflamatórios locais e sistêmicos, devido à ausência do controle de retroalimentação negativa exercido pela ACh. Em relação aos níveis de oxidantes determinados, observou-se um

aumento nos níveis de TBARS e proteína carbonil em soro de pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) quando comparados com o grupo controle. Esse aumento também foi observado para as defesas antioxidantes enzimáticas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Entretanto, observou-se um decréscimo das defesas antioxidantes não enzimáticas como a vitamina C e a vitamina E no soro de pacientes com IAM. Estes dados sugerem um aumento do estresse oxidativo como resultado do momento de isquemia/reperfusão e da diminuição das defesas antioxidantes não enzimáticas. Além disso, o aumento das defesas antioxidantes enzimáticas poderiam agir como um mecanismo compensatório como consequência da superprodução de EROs após o IAM. Concluí-se então, que a CI resulta tanto em danos oxidativos e inflamatórios como mobilização das defesas do organismo para uma resposta compensatória.

Palavras-chave: Cardiopatia isquêmica; ectonucleotidasas; colinesterases; estresse oxidativo; defesas antioxidantes

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EVALUATION OF THE ENZYME ACTIVITY THAT DEGRADES ADENINE NUCLEOTIDES AND ESTERS OF CHOLINE AND STUDY OF OXIDATIVE PROFILE IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART

Author: MARGARETE DULCE BAGATINI

Adviser: VERA MARIA MELCHIORS MORSCH

Co-adviser: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Place and date of defense: Santa Maria, 16 december 2010.

Ischemic heart disease (IHD) is a major cardiovascular disease. The term "ischemia" refers to a lack of oxygen due to inadequate perfusion, which results from an imbalance between oxygen supply and demand. The most common cause of myocardial ischemia is atherosclerotic obstructive coronary artery disease caused by rupture or ulceration of atheromatous plaque and subsequent thrombus formation. Platelets are one of the most important blood components that participate in and regulate thrombus formation by releasing active substances such as adenine nucleotides ATP and ADP. Once their action is exerted, the nucleotides are degraded by a group of enzymes called ectonucleotidases. These enzymes are responsible for the hydrolysis of ATP and ADP to AMP, and consequent formation of adenosine, a cardioprotective and anti-inflammatory molecule. Another important anti-inflammatory molecule is acetylcholine (ACh). However, ACh is rapidly hydrolyzed by the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). Following ischemia, an elevated production of reactive oxygen species (ROS) occurs. The imbalance between ROS production and degradation may lead to an increase in oxidative stress. This study aimed to determine the activity of enzymes involved in thromboregulation, such as NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA, the activity of enzymes that degrade choline esters: AChE and BuChE, as well as the parameters of oxidative stress in IHD patients and controls. Evaluation of the oxidant system was carried out by lipid peroxidation and carbonyl protein determination, and the enzymatic and nonenzymatic antioxidant defense measurements were performed in total blood, plasma, and serum of IHD patients. Results showed an increase in the NTPDase and 5'-nucleotidase activities as revealed by nucleotides hydrolysis ATP, ADP and AMP. An increase in E-NPP activity was also observed in IHD patients. However, a decrease in ADA activity was observed. Based on the results presented here we suggest that the pathological condition in IHD produced alterations in ectonucleotidase activities as a compensatory organic response, with the objective of maintaining the levels of adenosine, which is a cardioprotective molecule. An increase in the activity of enzymes that degrade choline esters (AChE and BuChE) in IHD patients was observed. Increasing total blood and serum activities of AChE and BuChE enzymes indirectly reflect reduced levels of ACh. The enhancement of local and systemic inflammatory events is observed due to the absence of the negative *feedback* control exerted by ACh. Regarding oxidant levels, an increase in TBARS and carbonyl protein levels was observed in acute myocardial infarction (AMI) patients when compared to the control group. The same occurred for the activities of

the enzymatic antioxidants, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). However, a decrease in nonenzymatic antioxidants, such as vitamin C and vitamin E, was observed in AMI patients when compared to control. These results suggest an increase in oxidative stress in AMI, which was probably a result of the ischemic/reperfusion moment, as well as a decrease of antioxidant defenses. Furthermore, the increased antioxidant defense may act as a compensatory mechanism in consequence of the overproduction of ROS after AMI. In conclusion, IHD results in oxidative and inflammatory damages as well as an increase in the organism defenses as a compensatory response.

Keywords: Ischemic heart disease; ectonucleotidases; cholinesterases; oxidative stress; antioxidants defenses

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Anatomia do Coração	24
Figura 2 - Isquemia Cardíaca	25
Figura 3 - Formação da placa aterosclerótica	34
Figura 4 - Representação de uma célula plaquetária.....	36
Figura 5 - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina	40
Figura 6 - Membros da Família das NTPDases	41
Figura 7 - Topografia de membrana de ectonucleotidases	42
Figura 8 - Estrutura das enzimas da família da Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP)	43
Figura 9 - Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana.....	45
Figura 10 - Mecanismo de hidrólise da acetilcolina.....	47
Figura 11 - Isoformas da enzima AChE	49
Figura 12 - Sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico aniônico	50
Figura 13 - Interação do substrato (ACh) com o sítio esterásico da AChE	51
Figura 14 - Detalhes da estrutura da BuChE.....	52
Figura 15 - Dano oxidativo a macromoléculas biológicas	54

ARTIGO 1

Figura 1- NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in platelets of ACS and SAP patients and control group.	62
Figura 2 - CD39 expression in platelets of ACS and SAP patients and control group analyzed by flow cytometry	63
Figura 3 - E-NPP activity in platelets of ACS and SAP patients and control group.....	63
Figura 4 - ADA activity in platelets of ACS and SAP patients and control group	63

MANUSCRITO 1

Figura 1 - Total blood AChE activity in control (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) groups	88
Figura 2 - Serum BuChE activity in control (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) groups	88
Figura 3 - Levels of hsCRP in control (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) groups	89
Figura 4 - Pearson's correlation between total blood AChE activity and hsCRP levels.....	89
Figura 5 - Pearson's correlation between total blood AChE activity and LDL-cholesterol levels.....	90

ARTIGO 2

Figura 1 - Carbonyl Protein content in serum of healthy control (CT), risk factor (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups.....	96
Figura 2 - TBARS levels in serum of healthy control (CT), risk factor (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups.....	97
Figura 3 - Catalase activity in total blood of healthy control (CT), risk factor (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups.....	97
Figura 4 - Superoxide dismutase activity in total blood of healthy control (CT), risk factor (RF) and acute myocardial infarction (AMI) groups	97

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Clinical characteristics and biochemical determinations in the control group (CT), and stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) patients.....	61
Tabela 2 - Platelet aggregation profile in the control group (CT) and stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) patients.....	64
Tabela 3 - Effects <i>in vitro</i> of acetylsalicylic acid (150 µM) and clopidogrel (10 µM) on platelet aggregation	64

MANUSCRITO 1

Tabela 1 - Clinical characteristics and cardiac biomarkers in control group (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) patients.	86
Tabela 2 - Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and glucose levels in control (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) groups.....	87

ARTIGO 2

Tabela 1 - Clinical characteristics and cardiac biomarkers of the healthy group, risk group and Acute Myocardial Infarction (AMI) patients.....	95
Tabela 2 - Comparison of nonenzymatic antioxidant levels between Acute Myocardial Infarction (AMI) patients, risk group and healthy group (means ± SEM).....	98

LISTA DE ABREVIACOES

AAS - cido Acetilsalicílico

ACh- Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

ADP- Adenosina Difosfato

AE - Angina Estável

AI - Angina Instável

AMP- Adenosina Monofosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

BuChE - Butirilcolinesterase

CAT- Catalase

CI - Cardiopatia isquêmica

CK- Creatinofosfoquinase

CK-MB - Creatinofosfoquinase, isoforma MB

DCV- Doenças Cardiovasculares

DAC – Doença Arterial Coronariana

DNPH - Dinitrofenilidrazina

EDTA – cido etilenodiaminotetracético

E-NPP- Ectonucleotideo pirofosfatase/fosfodiesterase

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

HDL- Lipoproteína de alta densidade

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

MDA – Malondialdeído

PCR- Proteína-C-Reativa

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

SCA - Síndrome Coronariana Aguda

SOD – Superóxido Dismutase

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloroacético

LISTA DE ANEXOS

1. Carta de aprovação pelo Comitê de Ética.....	134
2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	135

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	23
Objetivo Geral	23
Objetivos específicos	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 CORAÇÃO	24
3.2 CARDIOPATIA ISQUÊMICA	25
3.2.1 Angina Estável (AE)	26
3.2.2 Síndrome Coronariana Aguda (SCA)	26
3.2.3 Biomarcadores Cardíacos	27
3.3 EPIDEMIOLOGIA	28
3.4 FATORES DE RISCO	29
3.4.1 Sexo e idade	30
3.4.2 Tabagismo	30
3.4.3 Hipertensão	31
3.4.4 Hipercolesterolemia	31
3.4.5 Diabetes Mellitus	32
3.5 ATEROSCLEROSE	32
3.5.1 Determinação de risco	34
3.6 PLAQUETAS	35
3.6.1 Estrutura	35
3.6.2 Ativação plaquetária	36
3.6.3 Agregação plaquetária	37
3.6.4 Hemostasia	37
3.7 NUCLEOSÍDEOS E NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA	38
3.8 RECEPTORES PURINÉRGICOS	39
3.9 ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS	39
3.9.1 NTPDase	40
3.9.2 Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP)	43
3.9.3 Ecto- 5'-nucleotidase	44
3.9.4 Adenosina deaminase (ADA)	45

3.10 ENZIMAS QUE DEGRADAM ÉSTERES DE COLINA – AChE e BuChE.	46
.....	
3.10.1 Acetilcolina (ACh).....	46
3.10.2 Colinesterases.....	48
Acetilcolinesterase (AChE).....	48
Butirilcolinesterase (BuChE).....	51
3.10.3 Colinesterases e processo inflamatório.....	52
3.11 ESTRESSE OXIDATIVO.....	53
3.11.1 Indicadores de dano oxidativo.....	54
Lipoperoxidação.....	54
Oxidação protéica.....	55
3.11.2 Defesas antioxidantes.....	55
Antioxidantes enzimáticos.....	56
Antioxidantes não-enzimáticos.....	56
4. ARTIGOS E MANUSCRITOS.....	59
4.1 Artigo 1 - Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease.....	59
4.2 Manuscrito 1 - Association between cholinesterase activities and inflammation in patients with Isquemic Heart Diseases (IHD).....	66
4.3 Artigo 2- Oxidative Stress versus Antioxidant Defenses in Patients with Acute Myocardial Infarction.....	92
5. DISCUSSÃO.....	102
6. CONCLUSÕES.....	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8. ANEXOS.....	134

1. INTRODUÇÃO

A cardiopatia isquêmica (CI) é uma das principais doenças cardiovasculares no mundo. Ela é responsável por um grande número de mortes e altos custos econômicos nos países desenvolvidos (LIBBY et al., 2010). Nas últimas décadas, com a urbanização dos países em desenvolvimento, essa patologia tem se tornado uma das principais causas de internações e aumento nos gastos para os hospitais públicos (GUIMARÃES et al., 2006; LIBBY et al., 2010). Dados estatísticos projetam que até 2020 a CI seja a principal causa de morte no mundo (KASPER et al., 2006).

Os pacientes com CI são classificados em dois grandes grupos: os com angina estável (AE) e os com síndrome coronariana aguda (SCA). Esse último grupo compõe-se dos pacientes que apresentam infarto agudo do miocárdio (IAM) e angina instável (AI) (KASPER et al., 2006). O termo “isquemia” refere-se à falta de oxigênio, secundária à perfusão inadequada do miocárdio, que gera desequilíbrio entre a oferta e a demanda deste gás. A causa mais comum de isquemia miocárdica é a doença aterosclerótica obstrutiva das artérias coronárias, causada por ruptura ou ulceração da placa ateromatosa e consequente formação de trombo (KASPER et al., 2006; CHOI et al., 2009; LIBBY et al., 2010).

As plaquetas são importantes componentes do sangue que participam na regulação dos processos tromboembólicos por liberação de substâncias ativas, como os nucleotídeos de adenina ATP e ADP (ALTMAN et al., 1995; MARCUS et al., 2003). É bem conhecido que concentrações micromolares de ADP são suficientes para induzir a agregação plaquetária, enquanto a adenosina (o produto final da hidrólise do ATP) pode inibir a agregação plaquetária (BAKKER et al., 1994). O ATP é considerado um inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP, embora evidências indiquem a existência de mecanismos não competitivos e demonstrem que o ATP em altas ou baixas concentrações modula diferentemente a agregação plaquetária, ou seja, em baixas concentrações ele induz a agregação plaquetária, enquanto que em altas concentrações ele provoca a inibição deste fenômeno (LÉON et al., 1997).

Cada nucleotídeo, uma vez presente no meio extracelular, desempenha sua ação pela ligação a um tipo diferente de receptor. Sabe-se que cada célula responsável por liberar esses nucleotídeos possui receptores do tipo P2X e P2Y (ROBSON et al., 2006; YEGUTKIN, 2008). Uma vez exercidos seus efeitos, as moléculas de nucleotídeos devem ser degradadas de modo a manter seus níveis em concentrações fisiológicas. Para isso existe uma ampla classe de proteínas catalíticas ancoradas à membrana as quais contém seu sítio ativo voltado para o meio extracelular e efetuam a degradação desses nucleotídeos (ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN, 2007).

A hidrólise dos nucleotídeos extracelulares da adenina ocorre pela ação de enzimas denominadas de ectonucleotidases como, por exemplo, a Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDase, CD39, apirase, EC 3.6.1.5), a Ecto-Nucleotídeo Pirofosfato/ Fosfodiesterase (E-NPP, EC 3.1.4.1) e a Ecto-5'-Nucleotidase (CD73, EC3.1.3.5). A NTPDase e a E-NPP são enzimas responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP, formando AMP, que será metabolizado pela enzima 5'-Nucleotidase formando a adenosina (ROBSON et al., 2006; YEGUTKIN, 2008). Posteriormente, a adenosina é convertida pela enzima Adenosina Deaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4) em inosina e hipoxantinas (SPYCHALA, 2000; ROBSON et al., 2006). Pode-se prever a importância dessas enzimas na trombaregulação, já que os nucleotídeos ATP, ADP e o nucleosídeo adenosina atuam em purinoreceptores e são responsáveis pela regulação do tônus vascular e da função plaquetária (PILLA et al., 1996). Além de seu papel na trombaregulação, estudos têm demonstrado que a adenosina apresenta um importante papel fisiológico na limitação da inflamação (HASKO & CRONSTEIN, 2004).

Outra importante molécula que recentemente tem-se estudado suas propriedades anti-inflamatórias é a acetilcolina (ACh) (DAS, 2007; RAO et al., 2007; ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009). A ACh é sintetizada por fibras pré-ganglionares do sistema nervoso simpático e parassimpático do sistema nervoso autônomo e por fibras parassimpáticas pós-ganglionares. Até recentemente, os neurônios eram a única fonte identificada de ACh. Sabe-se agora, que outras células além dos neurônios expressam as proteínas necessárias para o metabolismo da ACh. A ACh é sintetizada, entre outros, por células do sistema imunológico (linfócitos, células dendríticas, neutrófilos)

(KAWASHIMA et al., 2007; NEUMANN et al., 2007), e células endoteliais (KAWASHIMA et al., 1990). É possível que a acetilcolina proveniente destas fontes esteja envolvida na modulação do processo inflamatório local (ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009). No entanto, a ACh é rapidamente hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) nas sinapses neuronais e placa motora terminal. Além da AChE, a enzima butirilcolinesterase (BuChE) também é capaz de hidrolisar ésteres de colina. Considerando o efeito inflamatório supressor da ACh acredita-se que a atividade da AChE e da BuChE possa ser um regulador intrínseco da inflamação (DAS, 2007; ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009).

Na CI após o evento da isquemia tem-se uma fase de reperfusão (TOPOL, 2000). Neste momento Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são produzidas (KASPAROVA et al., 2005). A alta produção de EROs é responsável por várias ações deletérias, tais como aumento nos níveis de peroxidação de lipídios de membranas, aumento na carbonilação de proteínas e até danos ao DNA intracelular, o que em última instância altera e prejudica o metabolismo intracelular, podendo causar morte celular (VALKO et al., 2006).

As proteínas são as primeiras moléculas biológicas a sofrer com a produção excessiva de EROs. A carbonilação protéica parece ser um fenômeno comum durante a oxidação e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão da modificação oxidativa (DALLE-DONNE et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

O aumento da peroxidação lipídica é uma consequência do estresse oxidativo o qual ocorre quando o balanço dinâmico entre o mecanismo pró- e antioxidante está em desequilíbrio (LEOPOLD & LOSCALZO, 2009).

Entretanto, o organismo possui vários sistemas de defesa antioxidante que atuam na detoxificação das EROs de formas diferenciadas. Há evidências que enzimas antioxidantes como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) podem proteger contra as EROs que são produzidas durante a isquemia (VALKO et al., 2007). O balanço entre a atividade da SOD e da CAT nas células é de fundamental importância na determinação do equilíbrio dos níveis de peróxido de hidrogênio e radicais superóxido. A SOD elimina radicais superóxidos por conversão desses em peróxido que podem ser transformados pela atividade da enzima CAT em água e oxigênio molecular (MATTES, 2000).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, possuem grande relevância os antioxidantes não enzimáticos. Dentre estes antioxidantes podemos citar as vitaminas E e C (VALKO et al., 2007).

A vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como neutralizante dos oxidantes produzidos, limitando a lipoperoxidação (DELANTY et al., 1997). Outro mecanismo proposto para a vitamina E é sua ação na inibição das proteínas quinases, prevenindo assim o desenvolvimento de lesão aterosclerótica (AZZI et al., 1995; BARREIROS et al., 2006). Somando-se as ações da vitamina E, o ácido ascórbico ou vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que tem a habilidade de regenerar α -tocoferóis (FREI et al., 1989) e neutralizar diretamente as EROs (ROSS & MOLDEUS, 1991; NORDBERG & ARNER, 2001).

Vários estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram alterações nas enzimas que hidrolisam nucleotídeos da adenina, ésteres de colina e aumento nos níveis de estresse oxidativo em patologias como: diabetes e hipertensão (LUNKES et al., 2003; LUNKES et al., 2006), câncer (ARAÚJO et al., 2005; MALDONADO et al., 2008; MALDONADO et al., 2010), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2007), acidente vascular cerebral (CORRÊA et al., 2008), esclerose múltipla (SPANEVERELLO et al., 2010) e IAM (BAGATINI et al., 2008). Com o objetivo de dar continuidade ao estudo realizado em pacientes com IAM e expandir o estudo a outros grupos de pacientes com CI propõe-se a determinação da atividade das enzimas que atuam na hidrólise dos nucleotídeos da adenina, estudo da atividade das enzimas que degradam ésteres de colina e avaliação do perfil oxidativo na CI.

O diagnóstico e o tratamento das doenças cardiovasculares têm apresentado grandes avanços tecnológicos nos últimos anos com a introdução de novas terapias e novas técnicas diagnósticas na rotina médica. No entanto, apesar desses avanços ainda é alto o índice de óbitos precoces por doença arterial coronariana (DAC), portanto, o estudo dos mecanismos patofisiológicos dessa doença é de fundamental importância na busca de terapias mais efetivas que beneficiem os pacientes com CI.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a atividade de enzimas que degradam nucleotídeos de adenina e ésteres de colina e estudar o perfil oxidativo em pacientes com Cardiopatia Isquêmica (CI).

Objetivos Específicos

- Analisar a atividade das enzimas NTPDase, E-NPP, 5'-Nucleotidase e ADA em plaquetas de pacientes cardiopatas (pacientes com AE e SCA) e pacientes controles.
- Avaliar a agregação plaquetária no plasma rico em plaquetas desses pacientes.
- Avaliar os indicadores de processo inflamatório: perfil lipídico e proteína C-reativa em soro da população estudada.
- Estudar a atividade das enzimas AChE e BuChE em sangue total e soro desses pacientes.
- Determinar os indicadores do estresse oxidativo (TBARS e carbonilação protéica) em soro dos pacientes estudados.
- Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas (SOD e CAT) e não enzimáticas (vitamina E e vitamina C) em sangue total, plasma e soro desses pacientes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CORAÇÃO

O coração é um órgão muscular oco que se localiza no meio do peito, sob o osso esterno, ligeiramente deslocado para a esquerda. Em uma pessoa adulta, tem o tamanho aproximado de um punho fechado e pesa cerca de 400 gramas. O coração humano, como o dos demais mamíferos, apresenta quatro cavidades: duas superiores, denominadas átrios (ou aurículas) e duas inferiores, denominadas ventrículos. O átrio direito comunica-se com o ventrículo direito através da válvula tricúspide. O átrio esquerdo, por sua vez, comunica-se com o ventrículo esquerdo através da válvula bicúspide ou mitral. O coração bombeia o sangue para levar oxigênio e nutrientes às células do organismo de um lado, e, de outro, para o pulmão, que eliminará gás carbônico recebido das células. Funciona, portanto, como duas bombas em paralelo: uma bombeia sangue pobre em oxigênio e rico em gás carbônico do corpo para os pulmões; a outra bombeia sangue rico em oxigênio e pobre em gás carbônico dos pulmões para o corpo. Para funcionar adequadamente, as células musculares do coração necessitam de nutrientes e oxigênio que chegam pelo sangue que ele próprio bombeia. A irrigação do coração é feita pelas artérias coronárias (Figura 1) (SCHUNKE et al., 2007).

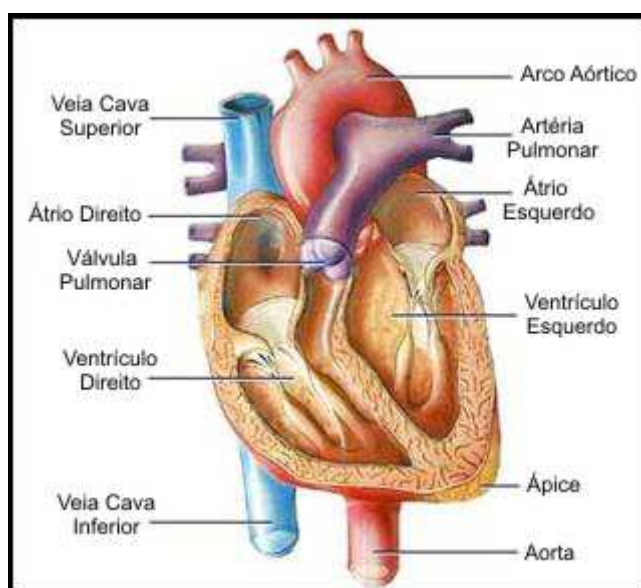


Figura 1- Anatomia do Coração (www.heart-vessels.com)

3.2 CARDIOPATIA ISQUÊMICA

O termo “isquemia” refere-se à falta de oxigênio secundária a perfusão inadequada do miocárdio, que gera desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio. A causa mais comum de isquemia miocárdica é a doença aterosclerótica obstrutiva das artérias coronárias (Figura 2) (KASPER et al., 2006; CHOI et al., 2009).

Os pacientes com CI são classificados em dois grandes grupos: os com angina estável (AE) e os com síndrome coronariana aguda (SCA). Esse último grupo compõe-se dos pacientes que apresentam angina instável (AI) e infarto agudo do miocárdio – IAM - (KASPER et al., 2006).

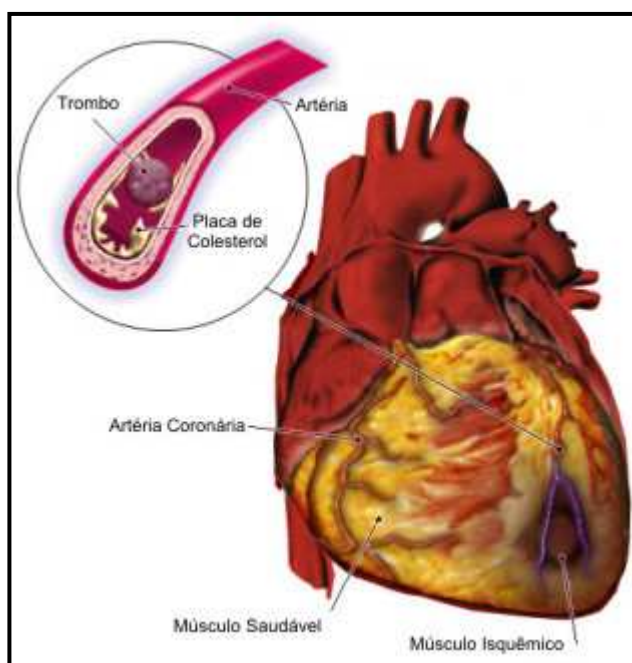


Figura 2 – Isquemia cardíaca (www.medicinenet.com)

Durante os episódios da perfusão inadequada causada pela aterosclerose coronariana, a pressão de oxigênio nos tecidos miocárdicos diminui, podendo causar distúrbios transitórios nas funções mecânicas, bioquímicas e elétricas do miocárdio. O súbito desenvolvimento de isquemia grave, como ocorre após a obstrução total ou subtotal das coronárias, está associado à falha quase instantânea da contração e relaxamento musculares normais. A isquemia de grandes áreas do ventrículo provoca insuficiência

ventricular esquerda transitória e, se os músculos papilares forem afetados, a insuficiência mitral poderá complicar esse processo. Quando a isquemia é transitória, pode estar associada à angina de peito; se for prolongada, poderá causar necrose e fibrose miocárdicas, com ou sem manifestações clínicas de IAM (KASPER et al., 2006; LIBBY et al., 2010).

3.2.1 Angina Estável (AE)

A AE ou angina crônica estável é uma síndrome isquêmica caracterizada por dor torácica, geralmente retroesternal ou na região precordial, desencadeada por esforço físico, refeições volumosas ou por estresse emocional, com duração de 30 segundos a 15 minutos, sendo aliviada pelo repouso ou uso de nitrato sublingual, e que não muda as características por pelo menos dois meses (KASPER et al., 2006; LIBBY et al., 2010).

A AE típica correlaciona-se com doença arterial coronariana (DAC) em 90% dos casos. Nos 10% restantes são múltiplas as causas, podendo, em alguns pacientes, ser difícil definir a etiologia. O mecanismo fundamental na AE é o desequilíbrio entre a oferta de oxigênio e as demandas metabólicas do miocárdio. Nestas condições, a ocorrência de dor é mais comum quando há súbito aumento da necessidade de oxigênio não suprido adequadamente em decorrência de alterações no fluxo coronário (PORTO, 2005).

3.2.2 Síndrome Coronariana Aguda (SCA)

O termo SCA é utilizado para se referir a pacientes que apresentam AI ou IAM (PORTO, 2005; KASPER et al., 2006).

A AI é definida como angina de peito ou desconforto isquêmico pelo menos com três manifestações: (1) ocorre em repouso (ou com esforço mínimo) e geralmente persiste por mais de 10 minutos, (2) é intensa e tem início recente e/ou (3) tem um padrão progressivo (ou seja, é nitidamente mais grave, prolongada ou freqüente do que antes) (KASPER et al., 2006). É uma condição clínica transitória, que pode evoluir para infarto, morte súbita, angina

estável crônica após estabilização do processo, ou recuperação completa (PORTO, 2005). Na maioria dos pacientes, a AI relaciona-se a uma coronariopatia aterosclerótica de grau importante, sendo causada pela interação entre a lesão ateromatosa e agregação plaquetária, espasmo coronariano e trombose que se associam de forma complexa (PORTO, 2005).

A maioria dos infartos ocorre quando o fluxo sanguíneo coronário diminui abruptamente depois da obstrução trombótica de uma artéria coronária previamente afetada pela aterosclerose. Na maioria dos casos, o infarto ocorre quando uma placa aterosclerótica sofre fissura, ruptura ou ulceração, de modo que um trombo forma-se na área de ruptura e leva à obstrução da artéria coronária (KASPER et al., 2006). Após a formação inicial de uma monocamada de plaquetas no local da placa rota, vários agonistas (colágeno, ADP, epinefrina, serotonina) promovem a ativação plaquetária, produção e liberação de tromboxano A₂. A ativação plaquetária pelos agonistas desencadeia uma alteração da conformação da glicoproteína IIb/IIIa que desenvolve alta afinidade pelo fator de von Willebrand (FvW) e fibrinogênio. A cascata de coagulação é ativada e por fim, a artéria coronária afetada torna-se ocluída por um trombo contendo agregados plaquetários e filamentos de fibrina (AZZAZY & CHRISTENSON, 2002; SHEBUSKI, 2002; APPLE et al., 2005; WU, 2005; KASPER et al., 2006; LIBBY et al., 2010). O diagnóstico de IAM será firmado se um paciente com manifestações clínicas de AI apresentar evidências de necrose miocárdica, refletida por elevações dos biomarcadores cardíacos (creatinofosfoquinase – CK total, isoenzima MB da CK – CKMB e troponinas) (JAFFE et al., 2006).

3.2.3 Biomarcadores cardíacos

Certas proteínas, denominadas marcadores cardíacos séricos, são liberadas no sangue em grandes quantidades, pelo miocárdio necrótico após o IAM. As taxas de liberação das diferentes proteínas variam segundo a sua localização intracelular e o seu peso molecular, bem como com o fluxo sanguíneo e linfático local (STEFANINI et al., 2004).

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

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

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

3.3 EPIDEMIOLOGIA

Apesar da amplitude das modernas estratégias preventivas e terapêuticas, as doenças cardiovasculares (DCV) ainda lideram a lista das

principais causas de morte mundial, responsáveis por aproximadamente 15 milhões de óbitos a cada ano e representam os mais altos custos em assistência médica (LOPEZ, 1993; MURRAY et al., 1996; HAJJAR et al. 2006; LIBBY et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2002 ocorreram 16,7 milhões de óbitos, dos quais 7,2 milhões foram de DAC (GUIMARÃES, 2006). Estima-se para 2020, que esse número possa se elevar a valores entre 35 e 40 milhões (GUIMARÃES, 2006). Seu crescimento acelerado em países em desenvolvimento representa uma das questões de saúde pública mais relevantes do momento (LIBBY et al., 2010).

Além do impacto sobre a mortalidade geral, as DCV são uma das maiores responsáveis pelo número de mortes e incapacidades precoces na população geral (ZAPPI et al., 2000). No Brasil, na década de 2000 a 2009, essas doenças foram responsáveis por 65% dos óbitos na população adulta em plena fase laboral (30 a 69 anos) e por 40% das aposentadorias precoces (NOGUEIRA et al., 2010), apresentando taxas maiores nas regiões Sul e Sudeste (ZAPPI et al., 2000).

Em 2001 nos Estados Unidos, 1.680.000 americanos foram internados e tiveram o diagnóstico confirmado de SCA. Destes 959.000 tiveram diagnóstico de IAM e 758.000 de AI, 37.000 receberam os dois diagnósticos. Em 2004, a estimativa de gastos diretos e indiretos com a DAC foi de cerca de 133,2 bilhões de dólares (PORTO, 2005).

3.4 FATORES DE RISCO

Os fatores de risco para CI podem ser divididos em duas categorias: fatores de riscos modificáveis (ambientais e comportamentais), como o tabagismo, colesterol sérico elevado, hipertensão arterial sistêmica, inatividade física, diabetes, obesidade, estresse mental, uso de anticoncepcional e obesidade abdominal; e fatores de risco não modificáveis (genéticos e biológicos), sendo estes, hereditariedade, sexo e idade avançada (POLANCZYK, 2005; HERRMANN et al., 2006).

Diversos fatores estão relacionados ao elevado risco cardiovascular, sendo assim, quanto maior o número de fatores de risco presente, maior será a

probabilidade de apresentar um evento cardiovascular. Da mesma forma, quanto melhor o controle dos hábitos de vida, com redução do número de fatores modificáveis associados, maior é a redução deste risco (BRAUWNWALD et al., 2003; LANAS et al., 2007).

3.4.1 Sexo e idade

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

3.4.2 Tabagismo

Além da idade avançada, o tabagismo é o fator de risco isolado mais importante para a DAC. O consumo de cigarros continua a ser o mais importante fator de risco modificável para a ocorrência de DAC e a principal causa prevenível de morte nos Estados Unidos, onde é responsável por mais de 450.000 óbitos anualmente (LIBBY et al., 2010).

Além dos efeitos desfavoráveis agudos sobre a pressão arterial e sobre o tônus simpaticomimético e uma redução na oferta miocárdica de oxigênio, o fumo afeta a aterotrombose através de vários outros mecanismos. Além de acelerar a progressão da aterosclerose, o tabagismo a longo prazo pode causar aumento na oxidação da LDL - colesterol e prejudicar a vasodilatação endotelial (KASPER et al., 2006). Um efeito adicional do tabagismo está associado à agregação plaquetária espontânea, aumento da adesão de monócitos às células endoteliais e alterações adversas de fibrinolíticos e antitrombóticos derivados do endotélio. Estudos têm sugerido que a resistência

à insulina representa um mecanismo adicional de ligação entre o tabagismo e a aterosclerose prematura (REAVEN & TSAO, 2003).

3.4.3 Hipertensão

A hipertensão é um dos principais fatores de riscos para DAC, independentemente de idade, sexo ou raça. A pressão arterial sanguínea, (tanto a sistólica quanto a diastólica), está correlacionada com a incidência de doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (LIBBY et al., 2010). Tem sido postulado que a pressão sanguínea excessivamente alta poderia danificar o endotélio e aumentar a permeabilidade do mesmo. Em adição, a hipertensão poderia estimular a proliferação de células musculares ou induzir a ruptura de placas ateroscleróticas. A presença de lesão em órgãos como o coração é acompanhado de um aumento do risco de doenças cardíacas (LAHOZ & MOSTAZA, 2007). Numerosas triagens clínicas têm demonstrado que um decréscimo na pressão arterial sistêmica está associado com uma redução significativa na incidência de acidente cerebral vascular e eventos cardíacos (HAIDER et al., 2003; NISSEN et al., 2004).

3.4.4 Hipercolesterolemia

A hipercolesterolemia é amplamente aceita como um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doença isquêmica cardíaca: angina e IAM (TAILOR & GRANGER, 2003; AL-SHAER et al., 2004; VIEIRA, 2005; BHATT et al., 2006). A visão atual de que a hipercolesterolemia contribui para as doenças cardíacas é baseada no fato de que a hipercolesterolemia, indiretamente, aumenta o risco de doenças cardiovasculares por estimular fatores de risco como hipertensão e resistência à insulina (LYRA & CAVALCANTI, 2006). Estudos indicam que altos níveis de colesterol, principalmente da LDL, desempenham um papel importante na aterogênese. As distorções no transporte do colesterol podem favorecer seu depósito na parede das artérias e vasos, contribuindo para o desenvolvimento da

aterosclerose (KRUTH, 2002). A aterosclerose é um processo inflamatório que está associado com a ativação de células endoteliais, com o estresse oxidativo e com o acúmulo de leucócitos na parede das artérias (ROSS, 1999; LUSIS, 2000; HANSSON & LIBBY, 2006; WEBER, et al., 2008). Além disso, estudos com ratos obesos, sugerem que a obesidade está associada à doença cardíaca também por promover depósitos de triglicérides em miócitos cardíacos, levando a esteatose de músculo cardíaco (LYRA & CAVALCANTI, 2006).

3.4.5 Diabetes Mellitus

Em relação ao *Diabetes Mellitus*, esse se constitui um importante fator para o desenvolvimento de doença cardiovascular, por interagir com outros fatores, como hipertensão e hiperlipidemia, os quais aumentam o risco (BOOTH et al, 2006). Além disso, pacientes com diabetes são conhecidos por ter alta propensão a doenças ateroscleróticas, uma das principais causas de IAM (LIBBY et al., 2010). Diabéticos coronariopatas têm placas ateroscleróticas mais vulneráveis, ou seja, com maior risco de ruptura de sua capa fibrosa, levando a uma maior incidência de DAC (LYRA & CAVALCANTI, 2006). Entretanto, o mecanismo pelo qual o diabetes aumenta o risco de doenças cardiovasculares não está totalmente entendido, mas estudos indicam que a hiperglicemia e o estado patológico criado no diabetes seriam os responsáveis pelo aumento do risco de doenças coronárias (TSCHOEPE et al., 1993; NATHAN et al, 2003).

3.5 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico da parede arterial, com depósitos de substâncias gordurosas, colesterol, restos celulares, plaquetas, fibrina e cálcio que levam a formação de placas enrijecidas e redução da elasticidade e da luz do vaso (ROSS, 1999; PORTO, 2005; KASPER et al., 2006). Pode ser observada desde a infância, mas o início das

manifestações clínicas ocorre geralmente na fase adulta. Afeta principalmente artérias de médio e grande calibre, como as coronárias, carótidas, cerebrais, renais, aorta abdominal, ilíacas, femorais, em regiões segmentares ou áreas de bifurcação (MEDEIROS et al. 2001; PORTO, 2005).

A CI é uma das manifestações mais importantes da doença aterosclerótica nos países industrializados, não somente por ser a causa mais comum de morte, como também incapacitar temporária ou definitivamente um grande número de indivíduos em idade produtiva (ROSS, 1999; KAUFFMAN, 2007; GALKINA et al., 2009).

O processo de aterosclerose inicia-se com a captação de LDL-colesterol pelo endotélio, sua internalização na íntima, e sua transformação na forma oxidada. Isso dá início ao processo de lesão vascular por ação direta, promovendo a atração de monócitos para o local, que se diferenciam em macrófagos. Estes por sua vez, fagocitam as moléculas de LDL-colesterol, promovem sua transformação em forma oxidada e a formação e a liberação de íons superóxidos, com adicional lesão vascular (FUSTER et al., 1992). A reação inflamatória local que advém da oxidação da LDL-colesterol ocasiona a destruição da base de apoio das células endoteliais, facilitando o aparecimento de áreas de microulcerações e conseqüente adesão plaquetária. A participação das plaquetas no processo acelera a reação via produção do fator de crescimento derivado de plaquetas, um mitógeno capaz de atrair mais células musculares lisas ao local, bem como outras células próprias da reação inflamatória (KAUFFMAN, 2007). A grande concentração de células musculares lisas tentando regenerar a estrutura subendotelial termina por aumentar os depósitos de proteínas da matriz extracelular como o colágeno, formando um ciclo vicioso de lesão endotelial e expansão celular, que culmina com a formação da placa fibrosa (Figura 3) (LUSIS, 2000; MEDEIROS et al., 2001; KAUFFMAN, 2007).

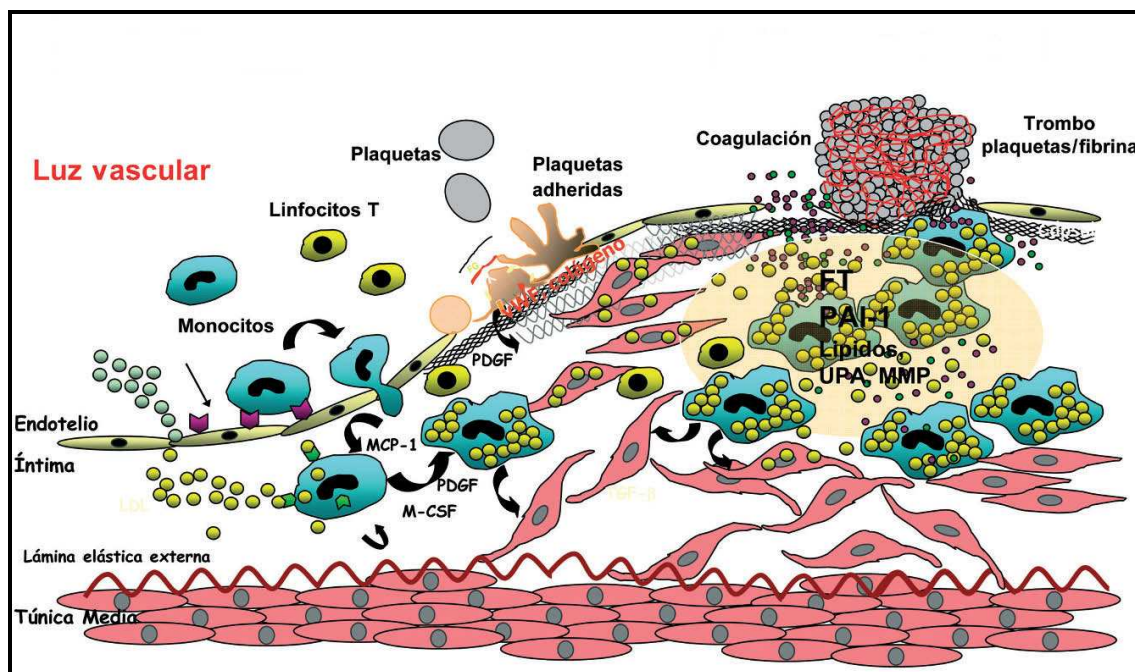


Figura 3 – Formação da placa aterosclerótica (Libby et al. 2010)

3.5.1 Determinação de risco

A doença aterosclerótica é acelerada em virtude de fatores genéticos, culturais e ambientais, sendo o diagnóstico precoce de fundamental importância para o tratamento e prevenção das complicações advindas do processo aterosclerótico (KAUFFMAN, 2007). Entre os marcadores bioquímicos destaca-se a medida da proteína-C-reativa (PCR). A PCR é uma proteína de fase aguda que serve com uma molécula de reconhecimento padrão do sistema imune inato, produzida no fígado em resposta ao aumento da interleucina -6 (IL-6). Inicialmente foi considerado um marcador inerte da inflamação vascular, mas resultados atuais sugerem que a PCR desempenha papel ativo na aterogênese e como marcador de DAC (DHINGRA, et al. 2007; CALABRÒ et al., 2009; FRAGOSO-LONA, et al. 2009).

Na prevenção primária, uma série de estudos epidemiológicos prospectivos demonstrou que a PCR quando medida com novas provas ultrasensíveis (PCR-us), prediz forte e independentemente o risco de IAM, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e morte súbita cardíaca mesmo entre indivíduos aparentemente saudáveis (LIBBY et al., 2010). Além

disso, os níveis de PCR-us foram capazes de discriminar melhor o risco do que o nível de LDL- colesterol (BOEKHOLDT et al., 2006).

3.6 PLAQUETAS

2.6.1 Estrutura

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariócitos, envolvidos por membranas e destituídas de núcleo. Apresentam-se heterogêneas sob aspecto morfológico, considerando tamanho, densidade e coloração (KRIZ et al. 2009; EYRE & GAMLIN, 2010). Ao microscópio eletrônico, as plaquetas apresentam-se como esferóides achatados nos pólos. Em condições normais e em esfregaços sangüíneos, as plaquetas apresentam-se discóides (BATLOUNI, 1993).

Nas plaquetas se reconhecem três zonas: (1) zona externa ou periférica que condiciona a propriedade de adesão. Nessa porção encontram-se antígenos, glicoproteínas e vários tipos de enzimas. Mais internamente existe a membrana plaquetária, onde estão localizadas glicoproteínas que são receptores específicos para determinados fatores de coagulação. (2) Uma zona sol-gel ou citosol com proteínas actinmiosina e tubulina, formando microtúbulos e microfilamentos, responsáveis pelo esqueleto da plaqueta. (3) Uma zona de organelas contendo corpúsculos densos (Ca^{2+} , ADP, ATP, Serotonina, Pirofosfato), grânulos alfa (fatores de crescimento, fatores de coagulação e proteínas de adesão) e um sistema de membrana, local de síntese de prostaglandinas e tromboxano A_2 (Figura 4) (WHITE, 2007).

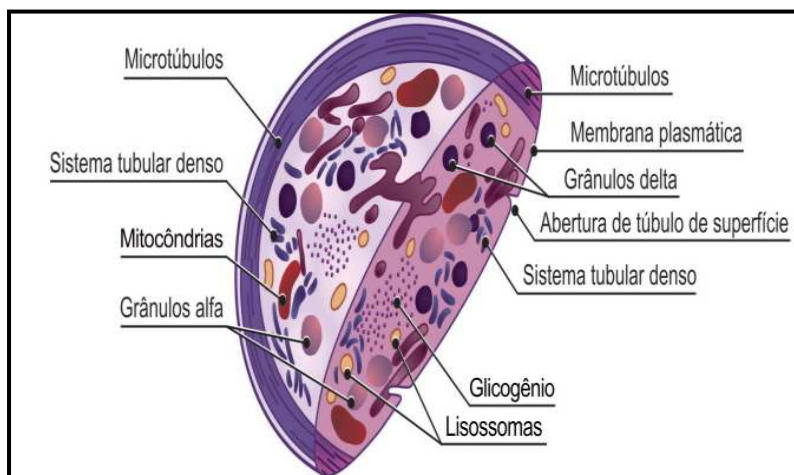


Figura 4: Representação de uma célula plaquetária (Lorenzi et al., 2003)

2.6.2 Ativação plaquetária

As plaquetas são liberadas do citoplasma dos megacariócitos medulares e passam à circulação, onde têm vida média de 8 a 10 dias (KRIZ et al., 2009). Durante esse tempo de sobrevivência, o seu metabolismo se baseia na liberação de energia, representada pela transformação do ATP em ADP, a partir da glicólise e do mecanismo oxidativo das mitocôndrias. Essa energia é utilizada para as funções básicas das plaquetas, que são a adesão, a agregação e a secreção de substâncias contidas nos grânulos citoplasmáticos (LORENZI et al., 2003).

Quando um vaso é lesado, o subendotélio, com o colágeno subjacente, é exposto e as plaquetas se ativam, iniciando-se uma série de fenômenos que tem por finalidade evitar a hemorragia (LORENZI et al., 2003). O primeiro sinal de ativação plaquetária é sentido na membrana externa, onde os fatores capazes de promover esta ativação como a trombina, a adrenalina, o colágeno e o ADP se ligam aos seus receptores específicos. A plaqueta modifica a sua forma que passa de discóide a irregular devido à emissão de pseudópodos a partir da membrana. A seguir, ocorre a ligação das plaquetas aos receptores das glicoproteínas e ativação das moléculas de integrinas plaquetárias levando ao processo de agregação plaquetária (MINORS, 2007; EYRE & GAMLIN, 2010).

2.6.3 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária ocorre devido à formação de pontes de fibrinogênio, pois este se liga ao receptor na membrana plaquetária, GP IIb/IIIa, que na presença do Ca^{2+} forma um complexo estável na superfície das plaquetas ativadas. Esse processo também ocorre devido ao metabolismo do ácido araquidônico, sendo o mesmo liberado a partir da membrana fosfolipídica das plaquetas pela ativação da enzima fosfolipase A_2 e, subseqüentemente, a enzima cicloxigenase (COX-1) converte o ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos. Esses são então convertidos pela tromboxano sintetase em tromboxano A_2 (TXA₂), funcionando como um potente agonista que induz a agregação (LORENZI et al., 2003; KRIZ et al., 2009). A amplificação e propagação contínua da agregação plaquetária é ativada pela formação de agregados plaquetários e a expulsão de ADP e de outras substâncias ativas das organelas plaquetárias (LEE et al., 1998).

2.6.4 Hemostasia

A principal função das plaquetas é a hemostasia, na qual elas desempenham atividade mecânica e bioquímica. As plaquetas aderem-se as estruturas subendoteliais expostas e tornam-se ativadas; ocorrendo a adesão plaquetária. Posteriormente, ocorre uma intensa atividade metabólica, havendo a síntese de mensageiros intracelulares e formação de agonistas plaquetários. Na seqüência as plaquetas sofrem transformações morfológicas, iniciando a formação de agregados plaquetários também denominados de rolhas, que vão constituir a barreira plaquetária inicial. A liberação de ADP e outras substâncias ativas amplificam o processo de ativação plaquetária. Segue-se a ativação com a liberação do fator 3 plaquetário e tem início o processo de coagulação sangüínea, promovendo à consolidação da rolha plaquetária pela fibrina e a conseqüente retração do coágulo (RAMASAMY, 2004; DAVÍ & PATRONO, 2007; EYRE & GAMLIN, 2010).

3.7 NUCLEOSÍDEOS E NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA

Os nucleotídeos extracelulares de adenina, adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e o nucleosídeo adenosina, modulam uma variedade de efeitos teciduais, que incluem o fluxo sanguíneo, a secreção, a inflamação, o tônus vascular e a função plaquetária (BURNSTOCK, et al., 2004). Os nucleosídeos são moléculas resultantes da união de uma base púrica ou pirimídica a uma pentose. Quando os nucleosídeos são fosforilados, por quinases específicas, ocorre a formação de um nucleotídeo (ATKINSON et al., 2006).

Os nucleotídeos são liberados no meio extracelular através de mecanismos como, por exemplo, a lise celular que ocorre frente à injúria celular. Também podem ser liberados por vesículas tais como os grânulos densos das plaquetas, que liberam o ATP e o ADP. A molécula de adenosina também pode ser liberada no meio extracelular como resultado da degradação do ATP e do ADP por enzimas específicas (HUNSUCKER et al., 2005; YEGUTKIN, 2008).

O ATP é um nucleotídeo presente em praticamente todas as células vivas e tem um papel fundamental no metabolismo energético (AGTERESCH et al., 1999). Juntamente com o ADP, o ATP também é liberado dos grânulos plaquetários no momento em que estas células sofrem o processo de ativação. O ATP tem um papel bifásico sobre a agregação das plaquetas: em baixas concentrações ele induz a agregação plaquetária, enquanto que em altas concentrações ele provoca a inibição deste fenômeno (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997). O ADP é reconhecidamente um agente indutor da agregação de plaquetas. Quando ocorre um evento que desencadeie a agregação plaquetária este nucleotídeo é liberado destas células e recruta novas plaquetas vindas da circulação de forma a amplificar o sinal agregatório (BAKKER et al., 1994).

A adenosina extracelular modula o tônus vascular e a função plaquetária além de apresentar uma ação cardioprotetora em episódios de isquemia ou hipóxia (MINAMINO et al., 1996). A função protetora da adenosina se manifesta pela vasodilatação coronariana e de vasos colaterais, aumentando o suprimento de oxigênio para os tecidos. Além disso, a adenosina é um ativador

endógeno do sistema de enzimas antioxidantes durante os processos de injúria e isquemia celular (MAGGIRWAR et al., 1994; RAMKUMAR et al., 1995).

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

3.8 RECEPTORES PURINÉRGICOS

Cada nucleotídeo, uma vez presente no meio extracelular, desempenha sua ação pela ligação a um tipo diferente de receptor localizado na superfície de vários tipos de células (YEGUTKIN, 2008). Esses receptores dividem-se em dois grupos: P2X e P2Y. P2X são receptores acoplados a canais iônicos com seus domínios carboxi e aminoterminal voltados para o meio intracelular e compreendem sete subtipos nomeados de P2X1-7 (DI VIRGILIO et al., 2001). P2Y são receptores acoplados a proteína G apresentando sete regiões transmembrana com a porção aminoterminal voltada para meio extracelular e a porção carboxiterminal voltada para o meio citoplasmático compreendendo 14 subtipos os quais foram nomeados de P2Y1-14 (YEGUTKIN, 2008). Os receptores para adenosina incluem quatro tipos: A1, A2A, A2B e A3, os quais são proteínas transmembrana acoplados a proteína G (HASKÓ et al., 2008; YEGUTKIN, 2008).

3.9 ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS DE ADENINA.

Uma vez exercidos seus efeitos, as moléculas de nucleotídeos e nucleosídeos devem ser degradadas de modo a manter seus níveis em concentrações fisiológicas. Para isso existe uma ampla classe de proteínas catalíticas (ectonucleotidases) ancoradas à membrana as quais contém seu sítio ativo voltado para o meio extracelular e efetuam a degradação destes

nucleotídeos (GODING & HOWARD, 1998; ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN et al., 2007). Dentre estas enzimas pode-se destacar as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase), a família das E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases), 5'-nucleotidase e a adenosina deaminase (ADA) (ROBSON et al., 2006; YEGUTKIN, 2008). Estas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP formando AMP (ZIMMERMANN et al., 2007). A seguir a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula de AMP formando adenosina, a qual posteriormente é degradada pela ação da ADA gerando inosina (Figura 5) (YEGUTKIN, 2008).

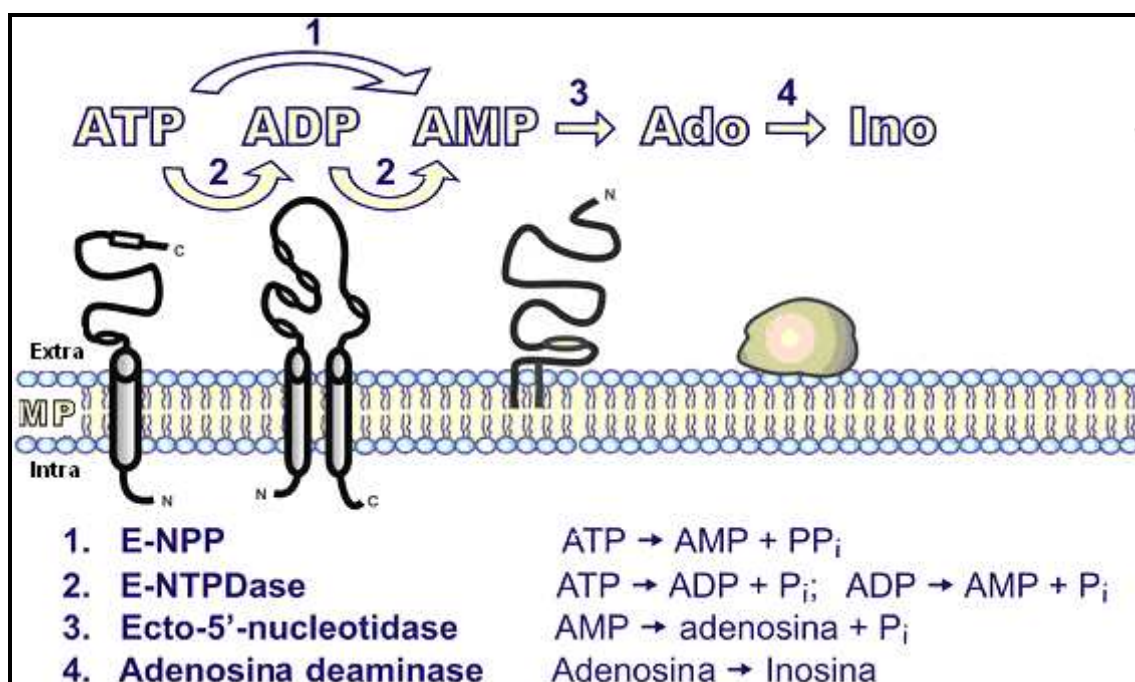


Figura 5 - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (adaptado de Yegutkin, 2008).

3.9.1 NTPDase

As NTPDases são uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN et al., 2007). Esta classe de enzimas inclui oito membros nomeados de NTPDase 1-8 que diferem quanto a especificidade por substratos, distribuição tecidual e localização celular. Quatro

destas enzimas estão localizadas na membrana celular com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (NTPDase 1, 2, 3 e 8) e quatro delas exibem localização intracelular (NTPDase 4, 5, 6 e 7) (Figura 6) (ROBSON et al., 2006), sendo que as NTPDases localizadas na superfície requerem Ca^{2+} ou Mg^{2+} para sua máxima atividade (ZIMMERMANN, 2001; KUKULSKI et al., 2005).

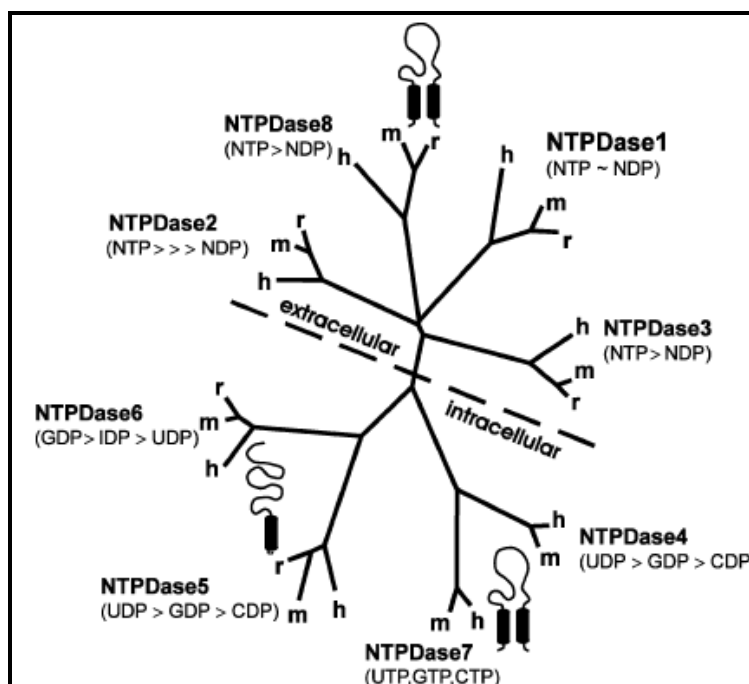


Figura 6 - Membros da Família das NTPDases (Robson et al., 2006)

Todos os membros da família das NTPDases apresentam 5 regiões denominadas regiões conservadas da apirase (ACRs), o que torna essa característica uma “marca” desse conjunto de enzimas. Essas ACRs são de muita relevância para sua atividade catalítica. Existem evidências sugerindo que as diferenças na preferência pelo substrato, nessa família de enzimas, podem ser atribuídas a pequenas diferenças na estrutura protéica que afetaria a ligação do substrato (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006).

A NTPDase-1 (E.C 3.6.1.5, CD39) foi a primeira enzima da família NTPDase a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxiterminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). Esta enzima hidrolisa tanto ATP como ADP

formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (Figura 7) (ZIGANSHIN et al., 1994).

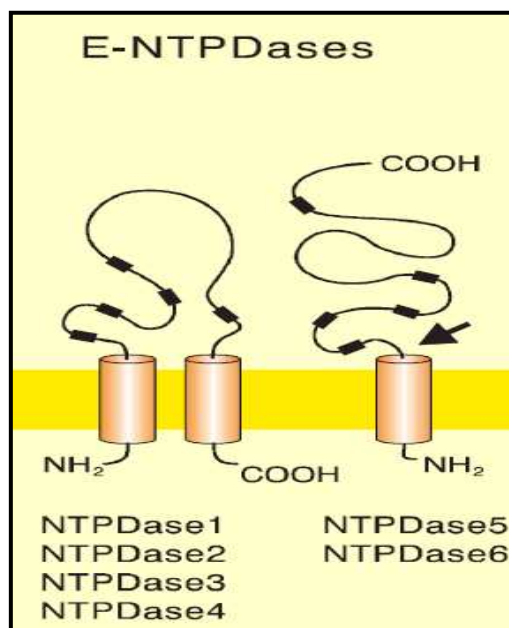


Figura 7 - Topografia de membrana de ectonucleotidasas (adaptado de Zimmermann, 2001)

Em relação ao “sistema vascular”, a NTPDase-1/CD39 desempenha um papel importante no sistema hemostático, uma vez que ela controla os efeitos pró-trombóticos e pró-inflamatórios de nucleotídeos como o ATP e o ADP (YEGUTKIN, 2008). A NTPDase-1, presente nas células endoteliais e membrana de plaquetas, converte o ATP em ADP e subseqüentemente o ADP, um nucleotídeo promotor da agregação, em AMP. A enzima 5'-nucleotidase converte o AMP formado em adenosina. A adenosina, por sua vez, tem propriedades vasodilatadoras e, portanto, antiagregantes (BAKKER et al., 1994; ZIMMERMANN, 2001). Com isso, a NTPDase-1 em combinação com a 5'-nucleotidase tem um papel crucial na desfosforilação sequencial destes nucleotídeos e conseqüentemente na proteção contra a ativação descontrolada de plaquetas. Alguns estudos indicam que o uso de CD39 solúvel se constitui num potencial agente terapêutico para inibição de processos trombóticos mediados por plaquetas. A solução purificada de CD39 bloqueou *in vitro* a agregação plaquetária induzida por ADP e inibiu a reatividade plaquetária induzida pelo colágeno (GAYLE III et al., 1998; ENJYOJI et al., 1999).

Além disso, nos últimos anos o papel destas enzimas tem sido avaliado em várias condições patológicas humanas como no diabetes (LUNKES et al., 2003), na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LEAL et al., 2005), no câncer (ARAÚJO et al., 2005; MALDONADO et al., 2010), no IAM (BAGATINI et al., 2008) e na esclerose múltipla (SPANNEVELLO et al., 2010).

3.9.2 Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP)

A família das E-NPPs é constituída por sete enzimas nomeadas de NPP1 até NPP7, sendo numeradas de acordo com sua ordem de descoberta (YEGUTKIN, 2008). Com exceção da NPP2, que é secretada no meio extracelular, todos os demais membros são ligados à membrana por um único domínio transmembrana. As NPP1 e 3 têm uma orientação transmembrana do tipo II, com sua porção aminoterminal voltada para o meio intracelular, enquanto que as NPPs 4-7 têm uma orientação do tipo I com sua porção aminoterminal voltada para o meio extracelular (Figura 8) (STEFAN et al., 2006).

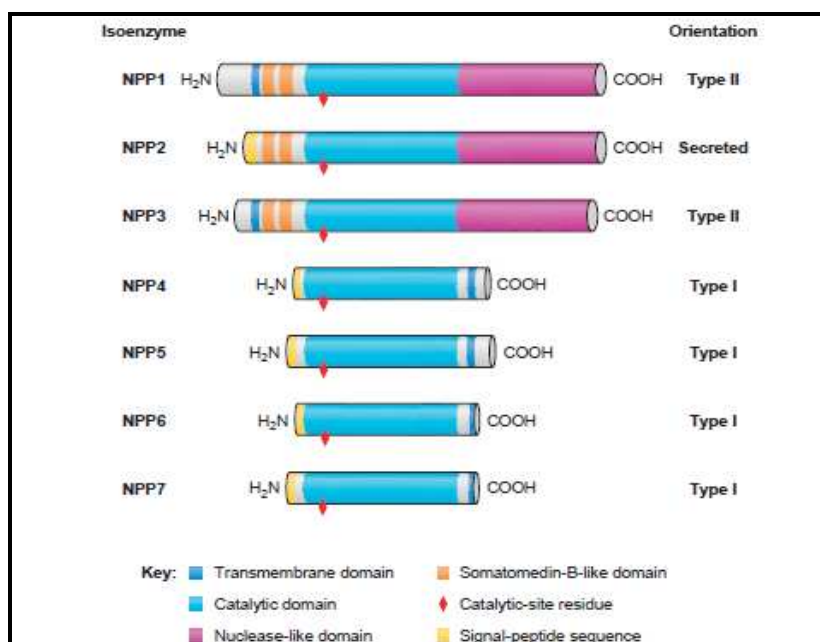


Figura 8 - Estrutura das enzimas da família da Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP) (Stefan et al., 2006).

As ecto-fosfodiesterases têm uma ampla especificidade, sendo responsáveis pela hidrólise de ligações pirofosfato e fosfodiéster de nucleotídeos e seus derivados, resultando na produção de nucleotídeos monofosfato (STEFAN et al., 2005). Entretanto somente as NPP1-3 são capazes de hidrolisar nucleotídeos e são, portanto relevantes no contexto da cascata de sinalização purinérgica (STEFAN et al., 2006; YEGUTKIN, 2008).

As E-NPPs possuem uma ampla distribuição tecidual o que lhe confere múltiplos papéis biológicos, incluindo reciclagem de nucleotídeos, modulação da sinalização purinérgica, regulação dos níveis de pirofosfato extracelular, proliferação e motilidade celular (STEFAN et al., 2005; STEFAN et al., 2006). Em vista de estas enzimas terem sido caracterizadas na membrana plaquetária e, devido ao fato de apresentarem propriedades catalíticas semelhantes à NTPDase, pressupõem-se que haja uma co-expressão da NTPDase, das E-NPPs e da 5'-nucleotidase nesta célula. Com isso, pode-se dizer que elas constituem uma cadeia enzimática responsável pela hidrólise extracelular de nucleotídeos (FÜRSTENAU et al., 2006).

3.9.3 Ecto- 5'-nucleotidase

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

A ecto-5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73) é uma glicoproteína ligada a membrana via um glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 9) que catalisa a hidrólise éster fosfórica do 5'-ribonucleotídeo para o correspondente ribonucleosídeo e fosfato. Ocorre na forma de dímero e seu peso molecular está na faixa de 62 a 74 kDa. (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER et al., 2005).

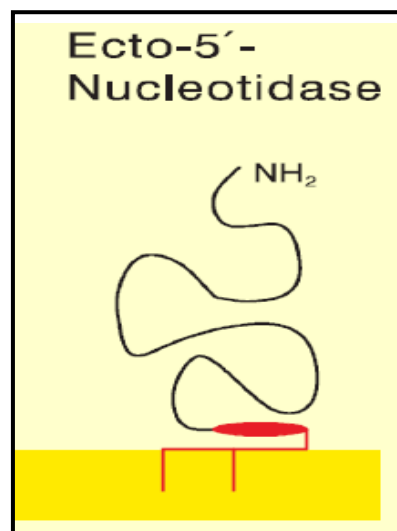


Figura 9 - Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana (adaptado de Zimmermann, 2001).

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

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

3.9.4 Adenosina deaminase (ADA)

A enzima Adenosina Deaminase (ADA) faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação seqüencial dos nucleotídeos e

nucleosídeos de adenina (YEGUTKIN, 2008). A ADA é responsável pela desaminação da adenosina com a consequente produção de inosina regulando assim, as concentrações extracelulares deste nucleosídeo (FRANCO et al., 1997).

Em humanos a ADA existe na forma de duas isoenzimas classificadas como: ADA1 e ADA2 (SHAROYAN et al. 2006). A ADA1 é uma proteína monômera com uma massa molecular de aproximadamente 40 kDa. A localização da ADA1 é principalmente citosólica, sendo encontrada em todo o organismo. Esta pode estar combinada com uma glicoproteína dimérica não específica de aproximadamente 200 kDa, designada como proteína combinante (cp) (TSUBOI et al., 1995). O complexo ADA-cp constitui uma ecto-ADA, a qual é responsável pelo controle dos níveis de adenosina extracelular (FRANCO et al., 1997). Estudos têm demonstrado que esta proteína de ligação é uma glicoproteína multifuncional do tipo II, conhecida como CD26, a qual pode ser encontrada solúvel ou ligada à membrana (YEGUTKIN, 2008). Além da interação com CD26, a ADA1 pode atuar como uma ecto-enzima ancorada aos receptores da adenosina A1 e A2b, mediando os processos de sinalização da adenosina (ROMANOWSKA et al., 2007).

Diferentemente da ADA1, a ADA2 apresenta diferenças tanto estruturais quanto cinéticas. Sua massa molecular é de aproximadamente 100 kDa e representa a menor parte da atividade da ADA em tecidos, sendo abundante no plasma. Além disso, a ADA2 tem menor afinidade para a adenosina e menor atividade catalítica com a deoxiadenosina que a ADA1 (IWAKI-EGAWA et al., 2006).

3.10 ENZIMAS QUE DEGRADAM ÉSTERES DE COLINA – AChE E BuChE.

3.10.1 Acetilcolina (ACh)

A acetilcolina (ACh) foi a primeira substância encontrada e definida como um neurotransmissor (LOEWI, 1921). A ACh é sintetizada pela colinacetiltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6) a partir da colina, um importante

produto do metabolismo dos lipídios da dieta, e acetil-CoA, um produto do metabolismo celular (SOREQ & SEIDMAN, 2001; PRADO et al., 2002). Após sua síntese é carregada até as vesículas sinápticas pelo transportador vesicular da acetilcolina onde fica armazenada até a sua liberação (RAND, 2007). Depois de ser liberada, a ACh se difunde na fenda sináptica e ativa os receptores de ACh (AChRs), posicionados nas células pós sinápticas. A ACh é amplamente distribuída no SNC, onde seus efeitos são principalmente excitatórios, efetivados pela ativação de receptores específicos, designados como receptores colinérgicos e, subdivididos em dois grandes grupos: nicotínicos e muscarínicos, que transmitem os sinais por mecanismos diferentes (RANG et al., 2004). A ação da ACh é finalizada pela sua hidrólise enzimática na fenda sináptica pela enzima acetilcolinesterase (AChE). A colina liberada é, em parte recaptada para o terminal pré-sináptico, através de um mecanismo de recaptação de alta afinidade (SOREQ & SEIDMAN, 2001) onde poderá ser reutilizada para a síntese de novas moléculas de ACh (Figura 10).

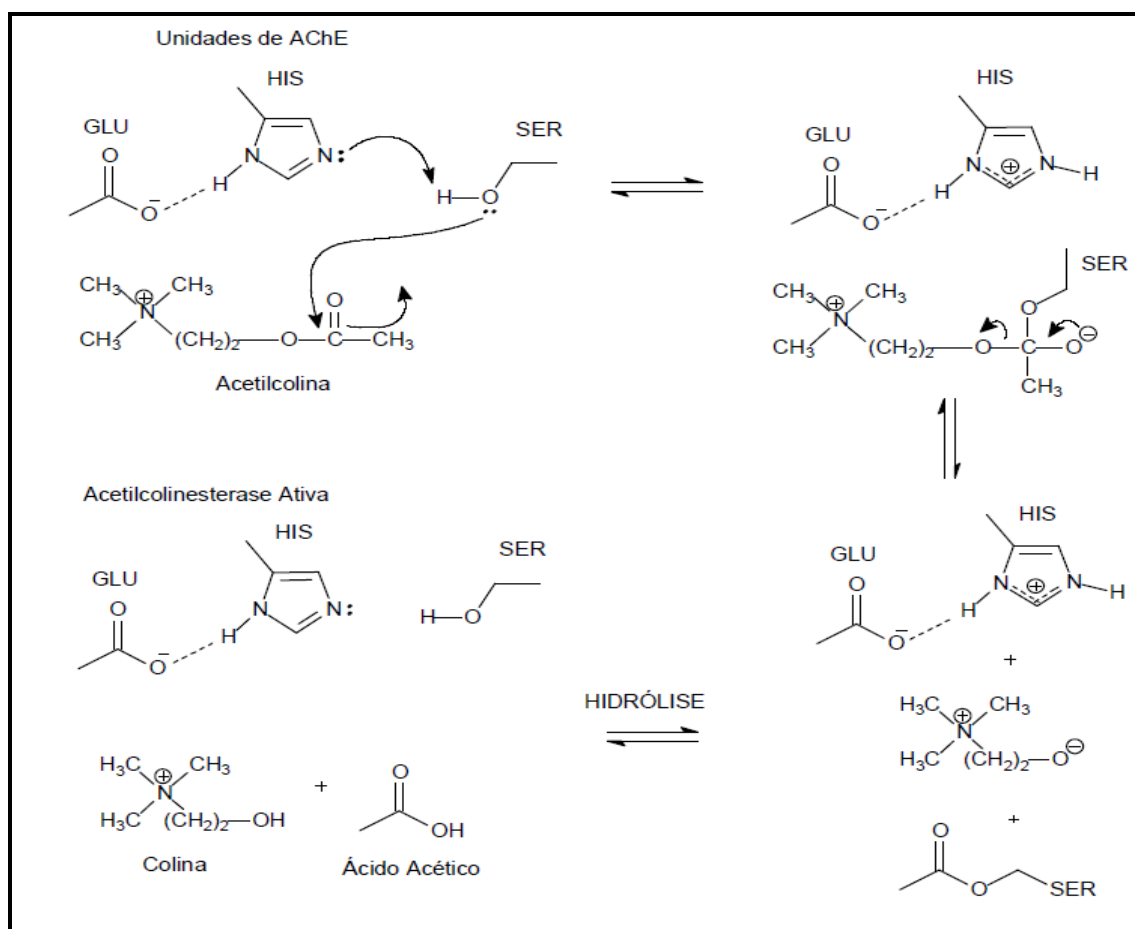


Figura 10 – Mecanismo de hidrólise da acetilcolina (adaptado de Santos et al., 2007)

Até recentemente, os neurônios eram a única fonte identificada de ACh. Sabe-se agora que outras células além dos neurônios expressam as proteínas necessárias para o metabolismo da ACh. A ACh é sintetizada, entre outros, por células do sistema imunológico (linfócitos, células dendríticas, neutrófilos) (KAWASHIMA et al., 2007; NEUMAN et al., 2007) e células endoteliais (KAWASHIMA et al., 1990). É possível que a ACh proveniente destas fontes esteja envolvida na modulação do processo inflamatório local (ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009). Esta via “colinérgica anti-inflamatória” mediada pela ACh, atua inibindo a produção de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e suprime a ativação da expressão do fator nuclear kappa-B (NF-κB) (BOROVIKOVA et al., 2000).

3.10.2 Colinesterases

Existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE; E. C. 3.1.1.7) ou colinesterase verdadeira, que hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a ACh) e a butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BuChE; E.C. 3.1.8) que hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989; NICOLET et al., 2003; WHITTAKER, 2010). A AChE é predominantemente encontrada no cérebro (10 vezes mais abundante que a BuChE), junção neuromuscular e eritrócitos (COKUGRAS, 2003). Já a BuChE é principalmente encontrada no plasma, rins, fígado, intestino, coração, pulmão e têm uma distribuição neuronal muito mais restrita do que a AChE (MESULAM et al., 2002).

Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE existe nas formas globular e assimétrica. A forma globular é composta por monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4) da subunidade catalítica. A forma G1 é citosólica e a G4 é ligada à membrana, sendo esta última a mais encontrada no tecido nervoso (DAS et al., 2001; ALDUNATE et

al., 2004). Em sangue humano, a AChE é encontrada tanto nos eritrócitos quanto no plasma, onde predominam as formas G2 e G4, respectivamente (RAKONCZAY et al. 2005). Já a forma assimétrica consiste de um (A4), dois (A8) e três (A12), tetrâmeros catalíticos ligados covalentemente a uma subunidade estrutural colagênica chamada Q (ColQ). Essas formas estão associadas com a lâmina basal e são abundantes na junção neuromuscular (Figura 11) (ALDUNATE et al., 2004).

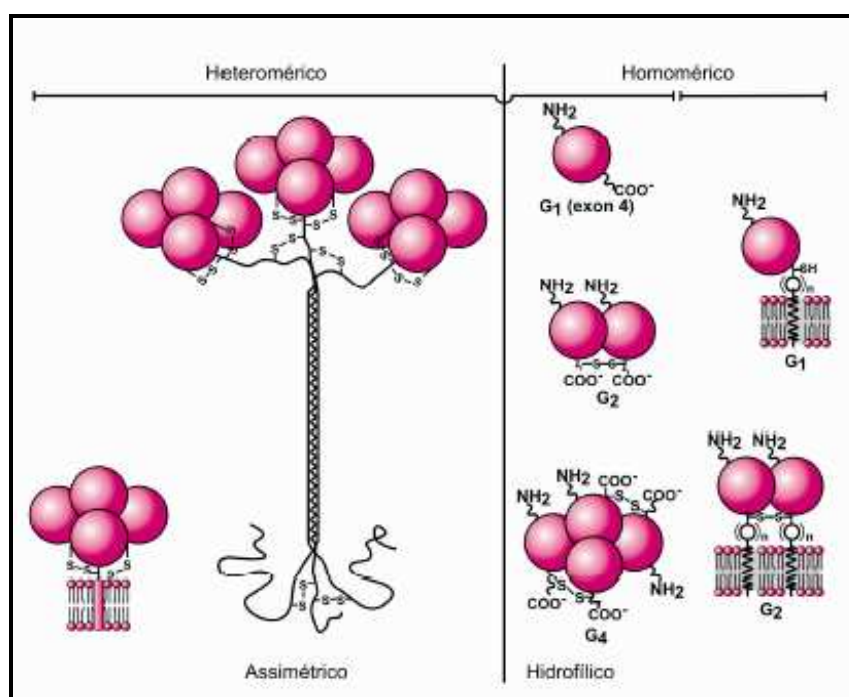


Figura 11 - Isoformas da enzima AChE (www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm)

O sítio ativo da AChE situa-se na parte inferior de um estreitamento semelhante a uma garganta (gorge) a 20 Å de profundidade, alinhado com resíduos hidrofóbicos, os quais parecem ser importantes na orientação do substrato ao sítio ativo (JOHNSON & MOORE, 1999). Este sítio ativo é formado por um sítio esterásico que contém uma tríade catalítica formada pela serina, histidina e glutamato ou aspartato e um sítio aniônico ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh, carregada positivamente, se liga (Figura 12) (SILMAN et al., 1994; DVIR et al., 2010). Na borda ou superfície do gorge, cerca de 14 Å do sítio ativo, situa-se um segundo sítio aniônico que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (peripheral anionic site - PAS), o qual

foi proposto com base na ligação de compostos bis quartenários (BOURNE et al., 2005; SILMAN & SUSSMAN, 2008).

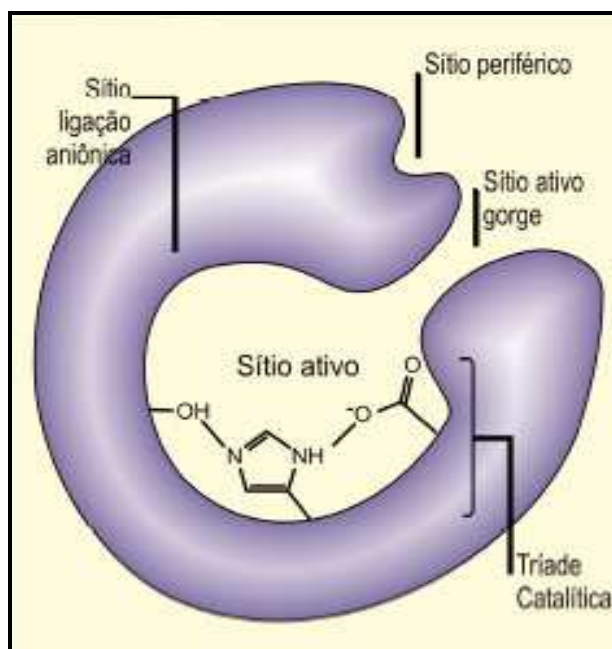


Figura 12 - Sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico aniônico (PAS). (adaptado de Soreq & Seidman, 2001)

Para a catalise enzimática existem duas importantes áreas a serem consideradas: a região de ligação e acomodação do substrato onde a ACh se liga à AChE por ligação iônica a um resíduo de aspartato ou glutamato e a ligação do hidrogênio ao resíduo de tirosina (Figura 13). A outra região é responsável pelo mecanismo de hidrólise do substrato ACh, composta pelos aminoácidos serina e histidina. O processo enzimático é extraordinariamente eficiente por causa da proximidade do nucleófilo serina e a catálise ácido/básica da histidina, sendo que uma molécula da ACh é hidrolisada em 100 microsegundos (PATRICK, 2001; SILMAN & SUSSMAN, 2005).

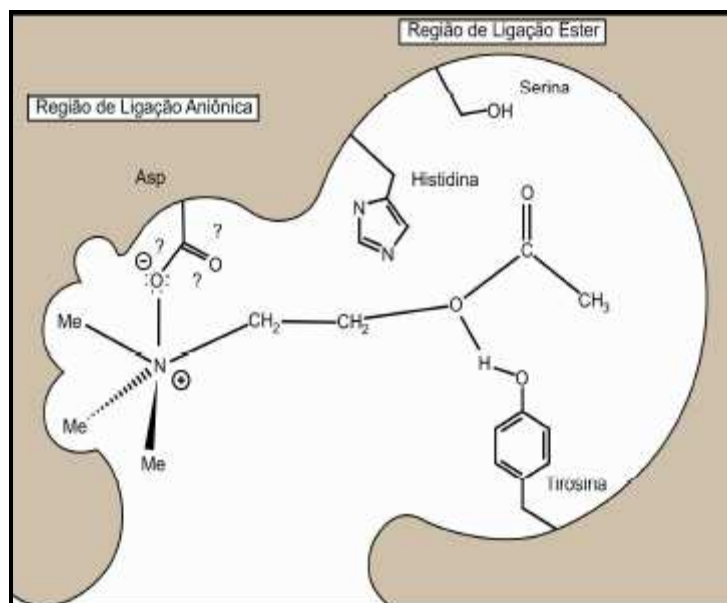


Figura 13 - Interação do substrato (ACh) com o sítio esterásico da AChE.
(adaptado de Patrick, 2001)

Butirilcolinesterase (BuChE)

Para a BuChE humana HARRIS e cols. (1962) encontraram quatro bandas, em eletroforese de gel de amido, que foram chamadas de C1 a C4 em ordem decrescente de mobilidade. Estudos posteriores mostraram que C1 corresponde ao monômero, C3 ao dímero e C4 ao tetrâmero (MUENSCHE et al., 1976). A banda C2 é resultado da ligação do monômero à albumina (MASSON, 1989).

A forma predominante e de maior atividade da BuChE no plasma é o tetrâmero, constituído por um dímero de subunidades idênticas. As subunidades de cada dímero estão unidas por uma ligação dissulfeto e os dímeros unem-se através de forças hidrofóbicas não covalentes. Cada monômero é uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos, com 9 cadeias de carboidratos ligadas a 9 asparaginas (ALTAMIRANO & LOCKRIDGE, 2000). As cadeias de carboidratos parecem não interagir com moléculas do substrato, pois estariam distantes da entrada do sítio esterásico (MILLARD & BROOMFIELD, 1992) localizado no interior da molécula e ligado ao exterior por um túnel, cuja tríade catalítica seria formada por serina na posição 198, ácido glutâmico em 325 e histidina em 438 (MASSON et al., 2001; NICOLET et al, 2003) (Figura 14).

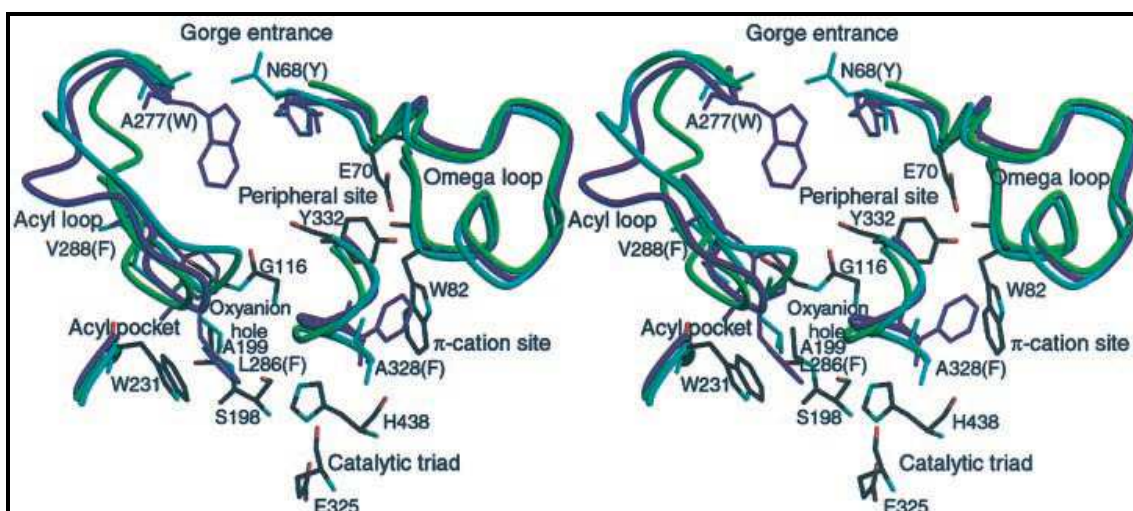


Figura 14 – Detalhes da estrutura da BuChE (adaptado de NICOLET et al., 2003)

3.10.3 Colinesterases e processo inflamatório

Estudos recentes demonstram que a acetilcolina, o principal neurotransmissor vago, tem importantes ações anti-inflamatórias (DAS, 2007; RAO et al., 2007; ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009).

No entanto, a ACh, bem como outros ésteres de colina são rapidamente hidrolisados pela AChE e BuChE (HOSEA et al., 1995; MESULAM et al., 2002). Um aumento nas atividades das enzimas AChE e BuChE poderia levar à diminuição dos níveis de ACh, reduzindo seus efeitos anti-inflamatórios, devido à ausência do controle de feedback negativo exercido pela ACh (RAO, et al., 2007). Dessa forma considerando o efeito inflamatório supressor da ACh, é concebível que as atividades das enzimas AChE e BuChE sejam reguladoras intrínsecas da inflamação (DAS, 2007; ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009).

Estudos recentes têm demonstrado o papel desempenhado pelas colinesterases como moduladores do processo inflamatório em pacientes com diabetes e doença de Alzheimer (DAS, 2007; RAO et al., 2007). Além disso, estudos de nosso laboratório mostraram um envolvimento da AChE, sistema imune e processo inflamatório em patologias como diabetes (LUNKES et al., 2006), acidente vascular cerebral (CORREA, et al. 2008) e leucemia linfoblástica aguda (BATTISTI et al., 2009).

3.11 ESTRESSE OXIDATIVO

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

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

As EROs como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion hidroxil ($\cdot OH$) e outros oxidantes podem ter diferentes efeitos deletérios no coração (TAKANO et al., 2003; ZHAO, 2004; GHOSH et al., 2005). Os efeitos mais comumente reconhecidos do aumento do estresse oxidativo é a oxidação e o dano a macromoléculas como proteínas, lipídios e DNA (Figura 15), contribuindo assim para o dano celular e aceleração da morte celular através da apoptose e necrose (GIORDANO, 2005; VALKO et al., 2006).

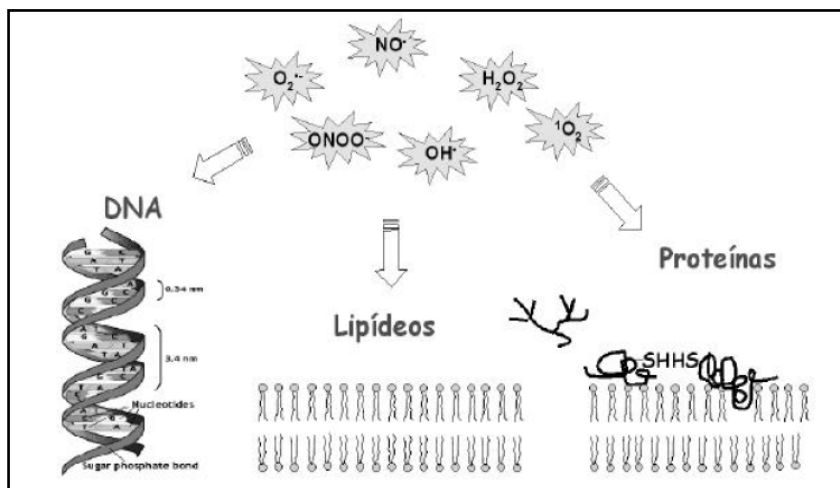


Figura 15 - Dano oxidativo a macromoléculas biológicas (Torres, 2003).

2.11.1 Indicadores de dano oxidativo

Lipoperoxidação

O dano aos lipídios induz o fenômeno conhecido como lipoperoxidação, o qual culmina na formação de malondialdeído (MDA), hidroxinonenal (HNE) e isoprostanos (VASCOCELOS et al., 2007; LEOPOLD & LOSCALZO, 2009). Um dos mais conhecidos produtos da lipoperoxidação é o MDA, o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados (ALEXANDROVA & BOCHEV, 2005; CHERUBINI et al., 2005; VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). Altos níveis de MDA elevam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da lipoperoxidação (KASHYAP et al., 2005).

As membranas são compostas principalmente de fosfolipídios e proteínas. Alterações nos lipídios de membrana por EROs estão entre os principais efeitos relacionados ao momento de isquemia e reperfusão que ocorre na CI. Com isso, há perda da seletividade na troca iônica e da liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e a formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (LAZZARINO et al., 1994; PARK & LUCCHESI, 1999; MAREZIN et al., 2003).

Oxidação protéica

As proteínas são consideradas o maior alvo para o dano oxidativo, uma vez que são os maiores componentes dos sistemas biológicos e podem neutralizar 50-75% dos radicais reativos. A oxidação das proteínas é uma modificação covalente induzida tanto diretamente pelas EROs quanto indiretamente por reação com produtos secundários do estresse oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

O conteúdo de proteína carbonil é um bom biomarcador de dano oxidativo grave das proteínas (DALLE-DONNE et al., 2003). Uma vez formados, os grupos carbonil são quimicamente estáveis, o que facilita tanto o seu armazenamento quanto a sua detecção (DALLE-DONNE et al., 2003). A acumulação de proteína carbonil tem sido observada em diversas doenças humanas incluindo as doenças cardíacas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; MALDONADO et al., 2006; CORREA et al., 2008, BATTISTI et al., 2008).

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

2.11.2 Defesas antioxidantes

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração, comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (HALLIWELL, 2007). Esta definição engloba compostos de natureza enzimática e não enzimática (VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

Antioxidantes enzimáticos

O sistema antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e a glutaciona peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutaciona como co-fator (VALKO et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2007; LEOPOLD & LOSCALZO, 2009).

A função da SOD foi descoberta em 1969 por McCord & Fridovich, o que propiciou um grande avanço das pesquisas na área de toxicidade do oxigênio. Esta enzima está presente em todos os organismos aeróbicos e catalisa a dismutação do radical superóxido. Existem três classes de superóxido dismutase: Fe-SOD, CuZn-SOD e Mn-SOD. A CuZn-SOD e a Mn-SOD encontram-se em eucariotos e a Fe-SOD, apenas em procariotos. A SOD dependente de cobre e zinco encontra-se no citoplasma celular e nos fluidos extracelulares, onde é secretada pelas células endoteliais. A Mn-SOD é uma enzima mitocondrial tetramérica, apresentando um átomo de manganês por subunidade (SEIZI, 2003).

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

Antioxidantes não-enzimáticos

Dentre os antioxidantes não-enzimáticos de baixo peso molecular, podem ser destacados os carotenóides, a ubiquinona e o ácido úrico, porém as mais importantes micromoléculas no combate ao estresse oxidativo são os tocoferóis (Vitamina E) e o ácido ascórbico (Vitamina C) (BARREIROS & DAVID, 2006).

A vitamina C (ascorbato) é um nutriente hidrossolúvel encontrado primariamente em frutas e vegetais (MAYNE, 2003) e exerce ação protetora sobre componentes hidrossolúveis do organismo (BENZIE & STRAIN, 1999). Age diretamente sobre as EROs e está envolvida na regeneração de α -tocoferil em α -tocoferol (Vitamina E) (FREI et al., 1989; CHAN, 1993). A vitamina C interage com as EROs na fase aquosa do plasma antes que eles possam agir oxidativamente sobre lipídios e lipoproteínas (ROSS & MOLDEUS, 1991; NORDBERG & ARNER, 2001). Estudos epidemiológicos têm sugerido uma associação entre a ingestão de vitamina C e decréscimo do risco de DCV (STEFFEN et al., 2007; ROSA et al., 2010). Além disso, observou-se que a vitamina C exerce um papel protetor na DAC por melhorar a disfunção endotelial e por aumentar a produção de óxido nítrico em várias patologias associadas como hipertensão e hipercolesterolemia (RUMLEY et al., 2004).

A vitamina E (ou α -tocoferol) pertence ao grupo dos antioxidantes fenólicos, sendo que dentre eles o α -tocoferol tem sido considerado o mais biologicamente ativo e o principal antioxidante lipossolúvel nas membranas celulares (MACHLIN & BENDICH, 1987; MAYNE, 2003). Estudos comprovam que a vitamina E é um eficiente inibidor da peroxidação de lipídios *in vivo*. Esta substância age como doadora de H para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar em cadeia. Cada tocoferol pode reagir com até dois radicais peroxila e, nesse caso, o tocoferol é irreversivelmente desativado. Para que eles não se desativem, necessitam do mecanismo de regeneração sinérgico com a vitamina C nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial (BARREIROS et al., 2006). A deficiência de Vitamina E tem sido associada a um aumento da viscosidade das plaquetas do sangue, predispondo à formação de coágulos potencialmente fatais (STAMPFER & RIMM, 1995; BONITHON-KOPP et al., 1997). Assim, a vitamina E previne doenças ateroscleróticas não somente por seu efeito antioxidante, mas também por seu efeito inibidor sobre a proliferação de células de músculo liso e sobre a adesão e agregação plaquetária (HARRIS et al., 2002). Entretanto, apesar dessas observações positivas, ainda permanece controverso os efeitos da administração de doses altas de vitamina E, uma vez que efeitos nocivos sobre o sistema cardiovascular foram observados (BELL & GROCHOSKI, 2008; ROSA et al., 2010).

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta tese estão apresentados sob a forma de artigos e manuscritos, os quais encontram-se no item “**ARTIGOS E MANUSCRITOS**”. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos e manuscritos e representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados demonstrados nos artigos e manuscritos contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta tese.

4. ARTIGOS E MANUSCRITOS

4.1 Artigo 1

**Enzimas que hidrolisam nucleotídeos de adenina em pacientes com
isquemia cardíaca**

**Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with
ischemic heart disease**

Margarete D. Bagatini, Caroline C. Martins, Diogo Gasparetto, Roselia M. Spanevello, Lara V. Becker, Cintia S. Rosa, Vanessa Battisti, Luziane Bellé, Jamile F. Gonçalves, Maria Rosa C. Schetinger, Romualdo B. dos Santos, Liliâne Z. Oliveira, Vera Maria Morsch

Publicado na revista Clinica Chimica Acta



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim

Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease

Margarete D. Bagatini^a, Caroline C. Martins^a, Diogo Gasparetto^b, Roselia M. Spanevello^a, Lara V. Becker^a, Cintia S. Rosa^a, Vanessa Battisti^a, Luziane Bellé^a, Jamile F. Gonçalves^a, Maria Rosa C. Schetinger^a, Romualdo B. dos Santos^b, Liliane Z. Oliveira^c, Vera Maria Morsch^{a,*}

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^b Grupo de Pesquisa em Cardiologia, Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brazil

^c Serviço de Hematologia e Oncologia, Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2010

Received in revised form 22 September 2010

Accepted 27 September 2010

Available online xxxx

Keywords:

Ischemic heart diseases

Platelets

Nucleotides

Nucleosides

Ischemia

ABSTRACT

Background: The extracellular nucleotides, ATP and ADP, as well as the nucleoside adenosine have been implicated in a great number of pathologic and physiological functions. However, extracellular adenine nucleotide levels are controlled by a complex cell surface-located group of enzymes called ectonucleotidases. We evaluated activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides and nucleosides in platelets from patients with ischemic heart disease (IHD).

Methods: Sixty IHD patients were selected for the study. The activities of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase, CD39), ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP), ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) were studied in isolated platelets of these patients, as well as the platelet aggregation and NTPDase expression.

Results: The results show that NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, E-NPP activities and NTPDase expression were increased in platelets of IHD patients when compared with the control group ($p < 0.05$). On the other hand, ADA activity and platelet aggregation were decreased in IHD patients, when compared with the control group ($p < 0.05$).

Conclusions: The pathological condition in IHD generates alterations in ectonucleotidase activities as a compensatory organic response to thrombotic events that occur in IHD.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ischemic heart disease (IHD) is an increasingly common cause of death in the world. This disease affects millions of people annually and results in morbidity and mortality [1]. The term "ischemia" refers to a lack of oxygen due to inadequate perfusion, which results from an imbalance between oxygen supply and demand. The main cause of myocardial ischemia is atherosclerosis disease of epicardial coronary arteries [1,2]. In most cases, ischemia occurs when an atherosclerotic plaque fissures, ruptures or ulcerates and when conditions favor thrombogenesis, so that a mural thrombus forms at the site of rupture and leads to coronary artery occlusion [2].

Platelets are one the most important blood components that participate in and regulate thrombus formation by releasing active substances such as ADP [3,4]. It is known that micromolar concentrations of ADP are sufficient to induce human platelet aggregation, whereas adenosine (the final product of ATP hydrolysis) can inhibit

platelet aggregation [5]. On the other hand, ATP, in low concentrations, enhances collagen, thromboxane A₂ and thrombin, induced platelet aggregation [6]. At high concentrations, it inhibits platelet aggregation induced by ADP, probably because ATP is rapidly hydrolyzed to adenosine, which demonstrates antiplatelet action [7]. Adenosine displays functions that will depend on the type of receptor in each tissue and on the origin of the damage, one important action being the reduction of vascular injury by platelet aggregation inhibition [8].

Due to the fact that extracellular adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their nucleoside derivative, adenosine, are important signaling molecules that mediate diverse biological and pathological processes in many tissues [9], their levels must be carefully controlled. For this purpose, platelet expression can be examined. Platelets express a multienzymatic complex on their surface, which is responsible for extracellular nucleotide hydrolysis. This complex includes the enzymes NTPDase (ectonucleoside triphosphate phosphohydrolase), E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase), ecto-5'-nucleotidase and ecto-adenosine deaminase (ADA) [10]. NTPDase hydrolyze ATP and ADP to AMP [11], while E-NPPs hydrolyze 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives producing nucleotide monophosphate [12]. AMP resulting from the action of NTPDase and E-NPP is subsequently hydrolyzed to adenosine by ecto-5'-nucleotidase [13].

* Corresponding author. Departamento de Química/Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil 97105-900. Fax: +55 55 3220 9557.

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

Adenosine can be directly inactivated on the cell surface through sequential action of ADA which catalyses the irreversible deamination of adenosine leading to inosine [14].

Together, these ecto-enzymes constitute a highly organized enzymatic cascade that is able to regulate the extracellular concentrations of adenine nucleotides and nucleosides and play an important role in the maintenance of normal hemostasis and thrombogenesis, mainly by regulating the platelet aggregation status [9].

Taking into account the importance of IHD and adenine nucleotides in the regulation of platelet aggregation, as well as their importance in adenosine formation, the aim of the present study was to evaluate the activity of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides and nucleosides in platelets from patients with IHD.

2. Patients and methods

2.1. Materials

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

2.2. Patients

Sixty IHD patients from the Federal University of Santa Maria Hospital were selected for the study. The IHD group was divided in 2 groups: acute coronary syndrome (ACS – 30 patients) and stable angina pectoris (SAP – 30 patients), characterized by clinical criteria, such as chest pain, associated to clinical evidence of ischemia through a history of coronary arterial disease (CAD), the electrocardiographic changes included symmetrical ST segment elevations of 1 mmol/l from baseline in limb leads or of 2 mmol/l in chest leads of T-wave inversions with or without Q waves, and changes in serum concentrations of creatine kinase (CK), creatine kinase MB isoenzymes (CK-MB) and troponins. All patients received the conventional therapy for IHD, including clopidogrel (75 mg) and AAS (100 mg). The control group consisted of 30 individuals aged 51.60 ± 2.64 y, 52% males and 48% females, who presented normal blood pressure, were free from diabetes mellitus, alcoholism, cigarette smoking, chronic diseases and who had not been submitted to any pharmacological therapy during the month before the study. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria, protocol number 01320.243.000-08, Brazil. Ten milliliters of blood was obtained from each patient and used for platelet-rich plasma preparation and biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group. Patient general characteristics are shown in Table 1.

2.3. Platelet isolation

Platelets were prepared from human donors by the method of Pilla et al. [15] modified by Lunkes et al. [16]. Briefly, blood was collected into 0.129 mol/l citrate and centrifuged at $160 \times g$ for 10 min. The platelet-rich plasma was centrifuged at $1400 \times g$ for 15 min and washed twice with 3.5 mmol/l HEPES isosmolar buffer. The washed platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer and protein was adjusted to 0.4–0.6 mg/ml.

2.4. NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activity determination

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mmol/l CaCl_2 , 100 mmol/l NaCl, 4 mmol/l KCl, 5 mmol/l glucose and 50 mmol/l Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μl as described by Pilla et al. [15]. For AMP hydrolysis, the ecto-5'-nucleotidase activity was carried out as previously described by Pilla et

Table 1

Clinical characteristics and biochemical determinations in the control group (CT), and stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) patients.

Variable	CT	SAP	ACS
	n=30	n=30	n=30
Age (y)	51.60 ± 2.64	63.52 ± 1.68	63.44 ± 3.04
Men	52%	63%	63%
Women	48%	37%	37%
Hypertension	–	82%	88%
Smoker	–	51%	59%
Diabetes mellitus	–	42%	64%
Family history	–	77%	85%
Drugs			
Acetylsalicylic acid	–	90%	100%
Clopidogrel	–	10%	80%
Propranolol	–	50%	76%
Captopril	–	53%	50%
Glibenclamide	–	30%	43%
CK (U/l)	<232	<232	509.13 ± 35.9
CK-MB (U/l)	<24	<24	74.86 ± 6.34
Troponin I (ng/ml)	<0.2	<0.2	25.40 ± 3.42

Continuous variables are presented as mean \pm SEM and the other variables are shown as percentage of patients.

al. modified by Lunkes et al. [15,16], except that the 5 mmol/l CaCl_2 was replaced by 10 mmol/l MgCl_2 . Twenty microliters of the enzyme preparation (8–12 μg of protein) was added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM, and AMP at a final concentration of 2 mmol/l. The incubation time was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 μl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [17] using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.5. E-NPP activity determination

Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity from platelets was assessed using *p*-nitrophenyl 5'-thymidinemonophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Fürstenau et al. [10]. The reaction medium containing 50 mmol/l Tris-HCl buffer, 120 mmol/l NaCl, 5.0 mmol/l KCl, 60 mmol/l glucose, and 5.0 mmol/l CaCl_2 , pH 8.9, was preincubated with approximately 20 mg per tube of platelet protein for 10 min at 37 °C at a final volume of 200 μl . The enzyme reaction was started by the addition of *p*-Nph-5'-TMP at a final concentration of 0.5 mmol/l. After 80 min of incubation, 200 ml NaOH 0.2 mol/l was added to the medium to stop the reaction. The amount of *p*-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of 18.8×10^{-3} mol/l/cm. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were expressed as nmol *p*-nitrophenol released/min/mg protein.

2.6. Adenosine deaminase activity determination

ADA from platelets was determined according to Guisti and Galanti [18] based on the Bertholet reaction, that is, the formation of a colored indophenol complex from ammonia released from adenosine and quantified spectrophotometrically. Briefly, 50 μl of platelets reacted with 21 mmol/l of adenosine pH 6.5 and was incubated at 37 °C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. The protein content used for the platelet experiment was adjusted between 0.7 and 0.9 mg/ml. Results were expressed in U/l. One unit (1 U) of ADA is

defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

2.7. Flow cytometry analysis for CD39

Peripheral blood cells were incubated with anti-CD39 and anti-CD61 (20 μ l/10⁶ cells) for 25 min, lysed with the reagent FACS (fluorescent activated cell sorter) and incubated again for 15 min in the dark. Cells were washed twice in PBS buffer (pH 7.4) containing 0.02% (W/V) sodium azide and 0.2% (W/v) BSA. The cells were then resuspended in PBS buffer (pH 7.4) and immediately analyzed by FACScalibur flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA) without fixation.

2.8. Platelet aggregation

The platelet aggregation profile was evaluated by the method of Born [19] by measuring turbidity with a Chrono-log optical aggregometer (AGGRO/INK® Model 810-CA software for Windows ver. 5.1) using ADP at a concentration of 2.5, 5 and 10 μ mol/l and collagen at a concentration of 2.5, 5 and 7.5 μ g/ml as agonist. The results were expressed as percentage of aggregation.

2.9. Effects of acetylsalicylic acid and clopidogrel in vitro on activity of enzymes that degraded adenine nucleotides and nucleosides and platelet aggregation

The *in vitro* effects of acetylsalicylic acid and clopidogrel on NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities were evaluated. Isolated platelets from healthy subjects were incubated with different concentrations of these drugs in the medium reaction as previously described. All concentrations of acetylsalicylic acid (0, 50, 100, 150 and 200 μ mol/l) and clopidogrel (0, 1, 3, 5, 8 μ mol/l) used *in vitro* represent approximately the mean plasma values of the medications [20,21]. To analyze the effect of these drugs on platelet aggregation concentrations of 150 μ mol/l for acetylsalicylic acid and 10 μ mol/l for clopidogrel were chosen as they represent the plasmatic concentrations of these drugs.

2.10. Biochemical determinations

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

2.11. Protein determination

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

2.12. Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean \pm SEM and the other variables are shown as percentage of patients. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. Differences between groups were considered to be significant when $P < 0.05$.

3. Results

The clinical characteristics and biochemical determinations of the study group are shown in Table 1. The study groups were age and sex matched. Risk factor analysis (Table 1) showed prevalence of

hypertension, smoking and family history of heart diseases in both the IHD patient groups studied. We observed an increase in cardiac biomarkers in ACS patients when compared with the control group and SAP patients.

The results obtained for NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in platelets are shown in Fig. 1. As can be observed, ATP

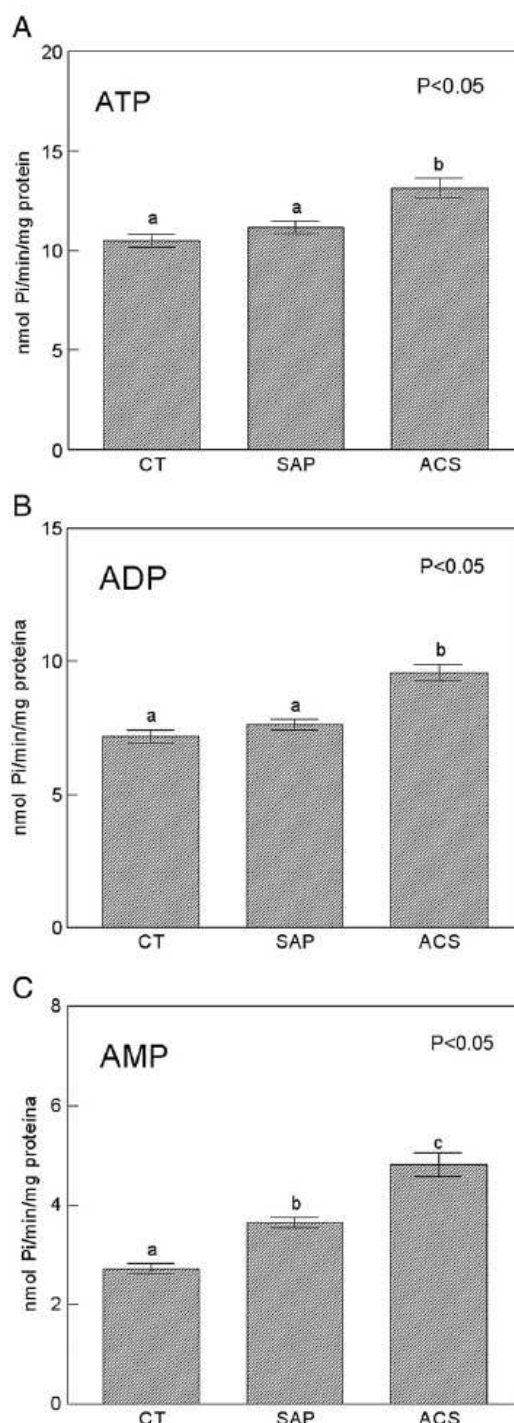


Fig. 1. NTPDase (ATP and ADP) and ecto-5'-nucleotidase (AMP) activities in platelets of ACS and SAP patients and control group (CT). Data are presented as means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$, $n = 30$).

and ADP hydrolysis were significantly increased in ACS patients when compared with the control group and SAP patients, $P < 0.0001$ (Fig. 1A and B). However, no differences for ATP and ADP hydrolysis were observed when comparing SAP patients and the control group ($P = 0.19$). AMP hydrolysis was modified by IHD (Fig. 1C) demonstrating a significant increase in AMP hydrolysis in ACS patients when compared with the control group and SAP patients ($P < 0.00001$). Differences in AMP hydrolysis were also observed in SAP patients when compared with the control group ($P < 0.0001$).

Statistical analysis of the content of CD39-positive cells by flow cytometry using labeled antibodies against NTPDase revealed that ACS patients had a significant increase in NTPDase expression when compared with SAP patients and the control group, $P < 0.0001$ (Fig. 2). No differences were observed between SAP patients and the control group ($P = 0.25$).

Fig. 3 shows E-NPP activity. An increase in E-NPP activity was observed in both groups studied (ACS and SAP patients) when compared with the control group ($P < 0.0001$). In contrast, ADA activity decreased in ACS and SAP patients when compared with the control group, $P < 0.001$ (Fig. 4).

Table 2 presents the results obtained for platelet aggregation. As can be observed, a significant decrease was found in platelet aggregation in ACS and SAP patients when compared with the control group at different concentrations of ADP and collagen ($P < 0.05$). In the *in vitro* plasmatic concentrations, acetylsalicylic acid decreased platelet aggregation only when collagen was utilized as agonist. Clopidogrel reduced platelet aggregation when both agonists were utilized at the lowest concentrations, $P < 0.05$ (Table 3).

No differences were observed in NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities when acetylsalicylic acid and clopidogrel were utilized *in vitro* (data not show).

4. Discussion

IHD patients were classified into 2 groups: acute coronary syndrome (ACS) and stable angina pectoris (SAP). In both groups, the platelets are the most important blood components that participate in and regulate thrombus formation by releasing active substances such as ADP and ATP [3,4]. Since these nucleotides are present in the extracellular medium, they may contribute to alterations in platelet aggregation [4,6]. However, extracellular adenosine levels are controlled by a complex cell surface-located group of enzymes called ectonucleotidases [9–11,23].

Several studies from our laboratory have demonstrated that ectonucleotidases are enzymes that play an important role in thrombor-

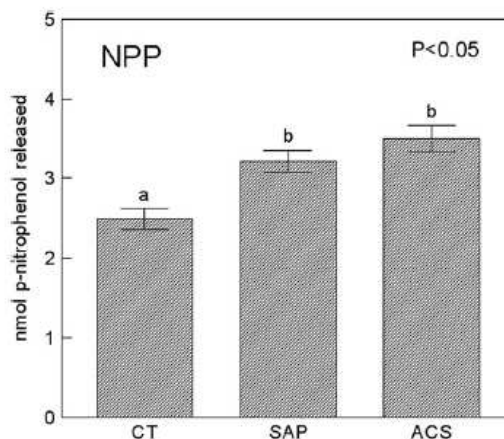


Fig. 3. E-NPP activity in platelets of ACS and SAP patients and control group (CT). Data are presented as means ± SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$, $n = 30$).

regulation mechanisms and alterations in their activities have been verified in various diseases, suggesting that they could be important physiological and pathological parameters [16,23–26]. Therefore, in the present study we evaluated the enzymes that hydrolyze adenosine nucleotides and nucleosides in platelets from IHD patients.

The results obtained demonstrate an increase in ATP and ADP hydrolysis in ACS patients (Fig. 1A and B). The same results were obtained for NTPDase-1 (CD39) expression (Fig. 2). Corroborating with these results, recent studies made in our laboratory demonstrated a significant increase in the expression of NTPDase-1 in platelets of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes [26], and patients with type 2 diabetes and hypertension [27], indicating that NTPDase-1 is an important enzyme in nucleotide hydrolysis in many pathologies, including IHD.

Moreover, an increase in AMP hydrolysis was observed in IHD patients (Fig. 1C). Based on these findings, and in accordance with other studies [24,28,29], we can suggest that hydrolysis of ATP, ADP and AMP in platelets of patients with IHD could be carried out by action of NTPDase-1 together with ecto-5'-nucleotidase, since both enzymes are present on the ecto-surface in intact platelets and are able to promote the complete hydrolysis of ATP to adenosine in the extracellular space.

Another important group of enzymes that participate in the cascade of nucleotide hydrolysis is E-NPPs, responsible for

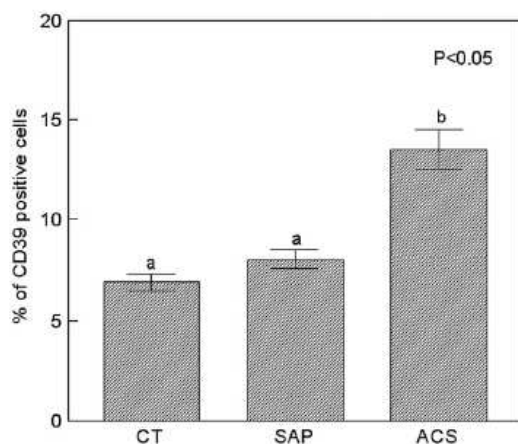


Fig. 2. CD39 expression in platelets of ACS and SAP patients and control group (CT) analyzed by flow cytometry. Data are presented as means ± SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$, $n = 8$).

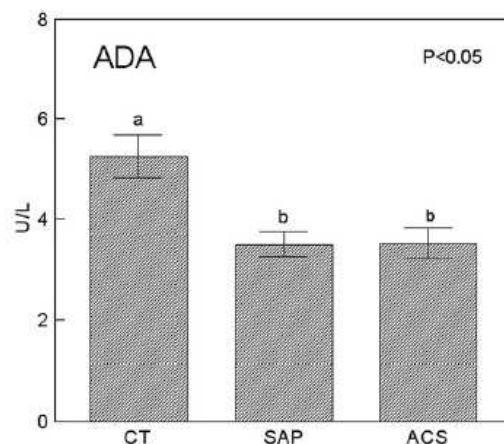


Fig. 4. ADA activity in platelets of ACS and SAP patients and control group (CT). Data are presented as means ± SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$, $n = 30$).

Table 2

Platelet aggregation profile in the control group (CT) and stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) patients.

Agonist	Groups		
	CT	SAP	ACS
ADP 2.5 $\mu\text{mol/l}$	73.0 \pm 2.26 ^a	53.2 \pm 5.17 ^b	46.4 \pm 3.90 ^b
ADP 5.0 $\mu\text{mol/l}$	72.0 \pm 3.26 ^a	57.3 \pm 5.14 ^b	52.9 \pm 3.71 ^b
ADP 10 $\mu\text{mol/l}$	71.4 \pm 3.56 ^a	61.2 \pm 4.85 ^{ab}	49.6 \pm 4.12 ^b
Collagen 2.5 $\mu\text{g/ml}$	81.2 \pm 1.11 ^a	62.6 \pm 4.31 ^b	58.0 \pm 8.18 ^b
Collagen 5.0 $\mu\text{g/ml}$	80.4 \pm 1.12 ^a	70.1 \pm 3.89 ^b	64.6 \pm 6.69 ^b
Collagen 7.5 $\mu\text{g/ml}$	79.0 \pm 1.58 ^a	69.6 \pm 4.17 ^b	67.3 \pm 4.05 ^b

Platelet aggregation was evaluated by using ADP at concentrations of 2.5, 5 and 10 μM and collagen at concentrations 2.5, 5 and 7.5 $\mu\text{g/ml}$ as agonist. The results are expressed as percentage of aggregation. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. Different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 10$).

hydrolyzing 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives, where both purines and pyrimidines serve as substrates, resulting in the production of nucleotide monophosphate. This enzyme is made up of 3 members (NPP1–3), which are responsible for the conversion of cyclic AMP to AMP, ATP to AMP and ADP to AMP [10,12,30]. Our results demonstrate an increase in E-NPP activity in ACS and SAP patients (Fig. 3). An increase in E-NPP activity may lead to an increase in AMP levels ("NTPDase-like" action), which can be hydrolyzed by ecto-5'-nucleotidase action into adenosine [9]. In the present study, we confirmed this hypothesis by observing the nucleotide hydrolysis in SAP patients, where no differences were observed in NTPDase-1 activity and expression in this group, while E-NPP and ecto-5'-nucleotidase activities rose.

The increase in NTPDase-1, E-NPP and ecto-5'-nucleotidase activities found in this study could be related to a compensatory organic response. It is known that ATP promotes vasoconstriction in the vascular endothelium and ADP activates platelet aggregation, whereas adenosine, a cardioprotector molecule, induces vasodilatation and the inhibition of platelet aggregation [6–8,31]. Consequently, the organism could be reducing thrombotic processes by depleting ADP and enhancing adenosine production.

In addition to the enhancement of ectonucleotidase activities, our results demonstrate that ADA activity was decreased in platelets of IHD patients (Fig. 4). Similarly, Asakura et al. [32], studying patients with chronic heart failure, found a downregulation of adenosine deaminase expression in human failing hearts, as well as a decrease in ADA activity. ADA catalyses the deamination of adenosine and deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine. It is involved in controlling adenosine levels and has been shown to be modified by many pathological situations [14]. Thus, the decrease in ADA activity observed in our patients could

Table 3

Effects *in vitro* of acetylsalicylic acid (150 $\mu\text{mol/l}$) and clopidogrel (10 $\mu\text{mol/l}$) on platelet aggregation.

	CT	Drugs	
		Acetylsalicylic acid (150 $\mu\text{mol/l}$)	Clopidogrel (10 $\mu\text{mol/l}$)
ADP 2.5 $\mu\text{mol/l}$	71.66 \pm 0.33 ^a	67.66 \pm 3.18 ^a	65.67 \pm 1.21 ^b
ADP 5.0 $\mu\text{mol/l}$	71.00 \pm 2.52 ^a	67.33 \pm 4.33 ^a	69.01 \pm 1.15 ^a
ADP 10 $\mu\text{mol/l}$	72.60 \pm 3.84 ^a	66.32 \pm 5.81 ^a	67.66 \pm 2.18 ^a
Collagen 2.5 $\mu\text{g/ml}$	79.33 \pm 1.85 ^a	63.00 \pm 1.73 ^b	69.33 \pm 0.66 ^b
Collagen 5.0 $\mu\text{g/ml}$	80.66 \pm 0.33 ^a	67.31 \pm 1.55 ^b	74.33 \pm 3.37 ^a
Collagen 7.5 $\mu\text{g/ml}$	78.00 \pm 1.52 ^a	68.33 \pm 2.40 ^b	75.06 \pm 4.57 ^a

Platelet aggregation was evaluated by using ADP at concentrations of 2.5, 5 and 10 μM and collagen at concentrations 2.5, 5 and 7.5 $\mu\text{g/ml}$ as agonist. The results are expressed as percentage of aggregation. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. Different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 3$).

represent an important mechanism to preserve adenosine levels in the circulation and to avoid platelet aggregation.

Reinforcing this line of reasoning, we have shown a decrease in platelet aggregation in IHD patients, at different concentrations of ADP and collagen as agonist (Table 2). In order to exclude the possibility of a direct effect of drugs commonly used in the treatment of IHD, we investigated the influence of acetylsalicylic acid and clopidogrel in platelet aggregation (Table 3). Acetylsalicylic acid is an antiplatelet drug that interferes with the metabolism of cyclic prostanoids by irreversible inhibition of cyclooxygenase, which is a key enzyme in the pathway of thromboxane A2 synthesis [33]. Clopidogrel is an antiplatelet compound that has recently been shown to be effective in the secondary prevention of cardiovascular complications of atherosclerosis [34]. Clopidogrel is a thienopyridine, whose active metabolites are known as platelet ADP-receptor blockers (P2Y₁₂) [34]. In plasmatic concentrations *in vitro*, AAS and clopidogrel decreased platelet aggregation, however this decrease was lower than that observed in IHD patients. These results reinforce the hypotheses that a decrease in ADA activity could preserve adenosine levels in the circulation, reducing platelet aggregation. Besides, the therapy with AAS and clopidogrel is used in high concentrations only after an ischemic event, which justifies the action of these drugs in reducing platelet aggregation subsequent to ischemia.

Finally, we investigated the influence of acetylsalicylic acid and clopidogrel on NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activity (data not show). In agreement with other studies [16,24,35] our results demonstrate that these drugs did not alter the enzymes studied at the concentrations tested. Consequently, we believe that the increase in NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP activity and the inhibition of ADA observed in the present study were not affected by the medications used by the patients. These findings indicate that the alterations in enzyme activities were generated by the pathological condition.

In conclusion, based on the results presented here we suggest that the pathological condition in IHD produced alterations in ectonucleotidase activities as a compensatory organic response. Furthermore, this finding supports the hypothesis that enzymatic alterations may contribute to modifications in platelet aggregation, however we believe that additional studies are necessary to better comprehend the involvement of nucleotide- and nucleoside-hydrolyzing enzymes and their usefulness as a possible therapeutic window in cardiac diseases such as IHD.

Acknowledgements

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

References

- [1] Wang XJ, Li QP. The roles of mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in ischemic heart diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359:189–93.
- [2] Kasper DN, Braunwald E, Fauci AS, Hauser S, Longo DL, Jameson JL. *Harrison medicina interna*. Rio de Janeiro: Academic Press; 2006. p. 1514–30.
- [3] Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, et al. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2002;109:1031–40.
- [4] Bakker WW, Poelstra A, Barradas K, Mikhaelidis MA. Platelets and ectonucleotidases. *Platelets* 1994;5:121–9.
- [5] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JFH, et al. Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 2003;1:2497–509.
- [6] Soslau G, Youngprapakorn D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1997;1355:131–40.
- [7] Rozalski M, Nocun M, Watala C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets – potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochim Pol* 2005;52:411–5.
- [8] Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Skladanowski AC. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol* 2006;53:269–78.

- [9] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:673–94.
- [10] Fürstenau CR, Trentin DS, Barreto-Chaves MLM, Sarkis JF. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 2006;17:84–91.
- [11] Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006;2:409–30.
- [12] Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 2005;30:542–50.
- [13] Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006;2:351–60.
- [14] Blackburn MR, Kellems RE. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv Immunol* 2005;86:1–41.
- [15] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996;7:225–30.
- [16] Lunkes GL, Lunkes D, Stefanello F, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2003;109:189–94.
- [17] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375–80.
- [18] Guisti G, Galanti B. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1984. p. 315–23.
- [19] Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927–9.
- [20] Richter T, Mürdter TE, Heinkle G, et al. Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:189–97.
- [21] Tendera M, Wojakowski W. Role of antiplatelet drugs in the prevention of cardiovascular events. *Thromb Res* 2003;110:355–9.
- [22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [23] Schetinger MR, Morsch VM, Bonan C, Wyse A. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 2007;31:77–98.
- [24] Bagatini M, Martins C, Battisti V, et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2008;41:1181–5.
- [25] Maldonado P, Corrêa M, Becker L, et al. Ectonucleotidase Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. *Clin Biochem* 2008;41:400–6.
- [26] Duarte M, Loro V, Rocha J, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *FEBS* 2007;274:2707–14.
- [27] Lunkes GL, Lunkes DS, Leal D, et al. Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;8:351–7.
- [28] Kittel A, Kiss AL, Müllner N, Matkó I, Sperlág B. Expression of NTPDase 1 and caveolins in human cardiovascular disease. *Histochem Cell Biol* 2005;124:51–9.
- [29] Kohler D, Eckle T, Faigle M, et al. CD39/ectonucleotidases triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2007;116:1784–94.
- [30] Goding JW, Grobden B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 2003;1638:1–19.
- [31] Ely SW, Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992;85:893–904.
- [32] Asakura M, Asanuma H, Kim J, et al. Impact of adenosine receptor signaling and metabolism on pathophysiology in patients with chronic heart failure. *Hypertens Res* 2007;30:781–7.
- [33] Bhatt DL, Topol EJ. Need to test the arterial inflammation hypothesis. *Circulation* 2002;106:136–40.
- [34] Pereillo JM, Mafrouh M, Andrieu A, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 2002;30:1288–95.
- [35] Herbert JM. Clopidogrel and antiplatelet therapy. *Expert Opin Invest Drug* 1994;3:449–55.

4.2 Manuscrito 1

**Associação entre a atividade das colinesterases e inflamação em
pacientes com Isquemia Cardíaca (CI)**

**ASSOCIATION BETWEEN CHOLINESTERASE ACTIVITIES AND
INFLAMMATION IN PATIENTS WITH ISQUEMIC HEART DISEASES (IHD)**

Margarete Dulce Bagatini, Caroline Curry Martins, Jamile Fabrin Gonçalves,
Marta Medeiros Frescura Duarte, Roselia Maria Spanevello, Andréia Machado
Cardoso, Liési Maders, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch

Submetido a revista Clinica Chimica Acta

**ASSOCIATION BETWEEN CHOLINESTERASE ACTIVITIES AND
INFLAMMATION IN PATIENTS WITH ISQUEMIC HEART DISEASES (IHD)**

Margarete Dulce Bagatini^{1*}, Caroline Curry Martins¹, Jamile Fabrin Gonçalves²,
Marta Medeiros Frescura Duarte¹, Roselia Maria Spanevello¹, Andréia
Machado Cardoso¹, Liési Maders¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Vera
Maria Morsch¹

1 Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

2 Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

***Corresponding author:**

Ms. Margarete Dulce Bagatini

Departamento de Química/Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, RS, Brasil- 97105-900

Fax: 0+5555 3220 8978 or e-mail: margaretebagatini@yahoo.com.br

Abstract

Objectives: The present study was designed to investigate the role of cholinesterases as a marker of low-grade systemic inflammation in patients with Ischemic Heart Disease (IHD) and the correlation with high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and LDL-cholesterol.

Design and Methods: Seventy IHD patients were selected for the study. Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BuChE) activity was determined in total blood and serum of IHD patients and controls.

Results: Our study shows an increase in the AChE activity in IHD patients ($P \leq 0.05$). The same results were observed for the BuChE activity and the levels of hsCRP in patients with Acute Coronary Syndrome (ACS). Moreover, a positive correlation between hsCRP and AChE ($r=0.91$, $P < 0.05$), and LDL-cholesterol and AChE ($r=0.93$, $P < 0.05$) was found in ACS patients.

Conclusions: Taken together, these results suggest that there is an association between inflammation and the increase of the cholinesterase activity in IHD patients.

Key Words: Isquemic Heart Disease; acetylcholinesterase; high sensitivity C-reactive protein; LDL-cholesterol; inflammation

1. Introduction

Ischemic heart disease (IHD) is an increasing common cause of death in the world. This disease is the insufficient status of oxygen within the cardiac muscles due to an imbalance between oxygen supply and demand. It is also a cardiac disease that occurs as a result of coronary artery stenosis by atherosclerosis and thrombus [1].

Atherosclerosis is the most common pathological process that leads to cardiovascular diseases (CVD). It is a disease of large- and medium- sized arteries that is characterized by a formation of atherosclerotic plaques consisting of necrotic cores, calcified regions, accumulated modified lipids, inflamed smooth muscle cells, endothelial cells, leukocytes, and foam cells [2]. These features of atherosclerotic plaques illustrate that atherosclerosis is a complex disease, and many components of the vascular, metabolic, and immune systems are involved in this process. [2,3]. A large body of literature supports the idea that inflammation plays a pivotal role in all phases of atherosclerosis, from the fatty streak lesion formation to the acute coronary event due to vulnerable plaque rupture [4,5].

The inflammatory reactions within coronary atherosclerotic plaques influence the clinical result of acute coronary syndromes (ACS) and coronary artery disease. Recent studies have suggested that inflammation markers may reflect different aspects of the atherothrombotic process in relation to the stages of ACS. These markers play an important role in the risk of developing IHD, and may correlate with its severity. Some cytokines, acute phase proteins and adhesion molecules released from the inflammatory cells may reflect the inflammatory process in atherosclerotic plaques [5]. These biomarkers include

high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), a simple downstream marker of inflammation, recently emerged as a major cardiovascular risk factor. Elevated baseline concentrations of hsCRP are associated with the risk of atherosclerotic events in general populations and show a predictive value even in terms of secondary prevention, both in patients with chronic stable angina pectoris (SAP) and ACS [4-6].

However, recent studies have suggested that more markers of low-grade systemic inflammation need to be identified. In this context the study of enzymes, such as acetylcholinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; E.C. 3.1.1.8), becomes considerable [7]. AChE is a specific choline esterase, hydrolyzing predominantly choline esters (acetylcholine - ACh), and characterized by high levels in brain, nerve and red blood cells. The other type of enzyme, BuChE, is a nonspecific choline esterase (also called "pseudo" choline esterase) hydrolyzing other esters as well as choline esters, and found in blood serum, pancreas, liver, and central nervous system [8,9].

ACh is synthesized by preganglionic fibres of the sympathetic and parasympathetic autonomic nervous system and by postganglionic parasympathetic fibres. Until recently, neurons were the only identified source of ACh. It is now known that cells other than neurons express the proteins required for ACh metabolism. ACh is synthesized, amongst others, by immune cells (lymphocytes, dendritic cells, neutrophils) [10-12], and endothelial cells [13]. It is possible that ACh derived from these sources is involved in the modulation of local inflammatory processes [14]. Nevertheless, ACh is rapidly hydrolyzed by AChE in neural synapses and the motor endplate. In view of the

inflammatory suppressive effect of ACh, it is conceivable that the AChE activity is an intrinsic regulator of inflammation [7, 14].

Considering the important roles of the extraneuronal cholinergic system in inflammatory processes and the necessity to find new markers of low-grade systemic inflammation, the present study was designed to investigate the activity of AChE and BuChE enzymes in whole blood and serum, respectively, as well as their correlation with the levels of hsCRP and LDL-cholesterol in serum of patients with IHD.

2. Patients and Methods

2.1 Patients

Seventy IHD patients from the Federal University of Santa Maria Hospital were selected for the study. The IHD patients were divided in two groups: Acute Coronary Syndrome (ACS - 35 patients) and Stable Angina Pectoris (SAP- 35 patients), characterized by clinical criteria, such as chest pain for more than 30 min. The pain was described as heavy, squeezing, and crushing, involving the central portion of the chest and/or the epigastrium, and on occasion it radiates to the arms, associated to clinical evidence of ischemia through a history of coronary arterial disease (CAD). The electrocardiographic changes included symmetrical ST segment elevations of 1 mm from baseline in limb leads or of 2 mm in chest leads of T-wave inversions with or without Q waves, and changes in serum concentrations of creatine kinase (CK), creatine kinase MB isoform (CK-MB) and troponins. The control group consisted of 35 individuals aged 51.60 ± 2.64 years, 52% males and 48% females, who presented normal blood pressure, were free from diabetes mellitus, alcoholism, cigarette smoking,

chronic diseases and who had not been submitted to any pharmacological therapy during the month before the study. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria, protocol number 0132.0.243.000-08, Brazil. Ten milliliters of blood was obtained from each patient and used for biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group. Patient general characteristics are shown in table 1.

2.2 Sample collection

For measuring AChE activity the whole blood was collected in vacutainer tubes, using EDTA as anticoagulant. The samples were hemolyzed with phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 containing Triton X-100 (0.03%) and stored at -30 °C for 2 weeks.

BuChE activity, hsCRP and biochemical analyses were performed in serum obtained from blood collected in vacutainer tubes without anticoagulant system, and centrifuged at 1800 x g for 15 min.

2.3 Chemicals

Acetylthiocholine iodide (ASCh), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Ellman's reagent) and Triton X-100 were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany), and ethopropazine hydrochloride from Aldrich (Steinheim, Germany). All the other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.4 Determination of AChE activity in whole blood

The AChE enzymatic assay was determined by the method of Ellmann et al. [15] modified by Worek et al. [16]. The specific activity of whole blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and hemoglobin content and the results were expressed as mU/ μ mol Hb.

2.5 Determination of BuChE activity in serum

The BuChE enzymatic assay was determined in serum by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. [15]. The reaction mixture (2 mL final volume) contained 100 mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5 and 1 mM 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB). The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid-nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2-min incubation at 25°C. The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 8 mM butyrylthiocholine iodide (BuSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and enzyme activity was expressed in μ mol BuSCh/h/mg of protein.

2.6 hsCRP and biochemical determinations

hsCRP was measured in serum by immunoluminometry (IMMULITE 2000; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). Plasma glucose, serum total cholesterol and triglyceride concentrations were measured by standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics® reagents on a fully automated analyzer (Vitros 950® dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol was measured in the supernatant plasma after precipitation of apolipoprotein B-

containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride, as previously described [17]. Low-density lipoprotein cholesterol was estimated with the Friedewald equation [18].

2.7 Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford [19] using bovine serum albumin as standard.

2.8 Statistical Analysis

Continuous variables were presented as mean \pm SEM and the other variables were shown as percentage of patients. Data were analyzed statistically using one way ANOVA followed by the Duncan's multiple test – SSPS 8.0 for Windows. Correlation was evaluated with the Pearson's test. Differences were considered significant when the probability was $P < 0.05$.

3. Results

The clinical characteristics and cardiac biomarkers of the study groups are shown in Table 1. The study groups were age and sex matched. Risk factor analysis showed prevalence of hypertension, smoking and family history of heart diseases in both IHD patient groups studied. An increase in the cardiac biomarkers was observed in ACS patients when compared with the control group and SAP patients (Table 1).

Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and glucose levels in the groups studied are shown in Table 2. A significant increase in total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and glucose levels was

observed in the ACS patients when compared with the other groups ($P < 0.05$). The same results were observed for the triglycerides in SAP patients ($P < 0.05$). For HDL-cholesterol a decrease in ACS and SAP patients was found when compared to control ($P < 0.05$).

The results of AChE and BuChE activities are shown in Figures 1 and 2, respectively. AChE activity was elevated in ACS and SAP patients (63% and 56%, respectively) when compared to control ($P < 0.05$). BuChE activity was found to be increased only in the ACS patients (23%) when compared with the control group ($P < 0.05$). No differences were observed to the BuChE activity in the SAP group ($P = 0.68$). The same results were obtained to hsCRP levels (Figure 3). hsCRP levels were increased in ACS patients when compared with the other groups ($P < 0.05$), whereas no differences were observed in hsCRP levels in SAP patients ($P = 0.21$).

A statistically significant positive correlation was found between hsCRP and AChE ($r = 0.91$, $P < 0.05$), which indicates an association between AChE and inflammation. Another positive correlation was between LDL-cholesterol and AChE ($r = 0.93$, $P < 0.05$), which confirms the supposition above (Figures 4 and 5), respectively.

4. Discussion

The idea that inflammation is present in CVD was expressed by Virchow as early as 1856, but it took until 1994 for low-grade inflammation to come into focus as a predictor of risk for CVD [20]. Currently, inflammatory process is recognized to play a central role in the pathogenesis of atherosclerosis and in its complications [21,22]. Recent studies have demonstrated that ACh, the

principal vagus neurotransmitter, has important anti-inflammatory actions [7,14,23]. This “cholinergic anti-inflammatory pathway” mediated by ACh acts by inhibiting the production of tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1) and suppresses the activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) expression [24]. However, ACh is rapidly hydrolyzed by AChE and BuChE enzymes [8,9]. Hence, when the activities of AChE and BuChE enzymes are increased it could lead to reduced levels of ACh. This leads to a reduction in the anti-inflammatory actions exerted by ACh and increased inflammatory process [23]. Following this line of reasoning, in the present study we evaluated the activities of AChE and BuChE, as well as the levels of the hsCRP in IHD patients and the relation with the inflammatory process.

Our results show an increase in the AChE activity in ACS and SAP patients, while the BuChE activity was elevated only in ACS patients (Figures 1 and 2). AChE and the related BuChE can mediate ACh hydrolysis in neuronal and non-neuronal ACh signaling pathways [25]. AChE shows a marked preference for acetates as ACh and had virtually no action on butyrates, while BuChE can hydrolyze acetate, but shows a marked preference for butyrates [26]. Once increased total blood and serum activities of AChE and BuChE enzymes indirectly reflect reduced levels of ACh, the enhancement of local and systemic inflammatory events is observed due to the absence of the negative *feedback* control exerted by ACh [23]. According to Rosas-Ballina [14], considering the inflammatory suppressive effect of ACh, it is conceivable that AChE activity is an intrinsic regulator of inflammation, since it is specific for hydrolyzing acetate esters as ACh. In this context, the alteration in

cholinesterases observed in our patients may reinforce the inflammatory process already present in this pathology.

In accordance with our results, studies with diabetes mellitus patients [27], ischemic stroke patients [28], Alzheimer's disease [23, 29], and metabolic syndrome [30] revealed a relation between cholinesterases and inflammatory diseases. Rao et al. [23] propose that an increase in AChE and BuChE activity in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus reveal an inflammatory process and may serve as markers to predict the development of the disease. Correa et al. [28] suggest that increased erythrocyte AChE activity in acute ischemia could be associated with the presence of inflammatory mediators in an acute clinical event. Valle et al. [31] observed significant correlations between cholinesterase activities and variables associated with CVD and the metabolic syndrome.

Additionally, several studies have showed that selective AChE inhibitors exhibit anti-inflammatory effects in brain ischemia [32], Alzheimer's disease [33], and in myocardial ischemia/reperfusion [34]. The protection mechanism involves the inhibition of AChE activity and activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7$ nAChR). The ACh non-hydrolyzed can interact with $\alpha 7$ nAChR expressed by macrophages and other cytokine producing cells, down-regulate pro-inflammatory cytokine synthesis and prevent tissue damage [35]. Taken together these findings show a link between cholinesterases and inflammatory process.

Another point to be considered is the hsCRP levels. hsCRP is a highly conserved plasma protein and a marker of inflammation recently emerged as a major cardiovascular risk factor [4]. High baseline hsCRP concentrations are

associated with the risk of atherosclerotic events in general populations and show a predictive value even in terms of secondary prevention, both in patients with SAP and ACS [4, 6]. In our study we observed an increase in hsPCR levels in SCA patients (Figure 1), while this was not observed in SAP patients. On the other hand, an increase in the AChE activity (Figure 2) was found in both groups studied. Thus, AChE may be more sensitive for low-grade inflammation in patients with IHD than hsPCR. However, with our results we could only show that AChE might be a good marker of low-grade systemic inflammation once a positive correlation between hsCRP and AChE (Figure 4) was found, and AChE, in total blood, is easily obtainable and measurable.

Moreover, hyperlipidemia is a well known risk factor for the development of atherosclerosis. The accumulation of smaller, denser LDL particles in the vessel wall is considered to be a key pathophysiological mechanism responsible for the development of atherosclerosis [36]. This process is further facilitated by reduced reverse cholesterol transport associated with low HDL-cholesterol [37]. The present study demonstrated an increase in LDL-cholesterol and a decrease in HDL-cholesterol levels in IHD patients (Table 2). These results confirm the literature [38, 39] and show a positive correlation between LDL-cholesterol and AChE in ACS patients (Figure 5). Once LDL-cholesterol is associated with atherosclerosis and inflammatory process, a positive correlation between LDL-cholesterol and AChE could reinforce the results above and demonstrate that AChE is associated with low-grade inflammation.

In conclusion, we report, for the first time, that cholinesterases are linked with inflammation in IHD patients. These findings support the hypothesis that

AChE and BuChE could serve as markers of low-grade inflammation. However, we believe that additional studies are necessary to comprehend the relation between cholinesterases and inflammatory process in IHD patients and their usefulness as possible markers of low-grade inflammation in IHD.

Acknowledgements

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

5. References

- [1] D. Choi, K.C. Hwang, K.Y. Lee, Y.H. Kim, Ischemic heart diseases: Current treatments and future, *J. Control. Release.* 140 (2009) 194–202.
- [2] R. Ross, Atherosclerosis—an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 115–126.
- [3] G.K. Hansson, P. Libby, The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 508–519.
- [4] P. Calabrò, E. Golia, E.T. Yeh, CRP and the risk of atherosclerotic events, *Semin. Immunopathol.* 31 (2009) 79-94.
- [5] J.M. Fragoso-Lona, J. Ramírez-Bello, D. Cruz-Robles, O. Pérez-Méndez, A. de la Peña, G. Vargas-Alarcón, Pro-inflammatory and anti-inflammatory

markers in coronary artery disease and acute ischemic coronary syndrome, *Arch. Cardiol. Mex.* 79 (2009) 54-62.

[6] R. Dhingra, P. Gona, B.H. Nam, R.B. D'Agostino, P.W. Wilson, E.J. Benjamin, et al., C-Reactive Protein, Inflammatory Conditions, and Cardiovascular Disease Risk, *Am. J. Med.* 120 (2007) 1054-1062.

[7] U.N. Das, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation, *Med. Sci. Monit.* 13 (2007) 214-221.

[8] N.A. Hosea, H.A. Berman, P. Taylor, Specificity and orientation of trigonal carboxi esters and tetrahedral alkylphosphonyl esters in cholinesterases, *Biochemistry.* 34 (1995) 11528–1536.

[9] M.M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E.G. Duysen, O. Lockridge, Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine, *Neuroscience.* 110 (2002) 627-639.

[10] K. Kawashima, T. Fujii, Y. Watanabe, H. Misawa, Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-lymphocytes, *Life. Sci.* 62 (1998) 1701–1705.

[11] K. Kawashima, K. Yoshikawa, Y.X. Fujii, Y. Moriwaki, H. Misawa, Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells, *Life. Sci.* 80 (2007) 2314–2319.

- [12] S. Neumann, M. Razen, P. Habermehl, C.U. Meyer, F. Zepp, C.J. Kirkpatrick, et al., The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration, *Life. Sci.* 80 (2007) 2361–2364.
- [13] K. Kawashima, N. Watanabe, H. Oohata, K. Fujimoto, T. Suzuki, Y. Ishizaki, et al., Synthesis and release of acetylcholine by cultured bovine arterial endothelial cells, *Neurosci. Lett.* 119 (1990) 156–158.
- [14] M. Rosas-Ballina, K.J. Tracey, Cholinergic control of inflammation, *J. Intern. Med.* 265 (2009) 663–679.
- [15] G.L. Ellman, D.K. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.
- [16] F. Worek, U. Mast, D. Kiderlen, D. Diepold, P. Eyer, Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood, *Chim. Clin. Acta.* 288 (1999) 73–90.
- [17] P.S. Bachorik, J.J. Albers, Precipitation methods for quantification of lipoproteins, *Methods. Enzymol.* 129 (1986) 78–100.
- [18] W.T. Friedewald, R.I. Levy, D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin. Chem.* 18 (1972) 499–502.

- [19] MM. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 218–254.
- [20] C. Kluft, M.P. de Maat, Sensitive markers of inflammation make it possible to study the chronic process: the rise of interest in low levels of C-reactive protein, *Vascul. Pharmacol.* 39 (2002) 99–104.
- [21] G.J. Blake, P.M. Ridker, Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction, *J. Intern. Med.* 252 (2002) 283-294.
- [22] G.K. Hansson, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1685–1695.
- [23] A.A. Rao, G.R. Sridhar, U.N. Das, Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease, *Med. Hypotheses.* 69 (2007) 1272-1276.
- [24] L.V. Borovikova, S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G.I. Botchkina, L.R. Watkins, et al., Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin, *Nature.* 405 (2000) 458–462.
- [25] E. Giacobini, Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives, *Pharmacol. Res.* 50 (2004) 433–440.
- [26] V.P. Whittaker, How the cholinesterases got their modern names, *Chem. Biol. Interact.* (2010), doi:10.1016/j.cbi.2010.02.041.

- [27] G.I. Lunkes, F. Stefanello, D. S. Lunkes, V. M. Morsch, M.R. Schetinger, J.F. Gonçalves, Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies, *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 72 (2006) 28-32.
- [28] M.C. Corrêa, P. Maldonado, C.S. da Rosa, G.I. Lunkes, D.S. Lunkes, R.R. Kaizer, et al., Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages, *Biomed. Pharmacother.* 62 (2008) 317-324.
- [29] M.S. García-Ayllón, I. Riba-Llena, C. Serra-Basante, J. Alom, R. Boopathy, J. Sáez-Valero, Altered Levels of Acetylcholinesterase in Alzheimer Plasma, *PLoS. One.* 5 (2010) 701-712.
- [30] E.W. Randell, M.S. Mathews, H. Zhang, J.S. Seraj, G. Sun, Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome, *Clin. Chem.* 38 (2005) 799–805.
- [31] A.M. Valle, Z. Radić, B.K. Rana, J.B. Whitfield, D.T. O'Connor, N.G. Martin, et al., The cholinesterases: Analysis by pharmacogenomics in man, *Chem. Biol. Interact.* 175 (2008) 343–345.
- [32] Z.F. Wang, J. Wang, H.Y. Zhang, X.C. Tang, Huperzine A exhibits anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat model of transient focal cerebral ischemia, *J. Neurochem.* 106 (2008) 1594- 1603.
- [33] M. Reale, C. Iarlori, F. Gambi, C. Feliciani, A. Salone, L. Toma, et al., Treatment with an acetylcholinesterase inhibitor in Alzheimer patients

modulates the expression and production of the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, *J. Neurochem.* 148 (2004) 162–171

[34] C. Mioni, C. Bazzani, D. Giuliani, D. Altavilla, S. Leone, A. Ferrari, et al., Activation of an efferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats, *Crit. Care. Med.* 33 (2005) 2621-2628.

[35] D.W. Wang, R.B. Zhou, Y. Yao, Role of cholinergic anti-inflammatory pathway in regulating host response and its interventional strategy for inflammatory diseases, *Chin. J. Traumatol.* 12 (2009) 355-364.

[36] T. Bjornheden, A. Babyi, G. Bondjers, O. Wiklund, Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system, *Atherosclerosis.* 123 (1996) 43–56.

[37] R. Ohashi, H. Mu, X. Wang, Q. Yao, C. Chen, Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis, *Q. J. Med.* 98 (2005) 845–856.

[38] B.M. Everett, T. Kurth, J.E. Buring, P.M. Ridker, The Relative Strength of C-Reactive Protein and Lipid Levels as Determinants of Ischemic Stroke Compared With Coronary Heart Disease in Women, *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006) 2235-2242.

[39] R. Cui, H. Iso, H. Toyoshima, C. Date, A. Yamamoto, S. Kikuchi, et al., Serum total cholesterol levels and risk of mortality from stroke and coronary

heart disease in Japanese: The JACC study, *Atherosclerosis*. 194 (2007) 415–420.

Table 1- Clinical characteristics and cardiac biomarkers in control group (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) patients.

Variable	CT n=35	SAP n=35	ACS n=35
Age (years)	51.60 ± 2.64	63.52 ± 1.68	63.44 ± 3.04
Men	52%	63%	63%
Women	48%	37%	37%
Hypertension	-	82%	88%
Smoker	-	51%	59%
Diabetes Mellitus	-	42%	64%
Family history of CAD	-	77%	85%
CK (UI)	<232	<232	509.13 ± 35.9
CK-MB (UI)	<24	<24	74.86 ± 6.34
Troponin I (ng/ml)	<0.2	<0.2	25.40 ± 3.42

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

Table 2 – Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and glucose levels in control (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) groups.

Blood Parameters	CT (n=35)	SAP (n=35)	ACS (n=35)
Total cholesterol	178.57 ± 6.44 ^a	176.13 ± 4.44 ^a	202.76 ± 7.92 ^b
HDL-cholesterol	49.25 ± 1.93 ^a	39.40 ± 1.66 ^b	41.23 ± 1.70 ^b
LDL-cholesterol	103.04 ± 4.55 ^a	105.48 ± 5.30 ^{ab}	119.81 ± 6.16 ^b
Triglycerides	123.10 ± 5.50 ^a	145.86 ± 7.92 ^b	162.40 ± 9.81 ^b
Glucose	93.68 ± 2.04 ^a	104.60 ± 2.53 ^a	145.28 ± 8.62 ^b

Data are presented as means ± SEM. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 35$).

Figure 1

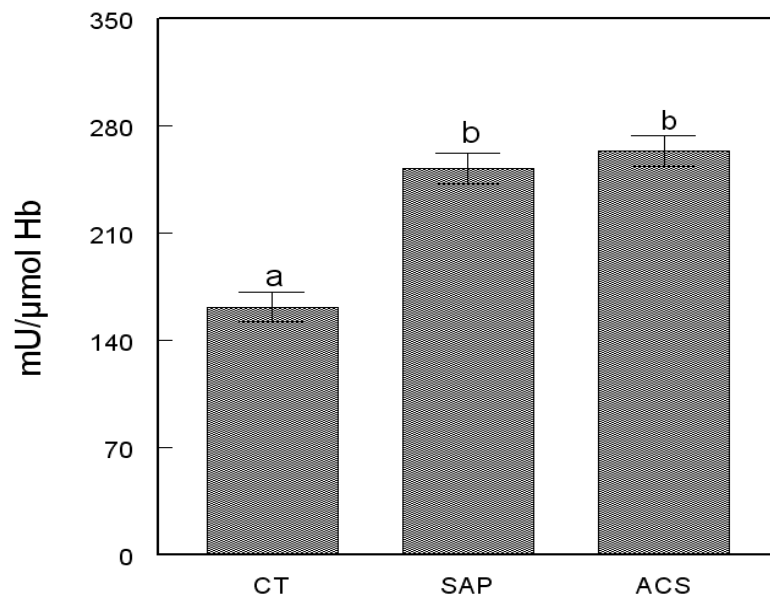


Figure 2

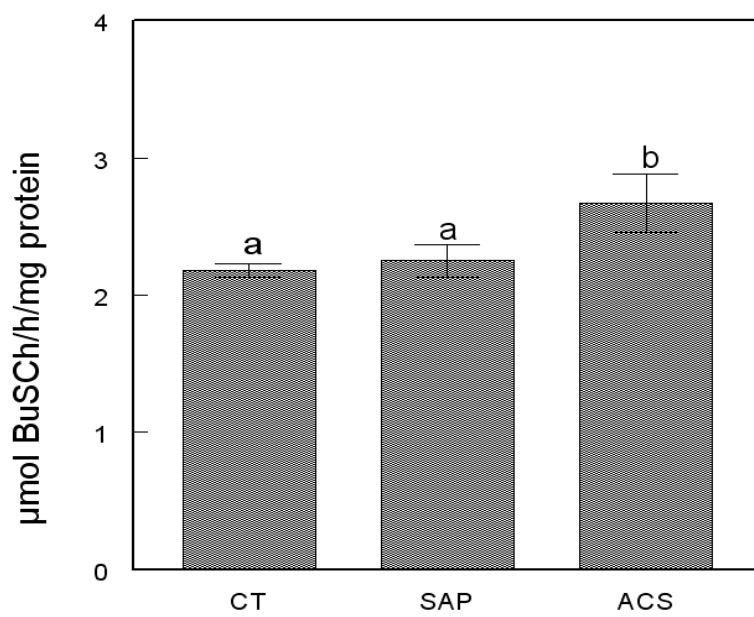


Figure 3

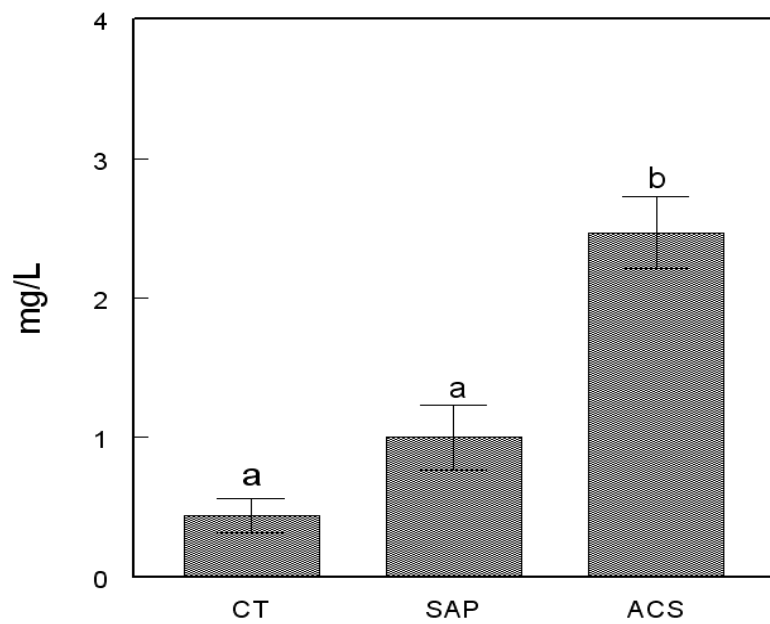


Figure 4

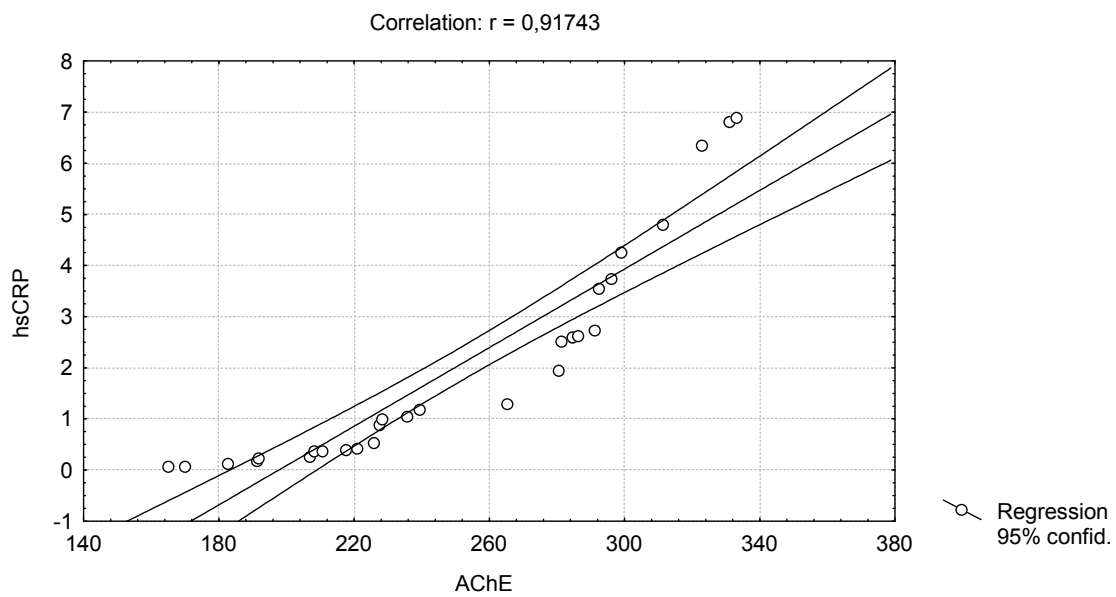
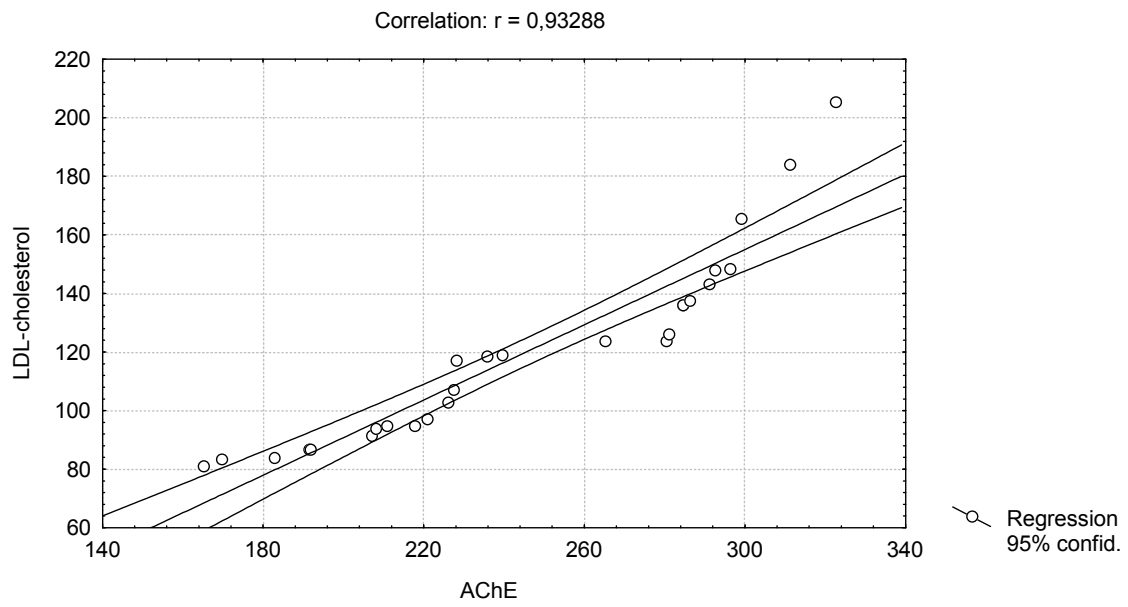


Figure 5



Legends

Figure 1- Total blood AChE activity in control (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) groups. Data are presented as means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 35$).

Figure 2 – Serum BuChE activity in control (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) groups. Data are presented as means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 35$).

Figure 3 – Levels of hsCRP in control (CT), stable angina pectoris (SAP) and acute coronary syndrome (ACS) groups. Data are presented as means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 35$).

Figure 4- Pearson's correlation between total blood AChE activity and hsCRP levels ($r = 0.92$, $P < 0.05$).

Figure 5- Pearson's correlation between total blood AChE activity and LDL-cholesterol levels ($r = 0.93$, $P < 0.05$).

4.3 Artigo 2

Estresse oxidativo versus defesas antioxidantes em pacientes com Infarto Agudo do Miocárdio

Oxidative Stress versus Antioxidant Defenses in Patients with Acute Myocardial Infarction

Margarete Dulce Bagatini, Caroline Curry Martins, Vanessa Battisti, Diogo Gasparetto, Cintia Saydelles da Rosa, Roselia Maria Spanevello, Mushtaq Ahmed, Roberta Schmatz, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch

Publicado na revista Heart and Vessels

Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction

Margarete Dulce Bagatini · Caroline Curry Martins · Vanessa Battisti · Diogo Gasparetto · Cintia Saydelles da Rosa · Roselia Maria Spanevello · Mushtaq Ahmed · Roberta Schmatz · Maria Rosa Chitolina Schetinger · Vera Maria Morsch

Received: 27 April 2009 / Accepted: 29 January 2010
© Springer 2010

Abstract Acute myocardial infarction (AMI) is a highly dynamic event, which is associated with increasing production of reactive oxygen species (ROS). The imbalance between ROS production and antioxidant defenses leads to the condition known as oxidative stress. The most widely recognized effect of increasing oxidative stress is the oxidation and damage of macromolecules, membranes, proteins, and DNA. Therefore, in this study we sought to evaluate oxidative stress and antioxidant defenses in patients with AMI. Lipid peroxidation, protein carbonyl levels, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants were assessed in samples obtained from 40 AMI patients and 40 control patients. AMI was characterized by clinical, electrocardiographic, and laboratory criteria. The control group was divided into two groups of 20 patients: a control group with healthy patients and a risk group. Our results demonstrated an increase in substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) and carbonyl protein levels in the AMI and risk groups. In addition, a positive correlation was found between TBARS, carbonyl protein levels, and troponin I in AMI patients. Surprisingly, for the enzymatic antioxidant defenses, catalase and superoxide dismutase, we observed an increase in these parameters in the AMI

and risk groups when compared with healthy patients. However, a decrease in nonenzymatic antioxidants such as vitamin C and vitamin E was observed in AMI patients when compared with the healthy group and the risk group. The increase in oxidative stress was probably a result of the elevation in ROS production due to the ischemic/reperfusion event that occurs in AMI, in addition to the decrease of nonenzymatic antioxidant defenses.

Keywords Myocardial infarction · Oxidative stress · Oxidant · Antioxidant · Enzyme

Introduction

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

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

A decrease in the blood supply to the heart caused by atherosclerosis or thrombosis is known to induce myocardial ischemia. Following ischemia, reactive oxygen species (ROS) are produced during the reperfusion phase [4]. During ischemia, mitochondrial carriers are in a reduced state. During reperfusion, the interaction between molecular oxygen

M. D. Bagatini · C. C. Martins · V. Battisti ·
C. S. da Rosa · R. M. Spanevello · M. Ahmed · R. Schmatz ·
M. R. C. Schetinger · V. M. Morsch (✉)
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e
Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS 97105-900, Brazil
e-mail: veramorsch@gmail.com

D. Gasparetto
Grupo de Pesquisa em Cardiologia, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

and the reduced respiratory chain leads to the formation of ROS [5]. However, ROS can arise from many sources, including activation of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, xanthine oxidase, inducible nitric oxide synthase, auto-oxidation of catecholamines, increased angiotensin II and aldosterone levels, and release of proinflammatory cytokines [6].

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

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

The effect of reactive species is balanced by the antioxidant action of nonenzymatic antioxidants as well as by antioxidant enzymes. The most efficient enzymatic antioxidants are superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Superoxide dismutase catalyzes the dismutation of superoxide anion (O_2^-) to H_2O_2 . Subsequently, H_2O_2 is reduced to H_2O and O_2 by peroxidases such as glutathione peroxidase or CAT [10, 11].

Vitamin C and vitamin E are important nonenzymatic antioxidant defenses. Ascorbic acid (vitamin C) that is present in the aqueous environment has multiple antioxidant properties, including the ability to regenerate α -tocopherol by reducing α -tocopheryl radicals present on the surface of membranes [12]. Vitamin E has a strong antioxidant capacity and has been used in several ischemia–reperfusion studies. It plays a major role in maintaining cell membrane integrity by limiting lipid peroxidation by ROS [13].

Inadequate antioxidant protection or excessive production of ROS create a condition known as oxidative stress, which can lead to different degrees of damage [14]. The aim of this study was to assess the relation between oxidants and antioxidant defenses (enzymatic and nonenzymatic) in patients with AMI.

Materials and methods

Patient selection

Forty patients with AMI from the Federal University of Santa Maria Hospital were selected for this study. AMI was

characterized by clinical criteria including: chest pain for more than 30 min; pain being described as heavy, squeezing, and crushing, involving the central portion of the chest and/or the epigastrium, and on occasion radiating to the arms, and associated to clinical evidence of ischemia through a history of coronary arterial disease (CAD). Electrocardiographic changes included symmetrical ST elevations of 1 mm from baseline in limb leads or of 2 mm in chest leads of T-wave inversions with or without Q waves, and changes in serum concentrations of creatine phosphokinase (CK), creatine phosphokinase MB isoform (CK-MB), and troponin I [15]. All patients received conventional therapy for AMI, including acetylsalicylic acid and clopidogrel, but did not receive vitamin or antioxidant therapies. General patient characteristics are shown in Table 1. The control group ($n = 40$) was divided into: control group I, consisting of 20 healthy individuals aged 52.08 ± 9.83 years, 55% males and 45% females, who presented normal blood pressure, were free from diabetes mellitus, alcoholism, cigarette smoking, and chronic diseases, and who had not been submitted to any pharmacological therapy during the month before the study; and control group II ($n = 20$) with risk factors, such as cigarette smoking, hypertension, and family history of heart disease. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center of the Federal University of Santa Maria, Brazil, protocol number 32/06.

Sample collection

The blood samples for the measurement of troponin I were collected upon entrance to the emergency room and at 8, 12, and every 24 h until the maximum level was reached. When the maximum level of troponin I was detected, the blood sample for analysis of the other cardiac biomarkers (CK and CK-MB) and oxidative stress parameters was collected (at approximately 72 h after the onset of chest pain) in tubes without an anticoagulant system, centrifuged at $1800 \times g$ for 10 min, the precipitate was discarded, and the serum was used to determine substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), protein carbonyl, and vitamin E and vitamin C contents. Catalase and SOD activities were determined using whole blood collected in citrated tubes and diluted to a ratio of 1:10 in saline solution. The samples that were not analyzed at that moment were kept at $-80^\circ C$ until analysis.

Cardiac biomarkers

CK and CK-MB were assayed by spectrophotometric methods using available commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil) with a Cobas Integra-400 method (Cobas,

Table 1 Clinical characteristics and cardiac biomarkers of the healthy group, risk group and Acute Myocardial Infarction (AMI) patients

Variable	Healthy group (n = 20)	Risk group (n = 20)	AMI (n = 40)
Age (years)	52.08 ± 9.83	48.73 ± 4.22	55.83 ± 9.25
Men	55%	35%	60%
Women	45%	65%	40%
Hypertension	–	45%	58%
Smoker	–	85%	70%
Family history	–	40%	60%
Previous CAD history	–	–	30%
STEMI	–	–	50%
NSTEMI	–	–	50%
Infarct-related artery			
Left anterior descending	–	–	70%
Left circumflex	–	–	50%
Right Coronary	–	–	40%
CK elevation (UI)	<232	<232	1395 ± 109.70
CK-MB elevation (UI)	<24	<24	164.76 ± 32.90
Troponins elevation (ng/ml)	<0.2	<0.2	112.31 ± 23.42

Continuous variables are presented as mean ± SEM and the other variables are shown as percentage of patients

CAD coronary arterial disease, STEMI ST-segment elevation MI, NSTEMI non-ST-segment elevation MI

Basel, Switzerland). Troponin I was determined by an immunology method (Immulite, Los Angeles, CA, USA).

Carbonylation of serum protein

The carbonylation of serum proteins was determined by a modified Levine method [16]. Firstly, from 1 ml of serum, the proteins were precipitated using 0.5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 1800×g for 5 min, discarding the supernatant. One half milliliter of 10 mmol/l 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 mol/l HCl was added to this protein precipitate and incubated at room temperature for 30 min. During incubation, the samples were mixed vigorously every 15 min. After incubation, 0.5 ml of 10% TCA was added to the protein precipitate and centrifuged at 1800×g for 5 min. After discarding the supernatant, the precipitate was washed twice with 1 ml of ethanol/ethylacetate (1:1), centrifuging out the supernatant in order to remove the free DNPH. The precipitate was dissolved in 1.5 ml of protein dissolving solution (2 g sodium dodecyl sulfate and 50 mg ethylenediamine tetraacetic acid in 100 ml 80 mmol/l phosphate buffer, pH 8.0) and incubated at 37°C for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using a spectrophotometer at 370 nm against 2 mol/l HCl. Carbonyl content was calculated by using the molar extinction coefficient (21×10^3 l/mol cm) and results were expressed as nanomoles per milligram protein.

Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS in serum samples according to a modified method of Jentzsch et al. [17]. Briefly, 0.2 ml of serum was added to the

reaction mixture containing 1 ml of 1% ortho-phosphoric acid and 0.25 ml alkaline solution of thiobarbituric acid (final volume 2.0 ml), followed by 45 min heating at 95°C. After cooling, samples and standards of malondialdehyde were read at 532 nm against the blank of the standard curve. The results were expressed as nanomoles malondialdehyde (MDA) per milliliter of serum.

Catalase and superoxide dismutase activities

The determination of CAT activity was carried out in accordance with a modified method of Nelson and Kiesow [18]. This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to CAT-dependent decomposition of hydrogen peroxide. An aliquot (0.02 ml) of blood was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was initiated by the addition of 0.07 ml in an aqueous solution of 0.3 mol/l hydrogen peroxide. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. Catalase activity was calculated using the molar extinction coefficient (0.0436 cm²/μmol) and the results were expressed as picomoles per milligram protein.

Superoxide dismutase activity measurement is based on the inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin as described by McCord and Fridovich [19]. In this method, SOD present in the sample competes with the detection system for superoxide anion. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenalin oxidation by 50%. Adrenalin oxidation leads to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. Superoxide dismutase activity is determined by measuring the rate of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction

medium containing glycine-NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM).

Serum vitamin C and vitamin E quantification

Vitamin C analysis was made by the method described by Jacques-Silva et al. [20]. The samples were deproteinized with trichloroacetic acid (TCA) 15%, using 0.5 ml of sample and 0.5 ml of TCA, vortex-mixed for 15 s, and centrifuged at $1800\times g$ for 15 min. Then 0.4 ml of supernatant was removed and incubated at 37°C in a medium containing 4.5 mg/ml dinitrophenylhydrazine, 0.6 mg/ml thiourea, 0.075 mg/ml CuSO_4 , and 0.675 mol/l H_2SO_4 . After 3 h, 1 ml of 65% H_2SO_4 was added. Then the samples were read in a spectrophotometer at 520 nm. Calibration curves with L(+)-ascorbic acid were used to determine the concentration, following the same procedure used for the samples.

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

Protein determination

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

Statistical analysis

Continuous variables were presented as mean \pm SEM and the other variables were shown as percentage of patients. Data were analyzed statistically using analysis of variance followed by the Duncan multiple test using SSPS 8.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Correlation was evaluated with the Pearson test. Differences were considered significant when the probability was $P < 0.05$.

Results

Characteristics and cardiac biomarkers

Table 1 shows the baseline characteristics and risk factors of AMI, such as cigarette smoking, hypertension, and

family history present in AMI patients. We have observed in our studies a large number of men with AMI, as previously described in the literature [3]. In the risk group, we observed a higher prevalence of smoking, followed by hypertension, and family history of ischemic heart disease. The previous CAD history was observed in 30% of AMI patients. The changes in the electrocardiogram showed that 50% of AMI patients have STEMI (ST-segment elevation MI) and 50% have NSTEMI (non-ST-segment elevation MI), and the coronary angiography documented by the Judkins technique until 72 h after the onset of AMI revealed that 70% of AMI patients have significant coronary occlusion or stenosis ($>50\%$ diameter stenosis) in the left anterior descending, 50% in the left circumflex, and 40% in the right coronary arteries. Biochemical parameters demonstrated by CK, CK-MB and troponin I values were elevated in the AMI group when compared with the two other groups (reference values <232 UI, <24 UI, <0.2 ng/ml, respectively).

Carbonylation of serum protein

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

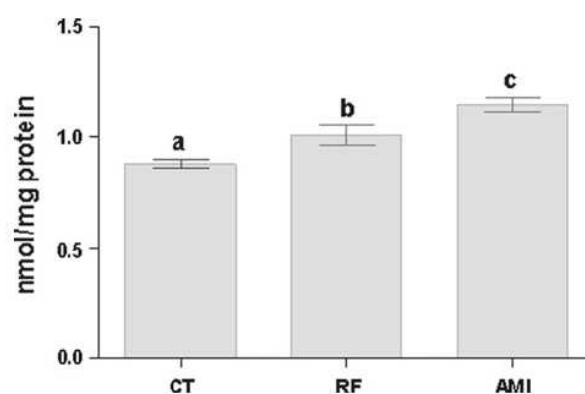


Fig. 1 Carbonyl protein content in serum of healthy control (CT), risk factor (RF), and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as mean \pm SEM nmol/mg protein. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: ^b $P < 0.02$ versus healthy control and ^c $P < 0.0001$ versus healthy control

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation estimated by TBARS levels is shown in Fig. 2. TBARS levels showed an increase in lipid peroxidation in AMI patients when compared with the healthy group ($P < 0.0001$) and the risk group ($P < 0.01$). When the risk group was compared with the healthy group, an increase in TBARS levels ($P < 0.03$) was observed. However, these levels were lower than those of the AMI patients.

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

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

Serum vitamin C and E content

Serum vitamin C content was reduced in both the AMI patients and the risk group ($P < 0.0001$) when compared with the healthy group. However, when AMI patients were compared with the risk group, there was a greater decrease in vitamin C levels in the AMI patients ($P < 0.02$).

The serum vitamin E content was reduced in both the AMI patients and the risk group ($P < 0.0001$ and $P < 0.001$, respectively) when compared with the healthy group (Table 2).

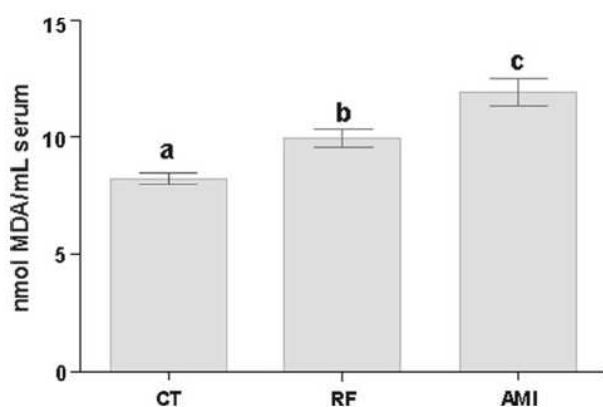


Fig. 2 TBARS levels in serum of healthy control (CT), risk factor (RF), and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as mean \pm SEM nmol MDA/ml serum. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: ^b $P < 0.03$ versus healthy control and ^c $P < 0.0001$ versus healthy control

Discussion

A decrease in blood supply to the heart due to atherosclerosis, thrombosis, or coronary artery spasm is known to induce myocardial ischemia. Although reperfusion of the ischemic myocardium during early stages is essential in preventing cardiac damage, it exerts deleterious effects after a certain critical period. These abnormalities are represented by contractile dysfunction, an increase in infarct size, ultrastructural damage, and changes in myocardial metabolism, which at a later stage lead to cell necrosis and increased ROS production [23]. Cell necrosis in AMI may be revealed through an elevation of cardiac

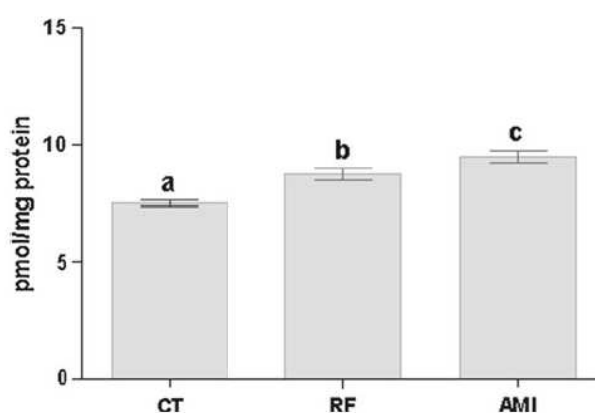


Fig. 3 Catalase activity in total blood of healthy control (CT), risk factor (RF), and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as mean \pm SEM pmol/mg protein. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: ^b $P < 0.001$ versus healthy control and ^c $P < 0.0001$ versus healthy control

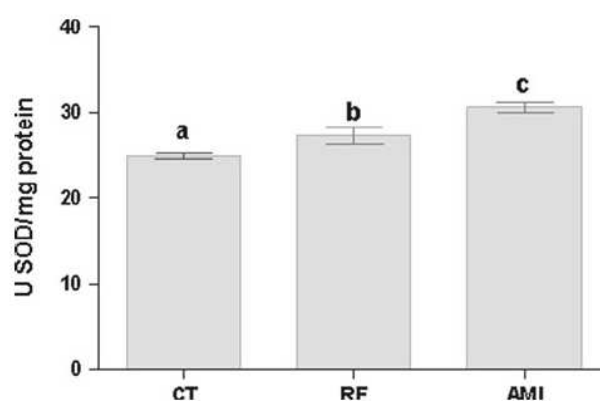


Fig. 4 Superoxide dismutase activity in total blood of healthy control (CT), risk factor (RF), and acute myocardial infarction (AMI) groups. Results are expressed as mean \pm SEM U SOD/mg protein. Groups that share different letters are statistically different by Duncan's multiple test: ^b $P < 0.03$ versus healthy control and ^c $P < 0.0001$ versus healthy control

Table 2 Comparison of nonenzymatic antioxidant levels between acute myocardial infarction (AMI) patients, risk group, and healthy group (mean \pm SEM)

Variable	Healthy group	Risk group	AMI
Vitamin C ($\mu\text{mol/l}$ serum)	64.77 \pm 3.77	48.23 \pm 4.14	38.03 \pm 2.12
p^a		<0.001	<0.0001
p^b			<0.02
Vitamin E ($\mu\text{mol/l}$ serum)	17.97 \pm 1.07	13.57 \pm 1.17	12.68 \pm 0.54
p^a		<0.001	<0.0001
p^b			0.48

^a Compared to the healthy group^b Compared to the risk group

biomarkers (CK-MB and troponins), especially troponin [24]. Our results showed that all patients had an increase in serum biomarkers, probably due to ischemia or hypoxia, which result in cellular necrosis. Troponin is released into the bloodstream from 4 to 6 h after AMI; peaks appear after approximately 18–24 h, and the levels can remain elevated for up to 14 days. Assessment of troponin by automated assay is the most sensitive and specific method for diagnosing AMI [25].

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

Protein carbonyl content is the most general indicator and by far the most commonly used marker of protein oxidation [8, 27]. Accumulation of protein carbonyls has been observed in several human diseases including coronary heart surgery [28]. In our study we observed elevated protein carbonyl levels in AMI patients, which may disclose protein damage as a consequence of AMI. ROS can damage all types of biological molecules. Oxidative damage to proteins, lipids, or DNA may be gravely deleterious and may occur concomitantly. However, proteins are likely to be the most immediate vehicle for triggering oxidative damage in cells [8].

Lipid damage induces the phenomenon known as lipid peroxidation, which culminates in MDA formation, 4-hydroxynonenal (HNE), myeloperoxidases (MPO), lipid hydroperoxides (LOOH), and F2-isoprostanes [9, 29, 30]. Myeloperoxidase is a basic heme protein that utilizes chloride as a substrate and H_2O_2 as a cosubstrate to generate reactive oxidants and radical species that oxidatively

modify lipids and proteins [31]. The F2-isoprostanes, formed by the free radical catalyzed peroxidation of phospholipid-bound arachidonic acid and released into the circulation, are considered reliable markers of oxidant stress [32]. Baseline serum levels of lipid hydroperoxides were also an independent predictor for the development of major adverse cardiovascular events [33]. Lipid peroxidation is a part of normal metabolism. Increasing lipid peroxidation is thought to be a consequence of oxidative stress [9, 34]. Our results showed an increase in lipid peroxidation through TBARS levels in AMI patients. The same results were found by Senthil et al. [35] and Chamblee et al. [36] in patients with cardiogenic shock as a complication of AMI and AMI patients, respectively. In addition, Crisby et al. [37] and Nikolic-Heitzler et al. [29] found increased levels of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) in the blood of patients with coronary heart diseases and AMI patients treated by percutaneous coronary intervention. The change in levels of anti-oxLDL antibodies could be interpreted as a consequence of oxidative stress and subsequent lipid peroxidation [29]. Lipid peroxidation has been hypothesized to be a major mechanism of ROS cell damage, which may alter intrinsic membrane properties due to physicochemical changes of oxidized lipids, or cause polymerization of membrane components [38]. Paradies et al. [39] studied reperfusion in rat heart after a period of ischemia, and found an increase in mitochondrial membrane lipid peroxidation when compared to controls. Furthermore, the damage from reperfusion was also higher than that from ischemia alone, as a result of ROS generation.

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

Free radical-scavenging enzymes such as SOD and CAT are the first line of cellular defense against oxidative injury, decomposing O_2^- and H_2O_2 before interacting to form the more reactive hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) [10]. Akila et al. [40] showed that CAT activity significantly increased after reperfusion, suggesting that the antioxidant defense system protects the cell against reactive species. High levels of

SOD and CAT were found in patients with coronary heart disease by Weinbrenner et al. [41] and Kesavulu et al. [42], respectively. We also observed an increase in SOD and CAT activities in whole blood of AMI patients. A possible explanation for this is that the rise in SOD and CAT activity could be a compensatory mechanism to prevent tissue damage caused by oxidative stress [42]. In disagreement with our results, Senthil et al. [35] and Pandey et al. [43] observed decreasing SOD and CAT activities in erythrocytes of cardiogenic shock patients and in human blood platelets in myocardial infarction. These findings may be explained by a decrease in antioxidant enzymes followed by an increase in their activity levels after reactive species generation, such as in myocardial injury followed by reperfusion [44]. Another point to be discussed here is that SOD and CAT are intracellular enzymes that can also increase due to tissue damage in AMI. In the same line of thought, Nikolic-Heitzler et al. [29], studying oxidative stress in AMI patients treated by percutaneous coronary intervention, found an increase in antioxidant capacity, and this rise was assigned to the release of intracellular antioxidants caused by tissue damage in AMI.

Vitamin C is the primary antioxidant in plasma and cells to be depleted under conditions of oxidative stress [12]. Our results, in accordance with other studies [12, 35, 45], demonstrated a decrease in vitamin C in AMI patients. This decrease could be due to the increasing utilization of vitamin C as an antioxidant defense against ROS.

Vitamin E, an important membrane constituent of cardiac muscle, is a chain-breaking antioxidant, which halts lipid peroxidation by trapping the peroxy radical. It is the only endogenous lipid soluble antioxidant and is a stabilizer of the lipid bilayer of cell membranes, where it interacts with phospholipases to reduce membrane rearrangements [46]. The low vitamin E levels found in our study are in accordance with other studies [35, 36, 45] and could be due either to their increased utilization in scavenging the oxyradicals generated or to the decreased vitamin C concentration, since there is a well-established interaction between vitamin E and vitamin C, as previously reported [12].

Recent studies with rats have demonstrated that novel compound antioxidants such as edaravone can act as a hydroxyl radical scavenger and may have antioxidant effects against both the hydroxyl radical and iron-dependent lipid peroxidation in ischemia–reperfusion injury [47]. Other studies have indicated beneficial effects of polyphenols, especially flavonoids, on ischemic/reperfused hearts and oxidative stress [48–51]. Thus, in accordance with the articles cited above a complementary therapy using different antioxidants such as polyphenols, novel bioengineered compounds, as well as cocktails of classical antioxidants could help to prevent the damage caused by

ROS in AMI, but more investigations into this are necessary.

A family history of ischemic heart disease, cigarette smoking, hypertension, and diabetes mellitus has been associated with greater risk of AMI and an increase in oxidative stress [3, 52]. We observed an increase in antioxidant enzymatic defenses and a decrease in nonenzymatic defenses in the risk group when compared to the healthy group, but this mobilization of the antioxidant system was smaller than that which occurred in AMI. This finding is probably due to the fact that damage caused by AMI was higher than the damage caused by hypertension or smoking.

To exclude a direct effect of drugs commonly used for the treatment of AMI, we investigated the influence of acetylsalicylic acid and clopidogrel in oxidative stress and antioxidants. Acetylsalicylic acid is an antiplatelet drug that interferes with the metabolism of cyclic prostanoids by irreversible inhibition of cyclo-oxygenase, which is a key enzyme in the synthesis pathway of thromboxane A₂ [3]. Clopidogrel is an antiplatelet compound that has recently been shown to be effective in the secondary prevention of cardiovascular complications of atherosclerosis. Clopidogrel is a thienopyridine, whose active metabolites are known as platelet ADP-receptor blockers [53]. At a concentration even higher than that found therapeutically, these medicines do not alter oxidative stress or antioxidants (data not shown). Therefore, these findings support the argument that the pathological condition in AMI is responsible for the increased oxidative stress levels and a mobilization of the antioxidant enzymatic system.

Taken together, these results suggest that an increase of oxidative stress in AMI patients occurred as a result of an imbalance between oxidants and antioxidants. In addition, the oxidative stress observed in AMI patients was not only due to residual oxidative stress caused by risk factors or medicines utilized by these patients, but also due to the pathology itself.

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

References

1. Hackam DG, Anand SS (2003) Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA* 290:932–940
2. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C (2002) Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. *Heart* 88:119–124

3. Kasper DN, Braunwald E, Fauci AS, Hauser S, Longo DL, Jameson JL (2006) Harrison medicina interna, 16th ed edn. Academic Press, Rio de Janeiro
4. Epat NJ, Nelton WS (2000) Oxygen free radicals, oxidative stress, and antioxidants in critical illness. *Support Line* 22:11–20
5. Kasparova S, Brezova V, Valko M, Horecký J, Mlynárik V, Liptaj T, Vancová O, Ulicná O, Dobrota D (2005) Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem Int* 46:601–611
6. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H (2002) Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. Role of xanthine oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 106:3073–3078
7. Giordano FJ (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115:500–508
8. Donne ID, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329:23–38
9. Lazzarino G, Raatikainen P, Nuutinen M, Nissinen J, Tavazzi B, Di Piero D, Giardina B, Peuhkurinen K (1994) Myocardial release of malondialdehyde and purine compounds during coronary bypass surgery. *Circulation* 90:291–297
10. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hatac T, Makino N (2000) Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 47:446–456
11. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford
12. Frei B, England L, Ames BN (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci* 88:6377–6381
13. Canbaz S, Duran E, Ege T, Sunar H, Cikirikcioglu M, Acipayam M (2003) The effect of intracoronary administration of vitamin E on myocardial ischemia–reperfusion injury during coronary artery surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 51:57–61
14. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ (2005) Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 100:179–190
15. Thygesen K, Alpert JS, White HD (2007) Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 50:2173–2195
16. Levini RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464–478
17. Jentzsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 20:251–256
18. Nelson DP, Kiesow LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* 49:474–478
19. Mc Cord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049–6055
20. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EMM, Rocha JBT (2001) Diphenil diselenide and ascorbic changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacolol Toxicol* 88:119–125
21. Hansen LG, Warwick WJ (1969) A fluorometric micromethod for serum vitamins A and E. *Am J Clin Pathol* 51:538–541
22. 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
23. Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E (1983) Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 68:8–15
24. Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, Fischer GA, Fung AY, Thompson C, Wybenga D, Braunwald E (1996) Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 335:1342–1349
25. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP (2000) Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 36:959–969
26. Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247
27. Chevon M, Berenshtein E, Stadtman ER (2000) Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 33:99–108
28. Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Sitte N, Grune T (1999) Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med* 27:1080–1086
29. Nikolic-Heitzler V, Rabuzin F, Tatzber F, Vrkic N, Bulj N, Borovic S, Wonisch W, Sunko BM, Zarkovic N (2006) Persistent oxidative stress after myocardial infarction treated by percutaneous coronary intervention. *J Exp Med* 210:247–255
30. Leopold JA, Loscalzo J (2009) Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 47:1673–1706
31. Nauseef WM, Malech HL (1986) Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. *Blood* 67:1504–1507
32. Morrow JD, Minton TA, Badr KF, Roberts LJ (1994) Evidence that the F₂-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F₂ alpha, is formed in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1210:244–248
33. Walter MF, Jacob RF, Bjork RE, Jeffers B, Buch J, Mizuno Y, Mason RP (2008) Circulating lipid hydroperoxides predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: the PREVENT Study. *J Am Coll Cardiol* 51:1196–1202
34. Kumari SS, Menon VP (1987) Changes in concentrations of lipid peroxides and activities of superoxide dismutase and catalase in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Ind J Exp Biol* 25:419–423
35. Senthil S, Veerappan RM, Ramakrishna RM, Pugalendi KV (2004) Oxidative stress and antioxidants in patients with cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 348:131–137
36. Chamblee BB, Timm TC, Hunsaker LA, Vander Jagt DL (2000) Relationship of oxidative stress indices to decreased LDL-cholesterol after acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 23:423–426
37. Crisby M, Kublickiene K, Henareh L, Agewall S (2009) Circulating levels of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein and C-reactive protein levels correlate with endothelial function in resistance arteries in men with coronary heart disease. *Heart Vessels* 24:90–95
38. Esterbauer H, Shauer RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:28–81
39. Paradies G, Petrosillo G, Pistolesi M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero F (1999) Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 27:42–50
40. Akila BD, Vishwanath P, D'souza V (2007) Oxidative injury and antioxidants in coronary artery bypass graft surgery: Off-pump CABG significantly reduces oxidative stress. *Clin Chim Acta* 375:147–152
41. Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, Fitó M, Tomás M, Sentí M, Bruguera J, Marrugat J (2003) High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis* 168:99–106

42. Kesavulu MM, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G, Apparao C (2001) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pr* 53:33–39
43. Pandey NR, Kaur G, Chandra M, Sanwal GG, Misra MK (2000) Enzymatic oxidant and antioxidants of human blood platelets in unstable angina and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 76:33–38
44. Zhou X, Zhai X, Ashraf M (1996) Direct evidence that initial oxidative stress triggered by preconditioning contributes to second window of protection by endogenous antioxidant enzyme in myocytes. *Circulation* 93:1177–1184
45. Singh RB, Pella D, Neki NS, Chandel JP, Rastogi S, Mori H, Otsuka K, Gupta P (2004) Mechanisms of acute myocardial infarction study (MAMIS). *Biomed Pharmacother* 58:111–115
46. Janero DR, Burghardt B (1989) Cardiac membrane vitamin E and malondialdehyde levels in heart muscle of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 24:33–38
47. Yamazaki K, Miwa S, Toyokuni S, Nemoto S, Oriyhan W, Takaba K, Saji Y, Marui A, Nishina T, Ikeda T, Komeda M (2009) Effect of edaravone, a novel free radical scavenger, supplemented to cardioplegia on myocardial function after cardioplegic arrest: in vitro study of isolated rat heart. *Heart Vessels* 24:228–235
48. Yamazaki KG, Romero-Perez D, Barraza-Hidalgo M, Cruz M, Rivas M, Cortez-Gomez B, Ceballos G, Villarreal F (2008) Short and long term effects of (–)-epicatechin on myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H761–H767
49. Ikizler M, Erkasap N, Dernek S, Kural T, Kaygisiz Z (2007) Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment. *Anadolu Kardiyol Derg* 7:404–410
50. Napoli C, Balestrieri ML, Lerman VSLO, Crimi E, Schiano GRC, D'Armiento LSFP (2008) Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis. *Heart Vessels* 23:124–133
51. Bertelli AA, Das KD (2009) Grapes, wines, resveratrol and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol* 54:468–476
52. Fearon IM, Faux SP (2009) Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol* 47:372–381
53. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP, Picard C (2002) Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 30:1288–1295

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o envolvimento de enzimas que degradam nucleotídeos de adenina (ectonucleotidases) e ésteres de colina e o estresse oxidativo em pacientes com CI. As ectonucleotidases são enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares para seus respectivos nucleosídeos (ROBSON et al., 2006), contribuindo dessa forma para o equilíbrio dos eventos pró-trombóticos. A AChE e a BuChE são responsáveis pela degradação de ésteres de colina como a ACh. Uma vez que a ACh desempenha importante papel anti-inflamatório acredita-se que a atividade das enzimas AChE e BuChE poderia ser um regulador intrínseco da inflamação (DAS, 2007; ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009). O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção e a degradação de espécies reativas, levando a efeitos deletérios em todo o organismo (DHALLA et al., 2000).

Os pacientes com CI são classificados em dois grupos: SCA e AE. Em ambos os grupos, as plaquetas são os componentes do sangue mais importantes na regulação da formação do trombo por liberarem substâncias ativas como o ADP e o ATP (BAKKER et al., 1994; PINSKY et al., 2002). Uma vez que esses nucleotídeos estão presentes no meio extracelular, eles podem contribuir para alterações na agregação plaquetária (BAKKER et al., 1994; SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997). Os níveis extracelulares de nucleotídeos de adenina são regulados pelas ectonucleotidases (SCHETINGER et al., 2007; YEGUTKIN, 2008).

Os resultados obtidos demonstraram um aumento na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP no grupo de pacientes com SCA. No grupo de pacientes com AE observou-se um aumento significativo apenas na hidrólise do nucleotídeo AMP. Esses achados sugerem um aumento na atividade da NTPDase e 5'-Nucleotidase, uma vez que essas enzimas são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP (MARCUS et al., 2003). Um aumento na atividade da NTPDase e 5'-Nucleotidase pode sugerir que o estado patológico criado na CI leva a um aumento na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP com o objetivo de aumentar os níveis de adenosina. A adenosina é uma importante molécula que atua na regulação do

tônus vascular e da função plaquetária (PILLA et al, 1996). Esses dados corroboram os resultados anteriores em pacientes com IAM, onde se observa um aumento na hidrólise de nucleotídeos de adenina como uma resposta orgânica compensatória ao IAM (BAGATINI et al., 2008).

Um aumento na atividade da enzima E-NPP foi observado, tanto em pacientes com AE quanto com SCA. No entanto, ocorreu um decréscimo significativo na atividade da ADA nos dois grupos de pacientes estudados. Esses resultados reforçam os dados encontrados acima, sugerindo uma resposta orgânica compensatória do organismo frente ao momento de isquemia que ocorre na CI. Um aumento na atividade da E-NPP poderia levar a uma maior disponibilidade de AMP (ação "NTPDase-like") (YEGUTKIN, 2008), que através da ação da enzima 5'-Nucleotidase pode ser transformado em adenosina (SÉVIGNY et al., 2002). A adenosina é uma importante molécula cardioprotetora, que é rapidamente degradada até inosina e hipoxantinas pela ação da ADA (SHANJUKUMAR & SHARMA, 2000). A inibição dessa enzima resultou em maiores níveis de adenosina circulante exercendo seus efeitos cardioprotetores.

Comparando-se o aumento das atividades das enzimas NTPDase e E-NPP, observa-se um aumento significativo na atividade da enzima E-NPP tanto em pacientes com AE como em pacientes com SCA, diferindo dos resultados encontrados para a enzima NTPDase, onde ocorreu um aumento significativo somente em pacientes com SCA, essa diferença entre as atividades das duas enzimas pode estar ocorrendo devido à enzima E-NPP utilizar outros substratos além dos nucleotídeos ATP e ADP.

Em relação à agregação plaquetária observou-se um decréscimo na agregação dos pacientes com AE e SCA quando foi utilizado o ADP e o colágeno como agonistas, em diferentes concentrações. Esses resultados sugerem uma resposta positiva ao tratamento com antiagregante plaquetários como o ácido acetilsalicílico (AAS) e o clopidogrel. O AAS interfere com o metabolismo das prostaglandinas por inibição irreversível das ciclooxigenases, as quais atuam como enzimas chaves na síntese de tromboxano A₂ (KASPER et al., 2006). O clopidogrel é um antiplaquetário da classe dos tienopiridinos cujo metabólito ativo atua no bloqueio dos receptores de ADP na membrana das plaquetas (TENDERA & WOJAKOWSKI, 2003). Entretanto, quando o AAS

e o clopidogrel foram testados *in vitro* sobre a agregação plaquetária observou-se uma diminuição da agregação plaquetária menor do que aquela observada nos pacientes. Esses resultados sugerem uma possível ação da adenosina circulante em virtude do decréscimo da atividade da ADA.

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

A idéia de que a inflamação está presente nas DCV foi expressa por Virchow antes mesmo de 1856, mas somente a partir de 1994 que a inflamação de baixo grau tornou-se o foco como preditor de risco para DCV (KLUFT & DE MAAT, 2002). Atualmente o processo inflamatório é reconhecido como um ponto chave na patogênese da aterosclerose e suas complicações (BLAKE & RIDKER, 2002). Estudos recentes demonstraram que a ACh, o principal neurotransmissor vago, tem importantes ações anti-inflamatórias (DAS, 2007; RAO et al., 2007; ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009). Esta via colinérgica anti-inflamatória mediada pela ACh atua inibindo a produção de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e suprime a expressão do fator nuclear kappa-B (NF-kB) (BOROVIKOVA et al., 2000). No entanto, a ACh é rapidamente hidrolisada por enzimas como a AChE e BuChE (HOSEA et al., 1995; MESULAM et al., 2002). Assim, um aumento na atividade das enzimas AChE e BuChE poderia levar à redução dos níveis de ACh. Isto leva a uma redução nas ações anti-inflamatórias exercida pela ACh e aumento no processo inflamatório (RAO et al., 2007). Os resultados obtidos mostraram um aumento na atividade da AChE em pacientes com AE e SCA, enquanto a atividade BuChE foi elevada apenas em pacientes com SCA. Um aumento na atividade da BuChE e da AChE em soro e em sangue total, respectivamente, pode refletir indiretamente níveis reduzidos de ACh que, por sua vez, irá reforçar eventos inflamatórios locais e sistêmicos, devido à ausência do controle de retroalimentação negativa exercida pela ACh (RAO et al., 2007). Segundo Rosas Ballina (2009), considerando o efeito anti-inflamatório da ACh,

é considerável que a atividade da AChE é um regulador intrínseco da inflamação, uma vez que a AChE é específica para a hidrólise da ACh. Neste contexto, as alterações nas colinesterases observadas nos pacientes deste estudo podem reforçar o processo inflamatório já existente nesta patologia.

Estudos prévios em pacientes com diabetes mellitus (LUNKES et al., 2006), isquemia cerebral (CORRÊA et al., 2008), doença de Alzheimer (RAO et al., 2007; GARCÍA-AYLLÓN et al., 2010) e síndrome metabólica (RANDELL et al., 2005) revelaram uma relação entre as colinesterases e doenças inflamatórias. Rao et al. (2007) propõem que o aumento da atividade da AChE e BuChE na doença de Alzheimer e diabetes mellitus tipo 2 revela um processo inflamatório e pode servir como marcador para prever o desenvolvimento da doença. Correa et al. (2008) sugerem que o aumento na atividade da AChE eritrocitária na isquemia aguda pode estar associada com a presença de mediadores inflamatórios em um evento clínico agudo. Nessa linha de raciocínio Valle et al. (2008) observaram correlações significativas entre as atividades de colinesterases e variáveis associadas com doenças cardiovasculares e da síndrome metabólica.

Outro importante biomarcador de inflamação é a PCR. A PCR-us é uma proteína altamente conservada no plasma e um marcador de inflamação que recentemente emergiu como um importante fator de risco cardiovascular (CALABRÒ et al., 2009). As concentrações da PCR-us estão associadas com o risco de eventos ateroscleróticos na população em geral e mostra um valor preditivo mesmo em termos de prevenção secundária, tanto em pacientes com AE quanto em pacientes com SCA (DHINGRA et al., 2007; CALABRÒ et al., 2009). Neste estudo, observou-se um aumento nos níveis de PCR-us em pacientes com SCA, sendo que o mesmo não foi observado em pacientes com AE. Por outro lado, um aumento na atividade da AChE foi encontrada nos dois grupos estudados. Então, poderia ser a AChE mais sensível para a inflamação de baixo grau, em pacientes com CI, que a PCR-us? Com estes resultados, podemos sugerir que a AChE poderia atuar como bom marcador de baixo grau de inflamação sistêmica, uma vez que foi encontrada uma correlação positiva entre PCR-us e AChE, e além disso, a AChE em sangue total é facilmente obtida e mensurável.

Associada aos níveis de PCR a hiperlipidemia é um fator de risco bem conhecido para o desenvolvimento da aterosclerose. O acúmulo de partículas menores e mais densas de LDL na parede do vaso é considerado um dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo desenvolvimento da aterosclerose (BJORNHEDEN et al., 1996). O presente estudo demonstrou um aumento nos níveis de LDL-colesterol e diminuição nos níveis de HDL-colesterol em pacientes com CI. Estes resultados confirmam a literatura (EVERETT et al., 2006; CUI et al., 2007), e mostram uma correlação positiva entre o LDL-colesterol e AChE em pacientes com SCA. Uma vez que o LDL-colesterol está associado a aterosclerose e ao processo inflamatório, uma correlação positiva entre o LDL-colesterol e a AChE poderia reforçar os resultados acima, e demonstrar que a AChE está associada com a inflamação de baixo grau.

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

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

A determinação do conteúdo de proteína carbonil é um dos mais utilizados indicadores de oxidação proteica (CHEVION et al., 2000; DONNE et

al., 2003). Neste estudo observou-se elevados níveis de proteína carbonil em pacientes com IAM quando comparados com o grupo controle. Níveis aumentados de proteína carbonil também foram verificados em nosso grupo de pesquisa em diferentes patologias como câncer (MALDONADO et al., 2006), insuficiência renal crônica (SILVA et al., 2007), acidente vascular cerebral (CORREA et al., 2008) e leucemia linfoblástica aguda (BATTISTI et al., 2008) demonstrando que o conteúdo de proteína carbonil pode ser utilizado como marcador de dano oxidativo protéico em muitas patologias, incluindo o IAM.

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

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

Também colaboram na proteção do organismo frente aos danos causados pelas EROs as defesas antioxidantes não-enzimáticas. Entre elas

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

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

Dessa forma, concluí-se que a CI resulta tanto em danos oxidativos e inflamatórios como mobilização das defesas do organismo para uma resposta compensatória.

6. CONCLUSÕES

- O aumento observado nas atividades das enzimas NTPDase, E-NPP e 5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com CI e a diminuição na atividade da enzima ADA sugere uma resposta orgânica compensatória, com o objetivo de manter os níveis de adenosina, tendo em vista o papel cardioprotetor da mesma.
- A diminuição na agregação plaquetária observada nos pacientes com CI pode estar ocorrendo devido à ação da adenosina circulante, além do efeito dos medicamentos utilizados no tratamento dessa patologia, considerando o papel antiagregante dos mesmos.
- Níveis aumentados de PCR-us e do perfil lipídico revelam a presença de processo inflamatório nesses pacientes.
- O aumento na atividade das enzimas AChE e BuChE indiretamente reflete níveis reduzidos de ACh, e possível relação da atividade da AChE e da BuChE como bons marcadores de processo inflamatório de baixo grau.
- Os níveis aumentados de TBARS e conteúdo de proteína carbonil sugerem aumento na formação de EROs no IAM, principalmente no momento de isquemia/reperfusão.
- O aumento dos indicadores de defesa antioxidante enzimáticas, estimados pela atividade da SOD e CAT sustenta a ocorrência do estresse oxidativo nos pacientes com diagnóstico de IAM. Esses antioxidantes poderiam atuar como um mecanismo compensatório frente ao aumento do estresse oxidativo.
- A diminuição das defesas antioxidantes não-enzimáticas reveladas pelos níveis de vitaminas C e E representa um maior consumo das mesmas

durante o IAM, o que demonstra haver produção aumentada de EROs nessa patologia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGTERESCH, H. J. et al. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs**, v. 58, p. 211–232, 1999.

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

ALDUNATE, R. et al. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Research Reviews**, v. 47, p. 96-104, 2004.

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

ALPERT, J.S. et al. Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. **Journal of American College of Cardiology**, v. 36, p. 959–69, 2000.

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

ALTAMIRANO, C. V.; BARTELS, C. F.; LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wildtype enzyme. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, p. 869-877, 2000.

ALTAMIRO, C.V., LOCKRIDGE, O. Association of tetramers of human butyrylcholinesterase is mediated by conserved aromatic residues of the carboxy terminus. **Chemico Biological Interactions**, v. 119, p. 53-60, 1999.

ALTMAN, R. et al. Thrombosis y hemostasia, **Revista Iberoamericana** v. 3, p. 20-21, 1995.

ANTMAN, E.M.; ANBE, D.T; ARMSTRONG, P.W. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Journal of the American College Cardiology**, v. 44, p. 1-211, 2004.

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

APPLE, F.S. et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 810–824, 2005.

ARAÚJO, M.C. et al. Enzymes that hydrolyze nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1740, p. 421– 426, 2005.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules & Diseases** v. 36, p.217-222, 2006.

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

AZZI, A. et al. Vitamin E: A sensor and an information transducer of the cell oxidation status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1337S-1346S, 1995.

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

BAGATINI, M.D. et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1181-1185, 2008.

BAKKER, W.W. et al. Platelets and ectonucleotidases. **Platelets**, v. 5, p. 121–129, 1994.

BARREIROS, L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 1, p. 113-123, 2006.

BATLOUNI, M. Ativação plaquetária e trombose arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 60, n.6, p. 425-43, 1993.

BATTISTI V. et al. Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clinica Chimica Acta** v.402, p.114–118, 2009.

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

BELL, S.J.; GROCHOSKI, G.T. How safe is vitamin E supplementation? **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 48, p. 760 – 774, 2008.

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

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

BHATT, D. L. et al. 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.

BJORNHEDEN, T. et al. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. **Atherosclerosis**, v. 123, p. 43–56, 1996.

BLAKE, G.J.; RIDKER, P.M. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. **Journal of Internal Medicine**, v. 252, p. 283-294, 2002.

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

BOEKHOLDT, S.M. et al. C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: The EPIC-Norfolk prospective population study 1993-2003. **Atherosclerosis**, v. 187, p. 415, 2006.

BOLLI, R. et al. Demonstration of free radical generation in “stunned” myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82, p. 476-485, 1988.

BONITHON-KOPP, C. et al. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on Carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y: The EVA Study. Etude sur le Vieillissement Arteriel. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 121-7, 1997.

BOOTH, G.L. et al. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: A population – based retrospective cohort study. **Lancet** v. 368, p. 29, 2006.

BOROVIKOVA, L.V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, p. 458–462, 2000.

BOURNE, Y. et al. Structural insights into conformational flexibility at the peripheral site and within the active center gorge of AChE. **Chemico-Biological Interactions**, v. 157-158, p. 159-165, 2005.

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

BRAUWNWALD, E.; ZIPES, D.P.; LIBBY, P. **Tratado de Medicina Cardiovascular**, 6ª Ed, São Paulo: Roca, 2003.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p.31–304, 2004.

CALABRÒ, P.; GOLIA, E.; YEH, E.T. CRP and the risk of atherosclerotic events. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, p. 79-94, 2009.

CHAMBLEE, B.B. et al. Relationship of oxidative stress indices to decreased LDL-cholesterol after acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v. 23, p, 423-426, 2000.

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

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **The Biochemical Journal** v. 260, p. 625–634, 1989.

CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 39, p. 841-852, 2005.

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

CHOI, D. Ischemic heart diseases: Current treatments and future. **Journal of Controlled Release**, v. 140, p. 194–202, 2009.

COKUGRAS, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 28, p. 54-61, 2003.

CORRÊA C. et al. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 317- 324, 2008.

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

CUI R. et al. Serum total cholesterol levels and risk of mortality from stroke and coronary heart disease in Japanese: The JACC study. **Atherosclerosis**, v. 194, p. 415–420, 2007.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p.23-38, 2003.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.10, p.389-406, 2006.

DAS, U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, v. 13(12), p. 214-221, 2007.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**, v. 68, p. 1545-55, 2001.

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

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

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

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

DELANTY, N. et al. 8-epi PGF_{2a} generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. **Circulation**, v. 95, p. 2492- 2499, 1997

DHALLA, N.S. et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 446–456, 2000.

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

DHINGRA, R. et al. C-Reactive Protein, Inflammatory Conditions, and Cardiovascular Disease Risk. **The American Journal of Medicine**, v. 120, p. 1054-1062, 2007.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, p.587-600, 2001.

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

DUARTE, M.M.F. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS Journal**, v. 274, p. 2707-2714, 2007.

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

DVIR, H. et al. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187(1-3), p. 10-22, 2010.

ENJYOJI, K. et al. Target disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase result in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v.5, p. 1010-1017, 1999.

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

EVERETT, B.M. et al. The Relative Strength of C-Reactive Protein and Lipid Levels as Determinants of Ischemic Stroke Compared With Coronary Heart Disease in Women. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, p. 2235-2242, 2006.

EYRE, L.; GAMLIN, F. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia and intensive care medicine**, v. 11:6, p. 244-246, 2010.

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

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

FRAGOSO-LONA, J.M.; et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory markers in coronary artery disease and acute ischemic coronary syndrome. **Archivos de cardiologia de Mexico**, v. 79 (1), p. 54-62, 2009.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 283-294, 1997.

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

FÜRSTENAU, C.R. et al. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as a part of multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**, v.17, p.84-91, 2006.

FUSTER, V. et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *The New England Journal of Medicine*, v. 326(4), p. 242-250, 1992.

GALKINA, E.; LEY, K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. **Annual Review of Immunology**, v. 27p. 165-197, 2009.

GARCÍA-AYLLÓN, M.S. et al. Altered Levels of Acetylcholinesterase in Alzheimer Plasma. **PLoS. One**, v. 5, p. 701-712, 2010.

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

GHOSH, S. et al. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. **American Journal of Physiology**, v. 289, p. 768-776, 2005.

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

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

GODING, J.W.; HOWARD, M.C. Ecto-enzymes of lymphoid cells. **Immunological Reviews**, v. 161, p. 5-10, 1998.

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

GRECH, E.D.; JACKSON, M.; RAMSDALE, D.R. Reperfusion injury after acute myocardial infarction. **British medical journal**, v. 310, p. 477-478, 1995.

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

HAIDER, A.W. et al. Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and pulse pressure as predictors of risk for congestive heart failure in the Framingham Heart Study. **Annals of internal medicine**, v.138, p. 10, 2003.

HAJJAR, I.; KOTCHEN, J.M.; KOTCHEN, T.A. Hypertension: trends in prevalence, incidence, and control. **Annual Review of Public Health**, v. 27, p. 465-490, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society transactions**, v.35, p.1147-1150, 2007.

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

HANSSON, G.K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 508–519, 2006.

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

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A.; ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v. 196, p. 1296–1298, 1962.

HASKO G., CRONSTEIN B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity, **Trends in immunology**, v. 25, p. 33–39, 2004.

HASKO, G. et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature**, v. 7, p 759–770, 2008.

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

HERRMANN, J.L.V.; SOUZA, J.A.M. “Check-up” Cardiológico: avaliação clínica e fatores de risco. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 16, p. 127–137, 2006.

HOSEA, N.A.; BERMAN, H.A.; TAYLOR, P. Specificity and orientation of trigonal carboxi esters and tetrahedral alkylphosphonyl esters in cholinesterases. **Biochemistry**, v. 34, p. 11528–11536, 1995.

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

IWAKI-EGAWA S., YAMAMOTO T., WATANABE Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. **Biological Chemistry**, v. 387; p 319–321, 2006.

JAFFE, A.S.; BABUIN, L.; APPLE, F.S. Biomarkers in acute cardiac disease: The present and the future. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, p. 1, 2006.

JOHNSON, G.; MOORE, S.W. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at peripheral anionic site. **Biochemical and Biophysical Research Communicatins**, v. 258, p. 758-762, 1999.

KASHYAP, M. K. et al. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, p. 89-99, 2005

KASPAROVA, S. et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. **Neurochemistry International**, v. 46, p. 601–611, 2005.

KASPER, D.N. **Harrison medicina interna**. Rio de Janeiro. Academic Press; 2006. p 1514-1530.

KAUFFMAN, P. **Doença Aterosclerótica Periférica**. 2ª edição. São Paulo: BBS Editora, 2007.

KAWASHIMA, K. et al. Synthesis and release of acetylcholine by cultured bovine arterial endothelial cells. **Neuroscience letters**, v. 119, p.156–158, 1990.

KAWASHIMA, K. et al. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. **Life Science**, v. 80, p. 2314–2319, 2007.

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

KESAVULU, M.M. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 53, p. 33-39, 2001.

KINUGAWA, T. et al. Catabolism of Adenine Nucleotides Favors Adenosine Production Following Exercise in Patients with Chronic Heart Failure. **Journal of Cardiac Failure**, v. 12(9), p. 720-725, 2006.

KLONER, R.A. et al. Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. **Circulation**, v. 68, p. 18-15, 1983.

KLUFT, C.; DE MAAT, M.P. Sensitive markers of inflammation make it possible to study the chronic process: the rise of interest in low levels of C-reactive protein. **Vascular pharmacology**, v. 39, p. 99–104, 2002.

KRIZ, N.; RINDER, C.S.; RINDER, H.M. Physiology of Hemostasis: With Relevance to Current and Future Laboratory Testing. **Clinics in laboratory medicine**, v. 29, p. 159–174, 2009.

KRUTH, H.S.; Sequestration of aggregated low-density lipoproteins by macrophages. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, p. 483-488, 2002.

KUKULSKI, F. et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonist by NTPDase 1,2,3 and 8. **Purinergic Signalling**, v.1, p.193-204, 2005.

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

LANAS, F. et al. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the INTERHEART Latin American study. **Circulation**, v. 115, p. 1067-1074, 2007.

LANDMESSER, U. et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. Role of xanthine oxidase and extracellular superoxide dismutase. **Circulation**, v. 106, p. 3073–3078, 2002.

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

LEAL, D. et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39 - positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1746, p. 129-134, 2005.

LEE, G.R. et al. **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998, v I e II, p.2623.

LÉON, C. et al. The P2Y receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. **FEBS Letters**, v. 403, p. 26-31, 1997.

LEOPOLD, J.A; & LOSCALZO, J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1673–1706, 2009.

LIBBY, P. **Braunwald – Tratado de doenças cardiovasculares**. Rio de Janeiro, Elsevier 2010. p.1003-1026.

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

LOEWI, O. Über humerole übertragbarkeit der herznervenwirkung. I. Mitteilung. Pflügers Archiv: **European journal of physiology**, v. 189, p. 239–242, 1921.

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

LORENZI, T.F. et al. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3^a ed., Ed. Medsi., Rio de Janeiro, 2003.

LUNKES, G.I. et al. Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 72, p. 28–32, 2006.

LUNKES, G.I. et al. 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(2801), p. 233-241, 2000.

LYRA, R.; CAVALCANTI, N. **Diabetes mellitus**. 1^a ed., Ed. Diagraphic, Rio de Janeiro, 2006.

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

MAGGIRWAR, S.B. et al. Adenosine acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n.2, p. 508-515, 1994.

MALDONADO, P.A. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. **Clinical Biochemistry**, v. 41(6), p. 400-406, 2008.

MALDONADO, P.A. et al. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. **Biomedicine & pharmacotherapy**, 2010, In press.

MALDONADO, P.A. et al. Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p. 174-78, 2006.

MARCUS, A.J. et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **J Thromb Haemost**, v. 1, p. 2497-2509, 2003.

MAREZIN, N. et al. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 420, p. 222-236, 2003.

MASSON, P. et al. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with Ω loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1544, p. 166-176, 2001.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 988, p. 258-266, 1989.

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

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

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

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

MEDEIROS, A.R.C. et al. **Novas estratégias na reperfusão química do infarto agudo do miocárdio**. Rio de Janeiro, Livraria e Editora REVINTER Ltda, 2001.

MESULAM, M.M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110(4), p. 627-639, 2002.

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 189, p. 1280-1286, 1992.

MINAMINO, T. et al. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. 238-244, 1996.

MINORS, D.S. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia and intensive care medicine**, vol 8:5, p. 214 -216, 2007.

MUENSCH, H.; GOEDDE, H-W.; YOSHIDA, A. Human serum cholinesterase subunits and number of active sites of the major component. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 70, p. 217-223, 1976.

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

NATHAN, D.M. et al. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 2294, 2003.

NEUMANN, S. et al. The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. **Life Science**, v. 80, p. 2361–2364, 2007.

NICOLET, Y. et al. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. **The journal of biological chemistry**, v. 278 (42), p. 41141–41147, 2003.

NISSEN, S.E. et al. Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: The CAMELOT study: A randomized controlled trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 292, p. 2217, 2004.

NOGUEIRA, D. et al. Reconhecimento, tratamento e controle da hipertensão arterial: Estudo Pró-Saúde, Brasil. **Pan American journal of public health**, v. 27(2), p. 103-109, 2010.

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

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

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

PATRICK, G.L. **Medicinal Chemistry**, second ed., Oxford, 2001, pp. 432-482.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225–230, 1996.

POLANCZYK, C.A. Cardiovascular risk factors in Brazil. The next 50 years! **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p. 199-201, 2005.

PORTO, C.C. **Doenças do Coração: Prevenção e Tratamento**. Rio de Janeiro: Segunda edição, Editora Guanabara Koogan, 2005.

PRADO, M. A. M. et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry Internacional**, v. 41, p. 291-299, 2002.

RAKONCZAY, Z. et al. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chemical Biological Interactions**, v.157-158, p. 233-238, 2005.

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

RAMKUMAR, V. et al. Adenosine antioxidant enzymes and cytoprotection. **TIPS**, v.16, p. 283-285, 1995.

RAND, J. D. Acetylcholine. Program in Molecular, **Cell and Developmental Biology**, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK 73104 USA, 2007.

RANDELL, E.W. et al. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 38, p. 799–805, 2005.

RANG, H. P. et al. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. (Ed). **Farmacologia**. Elsevier, Sao Paulo, Brasil, p. 674-695, 2004.

RAO, A.A.; SRIDHAR, G.R.; DAS, U.N. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **Medical Hypotheses**, v. 69, p. 1272-1276, 2007.

REAVEN, G.; TSAO, P.S.; Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: the key player between cigarette smoking and cardiovascular disease? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, p. 1044, 2003.

RICHTER, T. et al. Potent Mechanism-Based Inhibition of Human CYP2B6 by Clopidogrel and Ticlopidine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, p. 189-197, 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.

ROMANOWSKA, M.; OSTROWSKA, M.; KOMOSKYNSKI, M.A. Adenosine ecto-deaminase (ecto-ADA) from porcine cerebral cortex synaptic membrane. **Brain Research**, v. 1156, p. 1-8, 2007.

ROSA, S. et al. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in the Pathophysiology of Cardiovascular Disease: Does the Actual Knowledge Justify a Clinical Approach? **Current Vascular Pharmacology**, v. 8(2), p. 259-275, 2010.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K.J. Cholinergic control of inflammation. **Journal of internal medicine**, v. 265, p. 663–679, 2009.

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

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

RUMLEY, A.G. et al. Plasma lipid peroxides: relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. **QJM**, v. 97, p. 809-816. 2004.

SANTOS, V. M. R. et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30 (1), p. 159-170, 2007.

SCHETINGER, M. R. C. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **BioFactors (Oxford)**, v. 31, p. 77-98, 2007.

SCHUNKE, M. **Prometheus, atlas de anatomia: pescoço e órgãos internos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007, p. 98-114.

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

SENTHIL, S. et al. Oxidative stress and antioxidants in patients with cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. **Clinica Chimica Acta**, v. 348, p. 131-137, 2004.

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

SHANJUKUMAR, S.L.; SHARMA, R. Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. **Molecular and cellular biology**, v. 204, p. 127–134, 2000.

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

SHAROYAN, S. et al. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochimica Polonica**, v.53, p. 539-546, 2006.

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

SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, p. 3–10, 2008.

SILMAN, I. et al. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase agents. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, p. 745-749, 1994.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: “classical” and “non-classical” functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 293-302, 2005.

SILVA, A.C. et al. Oxidative stress and δ -ALA-D activity in chronic renal failure patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 61(2-3), p. 180-5, 2007.

SINGH, R.B. et al. Mechanisms of acute myocardial infarction study (MAMIS). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 111-115, 2004.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

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

SPANEVERELLO, R.M. et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. **Journal of Neurology**, v. 257(1) p. 24-30, 2010.

SPYCHALA, J. Tumor promoting functions of adenosine. **Pharmacology & therapeutics**, v. 87, p. 161-173, 2000.

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

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signalling by NPP- type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signal.**, v.2, p.361-370, 2006

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, p. 542-550, 2005.

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

STEFFEN, L.M. et al. Greater fish, fruit, and vegetable intakes are related to lower incidence of venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. **Circulation**, v. 115, p. 188-195, 2007.

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

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

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

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

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

TSCHOEPE, D. et al. Platelets in diabetes: the role in the hemostatic regulation in atherosclerosis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 19, p. 122–128, 1993.

TSUBOI I. et al. Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus Type 1 and human immunodeficiency virus Type 1 infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 2, p. 626-630, 1995.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical and Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VALLE A.M. et al. The cholinesterases: Analysis by pharmacogenomics in man, **Chemical and Biological Interactions**, v. 175, p. 343–345, 2008.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30 (5), p. 1323-1338, 2007

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

WEBER, C.; ZERNECKE, A.; LIBBY, P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 802–815, 2008.

WEINBRENNER, T. et al. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v. 168, p. 99-106, 2003.

WHITE, J.G. Platelet Structure. **Platelets**, v.3 p. 45-73, 2007.

WHITTAKER, V.P. How the cholinesterases got their modern names, **Chemico-Biological Interactions**, v. 187(1-3), p. 23-26, 2010.

WU, A.H.B. Creatine kinase, isoenzymes, and variants. In: Wu AH, editor. **Cardiac markers**. New Jersey: Human Press, p. 113-125, 1998.

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

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside - converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673-694, 2008.

ZAPPI, D.M. et al. **Fatores de risco emergentes para doença coronária**. Livraria e Editora Revinter Ltda. Rio de Janeiro, RJ, 2000, p. 1-2.

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

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

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

ZIMMERMANN, C. et al. Antioxidant status in Acute Stroke Patients and Patients at stroke Risk. **European Neurology**, v.51, p. 157-61, 2004.



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

ZIMMERMANN, H. et al. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, p. 537- 566, 2007.

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

8. ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética

	<p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p>	
---	--	---	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina em pacientes com cardiopatia isquêmica (CI)

Número do processo: 23081.010245/2008 -53

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0132.0.243.000-08

Pesquisador Responsável: Vera Maria Morsch

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro/2009	Relatório parcial
Janeiro/2010	Relatório parcial
Janeiro/2011	Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 28/08/2008

Santa Maria, 28 de Agosto de 2008.



Lissandra Dal Lago
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM
Registro CONEP N. 243.

Comitê de Ética em Pesquisa - UFSM - Av. Roraima, 1000 – Prédio da Reitoria - 7º andar - Campus Universitário
97105-900 – Santa Maria – RS -- Tel: 0 xx 55 3220 9362 – email: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br

Anexo 2- Termo de consentimento Livre e Esclarecido

O Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo um projeto de pesquisa intitulado: **Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina em pacientes com Cardiopatia Isquêmica (CI)**, através da doutoranda Margarete Dulce Bagatini, orientada pela Prof^a Dra. Vera Maria Morsch, que tem como objetivo avaliar a atividade de componentes sangüíneos, que se alteram durante a CI, a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos na CI. Justifica-se este estudo tendo em vista que as doenças cardiovasculares continuam sendo a primeira causa de morte no Brasil, sendo responsáveis por quase 32% de todos os óbitos no país, representando a terceira maior causa de internação. Os benefícios do estudo para os participantes é a possibilidade de verificar fatores predisponentes e envolvidos na CI sendo esses informados e esclarecidos de atitudes preventivas que poderão tomar.

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

Fica garantido que as amostras coletadas ficarão sob responsabilidade do pesquisador durante o período do doutorado (3 anos) no laboratório de Enzimologia, sala 2208, prédio 18, Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria e que as mesmas serão utilizadas apenas para fins científicos, sem que o paciente seja identificado, garantindo assim o anonimato. Após serão descartadas de acordo com as normas de segurança do Hospital Universitário de Santa Maria.

A participação neste estudo é livre e voluntária, sendo que não haverá nenhuma forma de compensação financeira ou custos para o participante. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo ou comprometimento dos cuidados de saúde aos pacientes.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que estou de acordo em participar deste projeto de pesquisa, livre de qualquer constrangimento, pois fui informado de forma clara e detalhada dos objetivos e dos procedimentos que serão realizados. Fui igualmente informado da garantia de receber respostas a qualquer dúvida que ainda puder ter sobre assuntos relacionados com a pesquisa, e da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízo de qualquer ordem.

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

Santa Maria, ____ de _____ 200__.

Assinatura

Margarete Dulce Bagatini/ Pesquisadora/ (55)91422611

Vera Maria Morsch/ Orientadora/ (55)32209557

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria

Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - Sala 702

Cidade Universitária - Bairro Camobi

97105-900 - Santa Maria – RS