

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

**ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM  
NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM PLAQUETAS  
DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Lara Vargas Becker**

**Santa Maria, RS, Brasil, 2010**

**ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS DE  
ADENINA EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM  
ARTRITE REUMATÓIDE**

**por**

**Lara Vargas Becker**

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

**Orientadora: Prof. (Dra) Maria Rosa Chitolina Schetinger**  
**Co-orientadora: Prof. (Dra) Daniela Bitencourt Rosa Leal**

**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 Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS DE  
ADENINA EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM  
ARTRITE REUMATÓIDE**

elaborada por  
**Lara Vargas Becker**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger  
(Presidente/Orientador)**

---

**Dra. Carla Denise Bonan- PUC- RS**

---

**Dra. Vânia Lúcia Loro- UFSM**

Santa Maria, 26 de Março de 2010

“Se eu vi mais longe, foi por estar  
De pé sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Alfonso e Vânia pelo amor, apoio e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço aos gigantes, Vânia e Alfonso, meus pais, por me apoiarem sempre e não medirem esforços para que eu conquistasse meus objetivos!

Às minhas irmãs, Larissa e Mariana, por todo carinho, amizade e felicidade que sempre me proporcionaram, eu as amo muito!

À minha orientadora Maria Rosa Chitolina Schetinger e a minha co-orientadora Daniela Bitencourt Rosa Leal, pela orientação, compreensão e por todo aprendizado nestes anos de caminhada; a minha gratidão. À prof.<sup>a</sup> Vera por também contribuir para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado Johninson, pelo amor, apoio, incentivo e por fazer parte da minha vida.

Aos meus cunhados, Ciro e Rafael pela amizade.

O meu agradecimento especial à grande amiga e colega Cíntia, pela imensa colaboração neste trabalho e por toda sua amizade incondicional.

À minha querida amiga Paula, por todo carinho e paciência, e por ser um exemplo de dedicação e determinação.

Aos meus amigos de infância Larissa Alves, Diogo e Eduardo pela alegria, apoio e companheirismo.

Aos meus colegas e amigos do lab. 2208, Maísa, Viviane, Carol, Juci, Rosélia, Roberta, Thaís, Ana Paula, Margarete, Liése, Vanessa, Jessié, Gustavo, Naiara, Cláudio, Jonas, Cinthia, Pauline, Mili, Jeandre, André, João, Amanda, pela amizade durante o período de convívio e pela colaboração para realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pelo auxílio e apoio prestados.

E não posso deixar de agradecer, aos pacientes que fizeram parte deste estudo.

A todos aqueles que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

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

### **ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE**

Autora: LARA VARGAS BECKER  
Orientadora: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER  
Co-Orientadora: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL  
Data e local de Defesa: Santa Maria, 26 de Março de 2010.

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica autoimune, de etiologia desconhecida. Os pacientes portadores de AR têm uma sobrevivência menor do que a da população em geral, sendo que a causa mais comum de mortalidade é a doença cardiovascular. A inflamação sistêmica que ocorre na AR produz um espectro de mudanças proaterogênicas que incluem a disfunção endotelial, a resistência à insulina, a dislipidemia, os efeitos protrombóticos e o estresse oxidativo. A disfunção endotelial é um evento chave no início da aterogênese. As plaquetas são conhecidas por ter um importante papel na manutenção da integridade endotelial e da hemostasia, possuindo um papel chave na aterotrombose. Os nucleotídeos extracelulares de adenina ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina, modulam uma variedade de efeitos teciduais, além de exercerem diversos efeitos nas plaquetas. Neste trabalho foi determinada a atividade das enzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos (NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA) em plaquetas de pacientes com AR. Foram selecionados 35 pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria com diagnóstico de AR, o qual foi baseado nos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia. Os resultados demonstraram um aumento na atividade das enzimas NTPDase (aproximadamente 100%), 5'-nucleotidase (170%), E-NPP (aproximadamente 100%) e ADA (aproximadamente 45%) em plaquetas de pacientes com AR quando comparado ao controle. O aumento da atividade dessas enzimas pode estar relacionado com uma resposta compensatória do organismo frente à doença. Também foi determinado o perfil da agregação plaquetária nesses pacientes, o qual encontrou-se inalterado quando comparado ao controle. O aumento da atividade da enzima ADA foi menor quando comparado ao aumento das atividades das outras enzimas (NTPDase, 5'-nucleotidase e E-NPP). Possivelmente, nem toda a adenosina gerada é convertida pela ADA, o que poderia explicar a normalidade da agregação plaquetária nos pacientes estudados. Não foi observada nenhuma interferência dos fármacos (hidroxicloroquina, leflunomida, metotrexato e prednisona) utilizados no tratamento de AR sobre a atividade das enzimas testadas *in vitro*. Concluiu-se que a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA encontram-se alteradas em plaquetas de pacientes com AR, o que poderia ser considerado uma resposta compensatória do organismo frente à doença.

Palavras-chave: artrite reumatóide, NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP, ADA, plaquetas, aterosclerose.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Programme of Post Graduation in Biological Sciences: Toxicological  
Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **ACTIVITIES OF ENZYMES THAT HYDROLYZE ADENINE NUCLEOTIDES IN PLATELETS FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS**

Author: LARA VARGAS BECKER  
Oriented by: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER  
Co-oriented by: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL

Date and place of the defense: Santa Maria, march 26, 2010.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease autoimmune of unknown etiology. Patients with RA have a lower survival than the general population, the most common cause of mortality in these patients is cardiovascular disease. The systemic inflammation that occurs in RA produces a spectrum of proatherogenic changes including endothelial dysfunction, insulin resistance, dyslipidemia, prothrombotic effects and pro-oxidative stress. Endothelial dysfunction is the key event in early atherogenesis. The platelets are known to have an important role in the maintenance of endothelial integrity and homeostasis, and also are key players in atherothrombosis. Extracellular adenine nucleotides ATP, ADP and AMP and the nucleoside adenosine, modulate a variety of tissue effects, exerting several effects on the platelets. This work determined the activity of enzymes involved in the degradation of nucleotides and nucleosides (NTPDase, 5'-nucleotidase E-NPP and ADA) in platelets from patients with RA and controls patients. It was selected thirty-five RA patients from the Hospital of the Federal University of Santa Maria and the diagnostic was based on the criteria of American College of Rheumatology. The results showed an increase in the activity of NTPDase (approximately 100%), 5'-nucleotidase (170%), E-NPP (approximately 100%) and ADA (approximately 45%) in the platelets of patients with RA when compared to control group. The increased activity of these enzymes could be related to a compensatory response of the organism due to the disease. The platelet aggregation was also determined in these patients and no changes were found when compared to the control group. The increase in ADA activity was lower when compared to the increase observed in the other enzymes activities (NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP). Possibly not all generated adenosine is converted by the ADA, which could explain the normality of platelet aggregation in patients with RA. No interference of the drugs (methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone) utilized in RA treatment was observed on the enzymatic activities tested *in vitro*. In this way, it is possible to conclude that the NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities are altered in platelets of patients with RA, which could be considered a compensatory response against the disease.

Keywords: rheumatoid arthritis, NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP, ADA, platelets, atherosclerosis.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- Fatores que contribuem para ocorrência e expressão da AR.....	18
Figura 2- Células envolvidas no processo inflamatório da artrite reumatóide..	19
Figura 3- Membros da família das enzimas NTPDases.....	27
Figura 4- Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana.....	28

### MANUSCRITO

Figure 1- ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in platelets of rheumatoid arthritis patients (RA). Bars represent means±SEM. The symbol *** represents statistical difference from the control group.....	58
Figure 2- E-NPP activity in the platelets of rheumatoid arthritis patients (RA). Bars represent mean±SEM. The symbol ***represents statistical difference from the control group.....	59
Figure 3- ADA activity in the platelets of rheumatoid arthritis patients (RA). Bars represent mean±SEM. The symbol ** represents statistical difference from the control group.....	60

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

Table 1: *In vitro* effect of methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone on NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of healthy subjects.....61

Table 2: *In vitro* effect of methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone on E-NPP and ADA activities in platelets of healthy subjects.....62

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADP:** adenosina difosfato

**AMP:** adenosina monofosfato

**ATP:** adenosina trifosfato

**ADA:** adenosina deaminase

**AINHs:** anti-inflamatórios não hormonais

**AR:** artrite reumatóide

**DCV:** doença cardiovascular

**DMCD:** droga modificadora do curso da doença

**E-NPP:** ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

**LDH:** lactato desidrogenase

**MTX:** metotrexato

**NTPDase:** ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

**p-Nph-5'-TMP:** p-nitrofenil 5'-timidina monofosfato

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
1.1	Objetivos .....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1	Artrite Reumatóide .....	17
2.2	Plaquetas .....	22
2.3	Nucleosídeos e nucleotídeos .....	23
2.4	As ectonucleotidases .....	26
2.4.1	NTPDases.....	26
2.4.2	5'- nucleotidase.....	28
2.4.3	Ecto-nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP) .....	29
2.4.4	Adenosina deaminase .....	31
2.5	Ectonucleotidases associadas a Patologias .....	32
2.6	Doença Cardiovascular e Artrite Reumatóide .....	33
3	MANUSCRITO .....	35
4	DISCUSSÃO .....	63
5	CONCLUSÕES .....	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
7	ANEXOS .....	87
7.1	Anexo A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	87
7.2	Anexo C- Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética .....	89
7.3	Anexo C- Carta de Submissão.....	90

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação está organizada na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, os objetivos e a revisão bibliográfica. A seguir, os resultados são apresentados na forma de manuscrito, o qual foi escrito seguindo-se as normas do periódico ao qual o mesmo foi submetido à publicação. Os itens discussão e conclusão, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao manuscrito. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem nos itens introdução, revisão bibliográfica e discussão.

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por sinovite erosiva que afeta as articulações (WOLFE, 1997). A incidência da doença é maior em mulheres do que em homens, sugerindo a influência de fatores reprodutivos e hormonais na ocorrência da doença (AHO et al., 1998; GABRIEL et al., 1999; RIISE et al., 2001). A principal causa de morte em pacientes com AR é a doença cardiovascular (DCV) (SOLOMON et al., 2003; GOODSON et al., 2005). O risco aumentado de DCV é consequência da aterosclerose (DEL RINCON & ESCALANTE 2003) que encontra-se acelerada nestes pacientes (DEL RINCON et al., 2003; GONZALEZ-GAY et al., 2005).

Os níveis aumentados de marcadores inflamatórios sanguíneos e as manifestações extra-articulares evidenciam a presença de inflamação sistêmica nos pacientes com AR. Esse fenômeno produz um espectro de mudanças proaterogênicas que incluem a disfunção endotelial, a resistência à insulina, os efeitos protrombóticos e o estresse oxidativo (SATTAR et al., 2003). A disfunção endotelial tem sido relatada em diversos estudos sobre AR (BERGHOLM et al., 2002; GONZALEZ-GAY et al., 2004; HERMANN et al., 2005), e sua presença é diretamente relacionada ao risco aumentado para aterosclerose (NEUNTEUFL et al., 1997). O dano e a ativação do endotélio levam a alterações na permeabilidade endotelial e ao aumento da adesão de leucócitos e plaquetas (SATTAR et al., 2003).

A ativação plaquetária e a formação de trombos são características onipresentes na iniciação e na geração de lesão aterosclerótica (JOSEPH et al., 2001). Os nucleotídeos extracelulares têm uma multiplicidade de funções teciduais incluindo desenvolvimento, fluxo sanguíneo, secreção, inflamação e tromborregulação (ROBSON et al., 2006), além de regular a resposta vascular ao dano endotelial por exercerem uma variedade de efeitos nas plaquetas (BIRK et al., 2002). O nucleotídeo ADP é o maior promotor da agregação plaquetária e seu metabolismo no sangue é importante para regular a ativação e o recrutamento plaquetário (MARCUS et al., 1997). Já o nucleotídeo ATP está envolvido em processos inflamatórios e desempenha papel importante na

agregação plaquetária, dependendo da sua concentração e da ligação a receptores específicos (BOURS et al., 2006) Altas concentrações de ATP inibem a agregação plaquetária induzida pelo ADP (LEON et al., 1997).

O nucleosídeo adenosina, um produto da quebra do ATP e ADP, é reconhecido por possuir propriedades anti-inflamatórias (CRONSTEIN, 1994), vasodilatadoras, neuroprotetoras (JACOBSON et al., 2006), e imunossupressoras (SPYCHALA et al., 1997), além de atuar como um potente inibidor da agregação plaquetária (BOROWIEC et al., 2006).

O controle dos níveis de nucleotídeos é importante para a manutenção dos processos de neurotransmissão (RALEVIC & BURNSTOCK 1998), regulação da resposta das células epiteliais (SCHWIEBERT & ZSEMBERY 2003), distribuição de fluxo sanguíneo e de fornecimento de oxigênio (GONZALEZ-ALONSO et al., 2002; SPRAGUE et al., 2007), reações imunológicas e ativação e agregação plaquetária nos locais de lesão vascular (MARCUS et al., 2003).

O controle dos níveis de nucleotídeos ATP e ADP e do nucleosídeo adenosina no meio extracelular é feito por uma classe de enzimas com sítio catalítico voltado para o meio extracelular, as ectonucleotidases. A enzima NTPDase é responsável por hidrolisar nucleotídeos di e trifosfatados a seus monofosfonucleotídeos correspondentes. A E-NPP é uma enzima responsável também pela hidrólise de ATP e ADP, além de outros nucleotídeos, levando à formação de nucleotídeos monofosfatos. O AMP gerado por essas enzimas é então hidrolisado pela enzima 5'-nucleotidase à adenosina, que por sua vez é degradada até inosina pela enzima adenosina deaminase (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001; YEGUTKIN, 2008).

A avaliação dessas enzimas em um grupo de pacientes portadores de AR se torna importante devido ao fato de estarem presentes na membrana das plaquetas. Além disso, elas possuem um importante papel na manutenção da homeostasia normal, prevenindo a excessiva agregação plaquetária e estando relacionadas à resposta inflamatória, à disfunção endotelial e à consequente geração de lesão aterosclerótica (YEGUTKIN, 2008).

## 1.1 Objetivos

### Objetivo geral

Avaliar a atividade de enzimas que hidrolisam nucleotídeos de adenina em pacientes com artrite reumatóide provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria.

### Objetivos específicos

- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e adenosina deaminase em plaquetas de pacientes com artrite reumatóide (AR);
- Verificar o perfil de agregação plaquetária induzida pelo ADP em pacientes com AR;
- Verificar *in vitro* a influência de fármacos comumente utilizados no tratamento da AR como metotrexato, leflumomida, hidroxiclороquina e prednisona, na atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e adenosina deaminase em plaquetas de voluntários saudáveis.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica autoimune, de etiologia desconhecida, caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, que leva à deformidade e à destruição das articulações por erosão do osso e cartilagem (LIPSKI, 1998). Afeta, primariamente, as articulações, mas pode incluir uma variedade de manifestações extra-articulares, que vão desde febre e emagrecimento até o acometimento de órgãos como pulmões, coração, rins, entre outros (ENGEL, 1966; MIKKELSEN, 1967; O'BRIEN, 1967; WOOD, 1967; WOLFE, 1968).

A AR acomete 1% a 1,5% da população mundial. Embora possa ter início em qualquer idade, o grupo com maior incidência compreende mulheres entre 40 e 50 anos. Para cada cinco mulheres, existem dois homens com diagnóstico de AR (HOCHBERG, 1990). Essa diferença sugere a influência de fatores reprodutivos e hormonais em sua ocorrência (AHO et al., 1998; GABRIEL et al., 1999; RIISE et al., 2001).

Os pacientes portadores de AR têm uma sobrevida menor que a da população em geral. A expectativa de vida pode cair de 3 a 10 anos, dependendo da gravidade da doença e da idade de início da mesma (ALAMANOS et al., 2005). As principais causas da morte para portadores da doença são infecções, doenças linfoproliferativas, doença cardiovascular e cerebrovascular, complicações gastrointestinais e relacionadas à atividade da doença propriamente dita (PRIOR et al., 1984).

A AR é uma doença bastante heterogênea em termos de gravidade e ritmo de progressão da inflamação articular, presença de manifestações extra-articulares e de resposta ao tratamento farmacológico (WORTHINGTON, 2005). Essa doença é caracterizada por poliartrite simétrica, principalmente das mãos, associada à rigidez matinal e fadiga. Geralmente, coexistem sintomas sistêmicos, como cansaço, mal-estar e limitações das atividades diárias. A AR tem um curso crônico com períodos variáveis de remissão e exacerbação. Cerca de metade dos pacientes com AR, após dez anos de doença,

apresentam incapacidade para realização de suas atividades, tanto de vida diária como profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade (HARRIS, 1997).

A AR é uma doença multifatorial, que resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, os quais contribuem para sua ocorrência e expressão. Os fatores hormonais e o estilo de vida podem influenciar o curso da doença (ALAMANOS et al., 2005) (figura1).

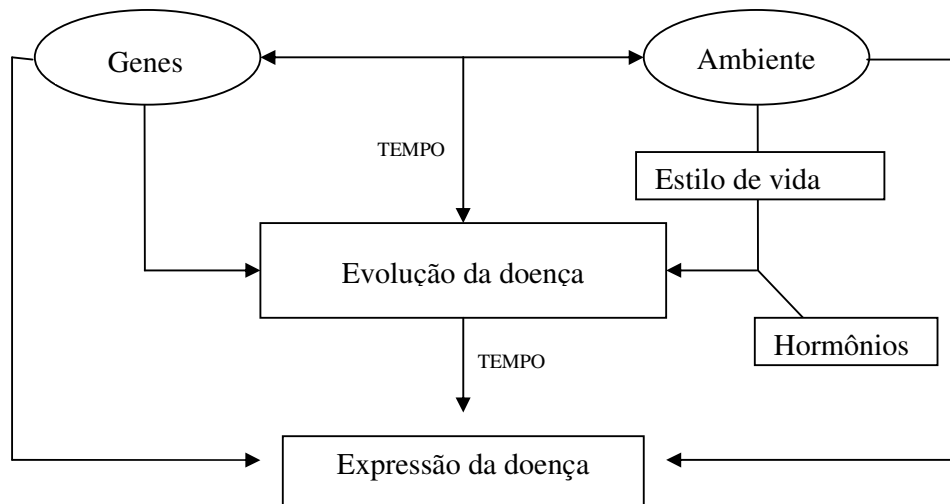


Figura 1- Fatores que contribuem para ocorrência e expressão da AR (Adaptado de ALAMANOS et al., 2005)

O evento inicial da doença é o processo inflamatório que ocorre na membrana sinovial com infiltrado de linfócitos e macrófagos (HARRIS, 1997). O osteoclasto, uma célula multinucleada que possui capacidade de reabsorver tecido ósseo (HERMAN et al., 2008), é uma das principais células envolvidas no processo de erosão óssea inflamatória (GOLDRING, 2003). A ativação e o recrutamento de tais células são influenciados por citocinas e mediadores inflamatórios (GOLDRING, 2002). O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) ocupa um lugar de destaque no processo erosivo articular, através da ativação dos osteoclastos (MIOSSEC, 2004) (figura 2).

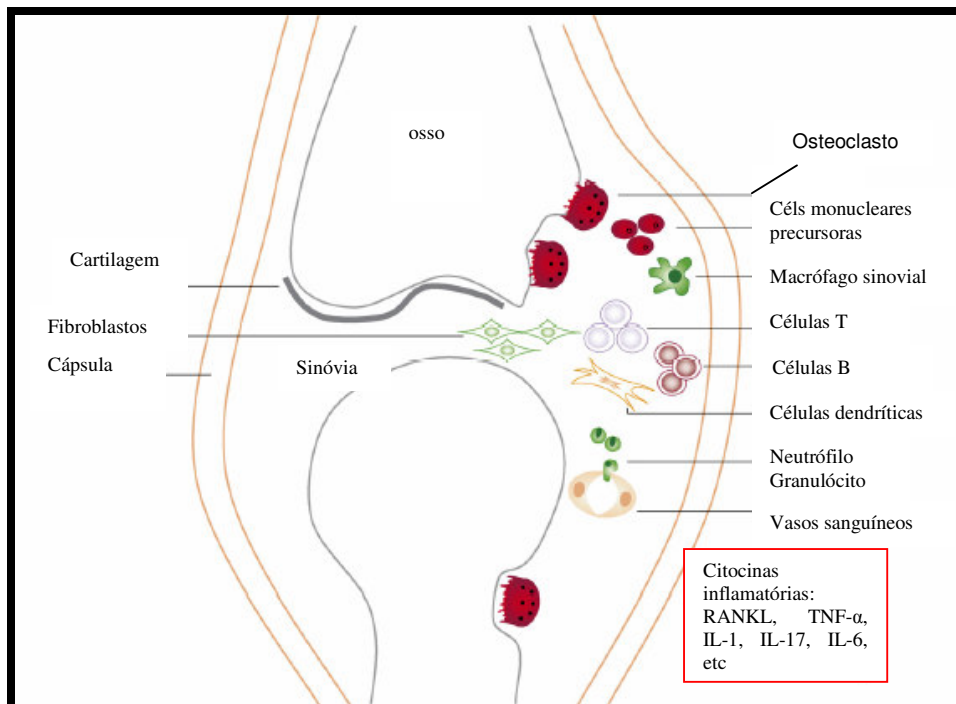


Figura 2. Células envolvidas no processo inflamatório na artrite reumatóide (Adaptado de HERMAN et al., 2008)

Para o início e perpetuação da inflamação crônica na membrana sinovial, a produção de citocinas, com balanço predominante para as citocinas pró-inflamatórias, tem papel fundamental (KLIMIUK et al., 1999). As citocinas são peptídeos ou glicopeptídeos secretados por alguns tipos de células e influenciam o comportamento de outras células. Algumas citocinas também difundem-se através do sistema circulatório e alcançam sítios distantes no corpo, mediando os efeitos sistêmicos. As citocinas exercem seus efeitos através da sua ligação a receptores de superfície celular específicos, iniciando a transdução de sinais para o interior da célula, com consequente ativação da transcrição gênica.

O TNF- $\alpha$ , citocina importante na AR, é produzido por muitos tipos de células, incluindo monócitos e macrófagos ativados, neutrófilos, linfócitos T e B, mastócitos, basófilos, eosinófilos e células NK. Seus efeitos incluem a ativação de monócitos/macrófagos e de outras células para produzir mediadores solúveis, como IL-1 e outras citocinas; estimulação da expressão de moléculas de adesão, permitindo a adesão e extravasamento subsequente de leucócitos (SHARON, 2000).

A migração de células T e B que ocorre no início do processo inflamatório, com formação de agregados e a produção aumentada de interleucina-6 (IL-6) e 10 (IL-10), são indicadores da hiperatividade dessas células na doença (DORNER et al., 2003). A hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neoangiogênese levam à formação do *pannus*, um tecido sinovial povoado de células inflamatórias, que atinge o osso subcondral e, em seguida, a cartilagem articular com destruição progressiva (HARRIS, 1997).

O diagnóstico da AR é feito através da associação de manifestações clínicas, radiológicas e laboratoriais. A orientação para diagnóstico é baseada nos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia revisado em 1987 (ARNETT et al., 1988):

- \* Rigidez matinal: rigidez articular durando pelo menos 1 hora;
- \* Artrite de três ou mais áreas: pelo menos três áreas articulares com edema de partes moles ou derrame articular, observado pelo médico;
- \* Artrite de articulações das mãos (punho, interfalangeanas proximais e metacarpofalangeanas);
- \* Artrite simétrica;
- \* Nódulos reumatóides;
- \* Fator reumatóide sérico positivo;
- \* Alterações radiográficas: erosões ou descalcificações localizadas em radiografias de mãos e punhos.

Para fins de classificação da doença o paciente deve apresentar ao menos 4 dos 7 critérios. Os pacientes com dois critérios clínicos não são excluídos. Alguns estudos têm sugerido que de uma forma geral, três tipos de evolução podem ocorrer nos pacientes com AR. O tipo I que se caracteriza por um curso autolimitado (até um ano) de dor e rigidez articular, que desaparece com pouca ou nenhuma medicação. Cerca de 20% dos pacientes com AR tem este curso clínico. O tipo II caracteriza-se por um curso intermitente com períodos de piora (crise inflamatória) e melhora (remissão clínica), esse é o tipo de evolução mais comum, estando presente em 70% dos pacientes. O tipo III se caracteriza por envolvimento articular aditivo sem períodos de remissão e rápida destruição articular se não tratado a tempo, podendo ser visto em cerca de 10 % dos pacientes (SILVA et al., 2003).

O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença e para prevenir a incapacidade funcional e a lesão articular irreversível. A terapêutica de cada paciente vai variar de acordo com o estágio da doença (ALBERS et al., 2001). Os objetivos principais do tratamento são prevenir ou controlar a lesão articular, prevenir a perda de função e diminuir a dor, tentando maximizar a qualidade de vida. A remissão completa, apesar de ser o objetivo final do tratamento raramente é alcançada (AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON RHEUMATOID ARTHRITIS GUIDELINES, 2002).

O tratamento começa com a educação do paciente e de seus familiares sobre sua doença, as possibilidades de tratamento, com seus riscos e benefícios. A fisioterapia e a terapia ocupacional contribuem para que o paciente possa continuar a exercer as atividades da vida diária. O condicionamento físico, envolvendo atividade aeróbica, exercícios resistidos, alongamento e relaxamento, deve ser estimulado, observando-se os critérios de tolerância ao exercício e à fadiga (AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON RHEUMATOID ARTHRITIS GUIDELINES, 2002).

O tratamento medicamentoso é feito em duas etapas com início concomitante: 1) utilização de anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) e corticosteróides; 2) utilização de drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) (ALBERS et al., 2001). Os AINHs são um extenso grupo de medicamentos com efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, enquanto os corticosteróides são análogos sintéticos da cortisona, reconhecidos como a mais potente medicação anti-inflamatória disponível.

As DMCD são medicamentos utilizados para modificar a história natural da AR. Esses medicamentos alteram o curso da AR pelo menos por um ano, com evidência de melhora da capacidade funcional, diminuição da sinovite e retardo ou prevenção de dano articular estrutural. Exemplos dessas drogas são o metotrexato, leflunomida e hidroxicloroquina (SILVA et al., 2003).

O principal modo de ação da leflunomida é diminuir a síntese *de novo* das pirimidinas ao inibir a enzima mitocondrial diidroorotato desidrogenase, a inibição dessa enzima impede a proliferação rápida de linfócitos, diminuindo a atividade inflamatória presente na membrana sinovial dos pacientes com AR.

Esse fármaco apresenta rapidez no seu início de ação, a qual em muitos pacientes foi notada no primeiro mês de tratamento (FOX, 1998). Já o mecanismo de ação da hidroxicloroquina não está completamente estabelecido, mas inclui: 1) elevação do pH dos lisossomos, alterando a função e liberação de proteases; 2) inibição da capacidade de processamento do antígeno (macrófagos) com conseqüente diminuição da resposta imune (SILVA et al., 2003).

O metotrexato (MTX) é atualmente a DMCD mais utilizada no tratamento da AR, seu mecanismo de ação mais conhecido é a inibição da diidrofolato redutase, uma enzima com papel importante na síntese de DNA (SILVA et al., 2003). Estudos com modelos animais sugerem que baixas doses de MTX promovem um aumento da adenosina, uma potente molécula anti-inflamatória, a qual inibi a acumulação de neutrófilos. Esse mecanismo estaria relacionado com a inibição da enzima 5-amino-imidazol-4-carboximide ribonucleotide transformilase (AICAR), a qual afeta o metabolismo das purinas e pirimidinas (CRONSTEIN, 1995).

## **2.2 Plaquetas**

As plaquetas são células discóides, anucleadas e possuem um importante papel na manutenção da integridade endotelial e hemostasia (LORENZI, 1999). A membrana celular de uma plaqueta é lipoprotéica composta por fosfolipídeos, contendo muitos receptores responsáveis pelo desencadeamento da ativação plaquetária e de reações de adesão-agregação (ZAGO et al., 2004). No citoplasma encontram-se organelas como lisossomos, mitocôndrias e grânulos, denominados grânulos alfa e grânulos densos.

As plaquetas secretam substâncias que estão estocadas nos grânulos. Os grânulos alfa possuem diversos tipos de proteínas como fibrinogênio, Fator de Von willebrand (vWF), fibronectina, vitronectina e trombospondina, que são proteínas adesivas. Já os grânulos densos contêm nucleotídeos, como adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP), serotonina e o  $Ca^{++}$ , substâncias que promovem a ativação plaquetária (ZAGO et al., 2004).

Sob condições fisiológicas normais, as plaquetas circulam em estreito contato com a mucosa das células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos

e, apenas quando há uma lesão, elas aderem ao local da lesão (SALLES et al., 2008).

A hemostasia é a resposta fisiológica normal à injúria vascular, sendo que as plaquetas possuem um importante papel neste processo (MARCUS & SAFIER, 1993). O mecanismo de hemostasia primária ocorre quando a continuidade de um vaso sanguíneo é interrompida. Os eventos iniciais são modulados por componentes expostos dos vasos sanguíneos, como as microfibrilas, a membrana basal e o colágeno (LORENZI, 1999). Concomitantemente, ocorre a adesão plaquetária, que induz a uma rápida transdução de sinal, desencadeando uma série de eventos. Entre estes podemos citar a ativação plaquetária, as mudanças no citoesqueleto associadas à alteração na conformação e na expansão de pseudópodos, a contração e secreção dos conteúdos granulares e a ativação de integrinas (CASTRO et al., 2006).

Algumas evidências demonstram a ativação de plaquetas circulantes em doenças com componente inflamatório, agindo na vasculatura, sugerindo a participação das plaquetas na resposta inflamatória (MASSBERG et al., 2002).

A hiperatividade plaquetária pode levar à formação patológica de trombos e oclusão vascular (REMIJIN et al., 2002; WAGNER & BURGER, 2003; KEATING et al., 2004). As plaquetas regulam uma variedade de respostas inflamatórias e possuem importante papel na aterosclerose, tornando-se claro sua atuação na hemostasia e na trombose (GAWAZ, 2006).

### **2.3 Nucleosídeos e nucleotídeos**

Os nucleotídeos extracelulares de adenina, ATP, ADP e AMP, e o nucleosídeo adenosina, modulam uma variedade de efeitos teciduais, que incluem o fluxo sanguíneo, a secreção, a inflamação e as reações imunes (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 para o meio extracelular por células sanguíneas e vasculares, como eritrócitos, plaquetas, e endotélio (LUTHJE,

1989; DUBYAK et al., 1993), mas também podem ser liberados frente à injúria celular, nos sítios inflamatórios ou de estresse oxidativo, onde há um aumento da liberação de nucleotídeos. Já a adenosina pode ser liberada no meio extracelular como resultado da degradação do ATP e ADP por enzimas específicas (HUNSUCKER et al., 2005; YEGUTKIN, 2008), ou através de transportadores na membrana das células que transportam a adenosina de dentro das células para o meio extracelular (BOROWIEC et al., 2006).

O ATP pode funcionar como uma molécula sinalizadora no controle da inflamação e da resposta imune (DI VIRGILIO et al., 2001). A modulação do processo inflamatório e da resposta imune pelo ATP extracelular é complexa e resulta de efeitos específicos sobre uma grande variedade de células imunes e não imunes. O ATP é capaz de desencadear funções pró-inflamatórias nos neutrófilos, estimular a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  e ainda estimular a proliferação de linfócitos (BOURS et al., 2006).

O papel do ATP na imunidade também é relacionado com o produto da sua quebra, a adenosina, que tem um papel definido na imunidade (CRONSTEIN, 1994). A adenosina atenua a inflamação e o dano tecidual, mediando diversos efeitos cardioprotetores e neuroprotetores (BOURS et al., 2006).

A sinalização purinérgica envolve três principais componentes: 1) nucleotídeos de adenina, 2) receptores específicos, através dos quais os nucleotídeos exercem seus efeitos e 3) as ectonucleotidases, responsáveis pelo controle dos níveis dessas moléculas no meio extracelular (ATKINSON et al., 2006). Os nucleotídeos e nucleosídeos são encontrados em praticamente todas as células vivas, onde produzem efeitos no meio intracelular e extracelular (BURNSTOCK, 1972). O ATP juntamente com o ADP possui um importante papel na ativação e agregação plaquetária (MARCUS et al., 2003; GACHET, 2006), pois em baixas concentrações induz a agregação, enquanto que em altas concentrações inibe esse fenômeno, já o ADP é um reconhecido promotor da agregação plaquetária (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997).

Os efeitos dos nucleotídeos extracelulares são exercidos através da sua ligação a receptores específicos. Cada célula responsável pela liberação desses nucleotídeos carrega, em sua superfície, receptores purinérgicos para



tais moléculas, os quais podem ser do tipo P2X e P2Y (BURNSTOCK et al., 2004).

Os receptores P2Y apresentam 7 regiões transmembrana, com a porção aminoterminal voltada para o meio extracelular e a porção carboxiterminal voltada para o meio citoplasmático. Esses receptores são ativados por ATP e essa ativação provoca a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares (DI VIRGILIO et al., 2001).

Os receptores P2X são acoplados a canais iônicos, os domínios amino e carboxiterminal estão ambos voltados para o meio citoplasmático. Sua ativação é associada com o rápido influxo de  $\text{Na}^{2+}$  e efluxo de  $\text{K}^+$ , com despolarização da membrana e consequente aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (DI VIRGILIO et al., 2001).

Após exercer seus efeitos, os nucleotídeos precisam ser degradados para manter seus níveis extracelulares em concentrações fisiológicas. Um complexo multienzimático (ectonucleotidases) é responsável por essa hidrólise (ZIMMERMANN, 2001). A enzima NTPDase hidrolisa ATP e ADP em AMP (ROBSON et al., 2006), enquanto que a E-NPP hidrolisa ligações pirofosfato e fosfodiéster de nucleotídeos e seus derivados, resultando na produção de nucleotídeos monofosfatos (STEFAN et al., 2005). A enzima 5'-nucleotidase degrada AMP até adenosina (COLGAN et al., 2006).

O nucleosídeo adenosina possui propriedades anti-inflamatórias (CRONSTEIN, 1994), vasodilatadoras, neuroprotetoras (JACOBSON et al., 2006), imunossupressoras (SPYCHALA et al., 1997) e atua como um potente inibidor da agregação plaquetária (BOROWIEC et al., 2006). Esses efeitos são mediados através da sua ligação a quatro diferentes tipos de receptores, A1, A2A, A2B e A3. Todos os receptores são glicoproteínas transmembrana acopladas a proteína G (YAAR et al., 2005). A inativação da adenosina é realizada pela enzima adenosina deaminase (ADA), a qual converte a adenosina à inosina (BOURS et al., 2006).

## 2.4 As ectonucleotidasas

Os nucleotídeos extracelulares de adenina e seu nucleosídeo derivado adenosina são importantes moléculas sinalizadoras que possuem a capacidade de influenciar a função cardíaca, as respostas inflamatórias e a reatividade plaquetária (BURSTOCK, 2002). O controle de seus níveis é importante para a manutenção dos processos fisiológicos de sinalização. Esse controle é realizado por uma família de enzimas que hidrolisam os nucleotídeos e nucleosídeos, gerando seus respectivos metabólitos (BOROWIEC et al., 2006).

Os membros dessa classe de ectonucleotidasas incluem: as NTPDases (Nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolase), a família das E-NPPs (Nucleotídeo pirofosfatases/ fosfodiesterases), a 5'-nucleotidase e a Adenosina Deaminase (YEGUTKIN, 2008). Essas enzimas atuam formando uma cadeia enzimática, para degradação dos nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) e nucleosídeo (adenosina), que tem início com a ação da NTPDase e E-NPP, as quais hidrolisam ATP e ADP até AMP. A seguir, o AMP é hidrolisado pela enzima 5'-nucleotidase até adenosina, que por fim é convertida até inosina pela ADA (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001).

### 2.4.1 NTPDases

As NTPDases (CD39; E.C 3.6.1.5) representam uma classe de enzimas que são capazes de hidrolisar nucleotídeos di e trifosfatados a seus monofosfonucleotídeos correspondentes (ZIMMERMANN, 2001). Essa classe de enzimas inclui oito membros, quatro são localizados na membrana celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular (NTPDase 1, 2, 3, 8); e quatro exibem uma localização intracelular (NTPDase 4,5,6,7) (ROBSON et al., 2006) (figura 3).

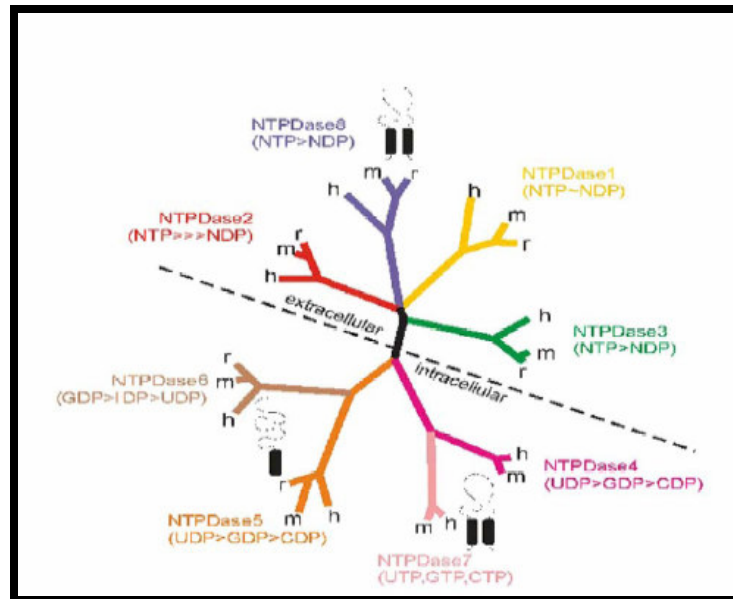


Figura 3 - Membros da família das NTPDases ( Adaptado de ROBSON et al., 2006).

Os diferentes subtipos de NTPDase diferem quanto à localização celular e às propriedades funcionais. As quatro formas localizadas na superfície celular (NTPDase 1,2,3,8) podem ser diferenciadas de acordo com a preferência pelo substrato, uso de cátion divalente e formação de produto. Todas as NTPDases localizadas na superfície requerem  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  para sua máxima atividade (ZIMMERMANN, 2001; KUKULSKI et al., 2005).

As NTPDases possuem 5 regiões denominadas regiões conservadas da apirase (ACRs), que são locais que apresentam grande similaridade na sequência de aminoácidos (ZIMMERMANN, 2001). Tais regiões estão envolvidas no reconhecimento do substrato, ligação e hidrólise (KIRLEY et al., 2006).

A primeira NTPDase identificada foi a NTPDase-1, que está ancorada à membrana via dois domínios transmembrana e que hidrolisa os nucleotídeos ATP e ADP em proporções semelhantes. Uma expressão abundante foi encontrada no endotélio vascular, nas células da musculatura lisa, no pâncreas, nas células dendríticas e em células sanguíneas como linfócitos, plaquetas e eritrócitos, bem como no plasma (FRASSETO et al., 1993; SARKIS et al., 1995; PILLA et al., 1996; ZIMMERMANN, 2001; YEGUTKIN, 2008). A NTPDase-2 é associada ao sistema nervoso central e periférico (YEGUTKIN,

2008). A NTPDase-3 é associada com estruturas neuronais, agindo na regulação dos níveis de ATP pré-sinápticos (YEGUTKIN, 2008). Já as NTPDases 4, 5, 6 e 7 estão localizadas no meio intracelular (ZIMMERMANN, 2001).

Em termos de sistema vascular, a NTPDase-1 tem um importante papel no controle dos efeitos pró-trombóticos e pró-inflamatórios dos nucleotídeos ATP e ADP, mantendo o processo hemostático, prevenindo assim a formação de coágulos e vaso-oclusão (YEGUTKIN, 2008). Essa ectoenzima inibe eficientemente a agregação plaquetária na presença de ATP e/ou ADP (SEVIGNY et al., 1997).

Vários estudos têm mostrado uma atividade alterada da enzima NTPDase em pacientes com diversas patologias (ARAÚJO et al., 2005; LEAL et al., 2005; LEAL et al., 2007, BAGATINI et al., 2008).

#### 2.4.2 5'- nucleotidase

A enzima ecto-5'-nucleotidase (CD73; EC 3.1.3.5) é uma glicoproteína ancorada na membrana via GPI (figura 4), a qual hidrolisa nucleotídeos monofosfatos até adenosina (ZIMMERMANN, 2001).

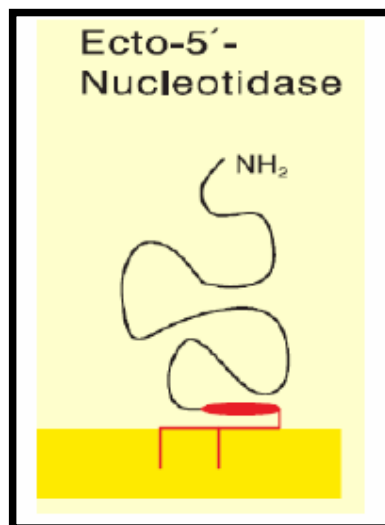


Figura 4 - Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana (Adaptado de ZIMMERMANN, 2001)

É expressa em uma variedade de tecidos como o nervoso, o renal e o hepático; e em diferentes tipos celulares entre os quais as plaquetas (ZIMMERMANN et al., 1992). Sete membros já foram caracterizados, apresentando diferentes localizações: cinco deles localizam-se no citosol, um na matriz mitocondrial e um ancorado na membrana plasmática. Todas as formas citoplasmáticas são dependentes de  $Mg^{2+}$ . Os sete membros diferem entre si através das suas propriedades moleculares e cinéticas, bem como de sua especificidade pelo substrato (BOROWIEC et al., 2006). A 5'-nucleotidase degrada AMP até adenosina, uma molécula com propriedades vasodilatadoras e antiagregantes (BAKKER et al., 1994; ZIMMERMANN, 2001).

A ativação plaquetária compreende uma fonte adicional de nucleotídeos extracelulares de adenina (ROBSON, 2001; MARCUS et al., 2003). A geração de AMP, através da hidrólise de ATP e ADP pela enzima NTPDase, é vista como protetora; pois limita a excessiva agregação plaquetária induzida pelo ADP (ROBSON et al., 1997). A enzima 5'-nucleotidase, por sua vez, degrada o AMP produzindo adenosina, um importante inibidor da agregação plaquetária (BOROWIEC et al., 2006). Durante o processo de hemostasia, as enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase têm importante função na regulação da agregação plaquetária (ENJYOJI et al., 1999).

### **2.4.3 Ecto-nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP)**

A família das NPPs (E.C. 3.1.4.1) incluem 7 membros (NPP1-7), numerados de acordo com sua ordem de descoberta (STEFAN, et al., 2005). Esses membros estão envolvidos em uma grande variedade de atividades biológicas, que incluem: a formação de ossos, a motilidade celular, as metástases tumorais e a resistência à insulina em diabetes do tipo II (GODING et al., 2003; STEFAN et al., 2006).

Somente os três primeiros membros dessa família, NPPs1-3, são capazes de hidrolisar nucleotídeos, as NPPs 6-7 hidrolisam ligações fosfodiéster em fosfolípidos e fosfoésteres de colina (STEFAN et al., 2006). Relata-se também a existência das NPPs 4 e 5, porém pouco se sabe sobre sua atividade catalítica (GODING et al., 2003). Embora essa família de enzimas esteja envolvida na hidrólise de nucleotídeos de adenina, elas também podem

hidrolisar GTP, TTP, CTP e UTP com eficiência similar (VOLLMAYER et al., 2003).

As NPP1-3 são detectadas em quase todos os tecidos (BOLLEN et al., 2000), embora isoformas individuais sejam, geralmente, confinadas em subestruturas específicas e/ou tipos de células (HARAHAP et al., 1988).

Todas NPPs têm, voltado para o meio extracelular, um domínio catalítico com 60% de identidade de aminoácidos entre as diferentes isoformas da enzima (STEFAN et al., 2005; STEFAN et al., 2006). Esse domínio catalítico é fixado à membrana por uma “haste” que consiste de porções ricas em cisteína (GODING, 2000).

Essas enzimas apresentam atividade de fosfodiesterase alcalina bem como atividade nucleotídeo pirofosfatase, hidrolisando uma grande quantidade de substratos. O p-nitrofenil- 5'-timidina-monofosfato (p-Nph-5'-TMP) é usado como substrato artificial específico para NPPs (SAKURA et al., 1998).

A E-NPP foi caracterizada em plaquetas de ratos, apresentando atividade catalítica adaptada para o meio extracelular e pH ideal entre 8.5-9 (FÜRSTENAU et al., 2006). As NPPs são metaloenzimas e sua atividade pode ser bloqueada por quelantes de metais, sendo que a atividade pode ser restaurada pela adição de cátions divalentes como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (BOLLEN et al., 2000). Notavelmente, uma distinção clara entre os membros da família da NPP e NTPDase é muitas vezes complicada devido a sua coexpressão em uma variedade de tecidos de mamíferos e às semelhanças compartilhadas na especificidade do substrato (ZIMMERMANN, 2000; ZIMMERMANN et al., 2007).

Pressupõem-se que exista uma coexpressão das enzimas NTPDase, E-NPP e 5'-nucleotidase em plaquetas, podendo-se dizer que elas constituem uma cadeia enzimática responsável pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares (FÜRSTENAU et al., 2006). As E-NPPs desempenham vários papéis fisiológicos, dentre os quais se destacam a reciclagem de nucleotídeos, a regulação dos níveis extracelulares de pirofosfato e o estímulo da motilidade celular (GODING et al., 2003).

As atividades das E-NPPs estão, frequentemente, alteradas em situações patológicas, sendo que sua atividade juntamente com outros exames

biológicos e clínicos pode tornar-se uma ferramenta útil para avaliar a progressão de algumas doenças (HAUGEN et al., 1976).

#### **2.4.4 Adenosina deaminase**

A enzima adenosina deaminase (ADA) (CD26; E.C. 3.5.4.4.) é uma enzima chave no metabolismo das purinas, catalisando a desaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxinosina, respectivamente (RESTA et al., 1998; ROBSON et al., 2006).

Em humanos, três formas moleculares da ADA já foram encontradas: a ADA1, um monômero com massa de aproximadamente 35 KDa, a ADA1+ CP, possui massa molecular de aproximadamente 28 KDa a qual é formada por duas moléculas de ADA1 combinadas por uma proteína de ligação (CP), e a ADA2 codificada por um gene separado de posição ainda desconhecida. Essas formas diferem entre si através de características como peso molecular, propriedades cinéticas e distribuição tecidual (HIRSCHHORN & RATECH, 1980; UNGERER et al., 1992). As duas primeiras possuem similaridades nas subunidades catalíticas e não diferem significativamente em suas propriedades cinéticas. Em contraste, a ADA2 tem menor afinidade para adenosina e menor atividade catalítica com a deoxiadenosina que a ADA1 (VAN DER WEYDEN et al., 1976; RATECH et al., 1981). A ADA1 está presente em todos os tecidos humanos e representa a maior parte da atividade da ADA total, enquanto que a ADA2 é a isoenzima predominante no soro (ZUKKERMAN et al., 1980).

Vários estudos afirmam que mudanças na atividade da ADA refletem alterações na imunidade (ADAMS et al., 1976; FISCHER et al., 1976; UNGERER et al., 1992). A ADA tem sido aceita como uma importante enzima na maturação e função dos linfócitos T. Essa atividade é relacionada com proliferação e diferenciação linfocítica (GALANTI et al., 1981). A elevada atividade da ADA no soro tem sido encontrada em pacientes com doenças onde a imunidade celular é estimulada. Por exemplo, atividade da ADA 1 está elevada em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (RATECH et al., 1988) e em pacientes com hepatite aguda (KOBAYASHI et al., 1993). A atividade da ADA 2 é elevada em pacientes com infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (GAKIS et al., 1989).

NAKAMACHI e colaboradores (2003) encontraram uma atividade aumentada da ADA no soro de pacientes com artrite reumatóide. Um aumento na atividade dessa enzima poderia levar ao decréscimo dos níveis de adenosina na circulação. Essa situação pode estar relacionada com o desenvolvimento de complicações vasculares, observada em pacientes com artrite reumatóide, já que a adenosina tem um importante papel na prevenção de processos trombóticos e possui propriedades anti-inflamatórias (SOSLAU et al., 1997).

## **2.5 Ectonucleotidases associadas a Patologias**

Os nucleotídeos extracelulares podem ser relacionados com o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo desordens do sistema imune e doenças vasculares e neurodegenerativas (SEYE et al., 2003; BOURS et al., 2006; ROBSON et al., 2006). As enzimas responsáveis pela hidrólise desses nucleotídeos, conseqüentemente, também estão relacionadas com diversas patologias.

Em um trabalho realizado com pacientes com carcinoma de mama, a atividade da NTPDase em plaquetas encontra-se alterada na presença do tumor e também em função do uso de tamoxifeno (ARAÚJO et al., 2005).

Em pacientes com infarto agudo do miocárdio observou-se um aumento na atividade da enzima NTPDase plaquetária quando comparado ao controle, possivelmente, funcionando como um mecanismo que atenuaria o evento trombótico que ocorre no infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et al., 2008).

Já foi descrito o perfil da enzima 5'-nucleotidase em associação a doenças humanas importantes (LUNKES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005; LEAL et al., 2007). Em gestantes as atividades tanto da NTPDase quanto da 5'-nucleotidase encontram-se alteradas conforme a presença de fatores de risco associados à gestação, como hipertensão e o diabetes. As atividades das enzimas encontram-se aumentadas de maneira independente dos fatores de risco associados, e estariam mantendo a hemostasia uma vez que estão envolvidas no processo de anticoagulação (LEAL et al., 2007).



A atividade da enzima E-NPP sérica foi encontrada aumentada na gravidez normal (HAUGEN et al., 1976) e em alguns tipos de câncer e doença hepática colestática (HYNIE et al., 1975; HAUGEN et al., 1976).

Uma atividade aumentada da ADA sérica foi encontrada em doenças hepáticas, na tuberculose, na monucleose infecciosa, na pneumonia e na artrite reumatóide o que reflete que haveria um envolvimento do sistema imune (KOEHLER & BENZ, 1962; UNGERER et al., 1992), já que a ADA atua na maturação e função dos linfócitos T (GALANTI et al., 1981).

## **2.6 Doença Cardiovascular e Artrite Reumatóide**

A AR é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia autoimune, que caracteriza-se por sinovite crônica, simétrica e erosiva, preferencialmente, de articulações periféricas (KELLEY et al., 1997). Os pacientes portadores de AR têm uma sobrevida menor que a da população em geral (ALAMANOS & DROSOS, 2005). As principais causas da morte nesses pacientes são infecções, doenças linfoproliferativas, doença cardiovascular (DCV) e cerebrovascular e complicações gastrointestinais (PRIOR et al., 1984; WOLFE et al., 1994).

Alguns estudos têm confirmado que a DCV é a causa mais comum de mortalidade em pacientes com AR (SOLOMON et al., 2003; GOODSON et al., 2005), havendo um aumento da incidência de insuficiência cardíaca congestiva e uma acelerada aterosclerose (DEL RINCON et al., 2003; GONZALEZ-GAY et al., 2005).

A inflamação é uma característica intrínseca da AR, e tem sido reconhecido que o processo inflamatório também tem um importante papel na aterosclerose (KULLO et al., 2000). Essa patogênese compartilhada poderia explicar a relação existente entre AR e DCV (PASCERI & YEH, 1999), já que as evidências sugerem que fatores clássicos de risco não explicariam o excesso de doença vascular em pacientes com AR (DEL RINCON et al., 2001).

Na AR o sítio primário de inflamação é o tecido sinovial, o qual libera citocinas na circulação sistêmica (MCINNES, 2001). Portanto, a inflamação sistêmica ocorre na AR, como evidenciado por elevados níveis de marcadores inflamatórios no sangue e pela presença de manifestações extra-articulares.

Esse fenômeno produz um espectro de mudanças proaterogênicas que incluem a disfunção endotelial, a resistência à insulina, a dislipidemia, os efeitos protrombóticos e o estresse oxidativo (SATTAR et al., 2003).

A disfunção endotelial é um evento chave na iniciação da lesão da aterogênese, contribuindo para o desenvolvimento de características clínicas dos estágios avançados da doença vascular, incluindo progressão da placa aterosclerótica (VITTA et al., 2002; BACON, 2005). A injúria e a ativação do endotélio levam à alteração da permeabilidade endotelial e ao aumento da adesão de leucócitos e de plaquetas (SATTAR et al., 2003).

As plaquetas são conhecidas por ter um importante função na manutenção da integridade endotelial e hemostasia (MARCUS et al., 1997), possuindo um papel chave na aterotrombose (GAWAS, 2006), a qual está relacionada com doenças cardiovasculares.

A Artrite Reumatóide é uma doença inflamatória crônica caracterizada por proliferação sinovial, destruição óssea e degradação da cartilagem articular, desencadeada por processo autoimune (KELLEY et al., 1997). Onde vários fatores influenciam a expressão e ocorrência da doença (ALAMANOS et al., 2005).

### **3 MANUSCRITO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se compondo o próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O manuscrito está submetido à revista *Clinical Biochemistry*.

Type of paper: Clinical investigation, full paper

## **ACTIVITIES OF ENZYMES THAT HYDROLYZE ADENINE NUCLEOTIDES IN PLATELETS FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS**

Lara V. Becker <sup>b</sup>, Cintia S. Rosa <sup>b</sup>, Viviane do C. G. Souza <sup>d</sup>, Margarete D. Bagatini <sup>b</sup>, Ana Paula S. Lima <sup>b</sup>, Claudio Alberto M. Leal <sup>b</sup>, João Carlos N. da Silva<sup>c</sup>, Maria Beatriz Moretto <sup>a</sup>, Francielle de V. Pinheiro <sup>a</sup>, Vera Maria Morsch <sup>b</sup>, Maria Rosa C. Schetinger <sup>b</sup>, Daniela B. R. Leal <sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

<sup>b</sup> *Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

<sup>c</sup> *Ambulatório de Reumatologia, Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

<sup>d</sup> *Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

\* Corresponding author:

Daniela Bitencourt Rosa Leal

Fax: + 55-55322-08242

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 20, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil

e-mail: [danibr@smail.ufsm.br](mailto:danibr@smail.ufsm.br)

**Abstract**

**Objectives:** To investigate whether there are changes in the activity of the enzymes NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA in platelets from patients with rheumatoid arthritis (RA).

**Design and methods:** Thirty-five RA patients diagnosed with RA through American College of Rheumatology criteria, as well as 35 healthy patients were selected. NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities were verified in platelets isolated from these patients.

**Results:** The results demonstrate that an increase in NTPDase (approximately 100%), 5'-nucleotidase (170%), E-NPP (approximately 100%) and ADA (approximately 45%) activities occurred in RA patients when compared to the control group.

**Conclusions:** Ours results suggest an increase in the NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP activities, which could be related to a compensatory organic response to excessive platelet aggregation which occurs during the inflammation. The increased ADA activity found in this work could lead to a decrease in the adenosine concentration in the circulation, which could explain the accelerated atherosclerosis found in patients with RA.

*Key words: rheumatoid arthritis, platelets, adenine nucleotides, adenosine, atherosclerosis*

## **Introduction**

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic immune-inflammatory multisystem disease of unknown etiology, characterized by predominant synovial proliferation, bone destruction and degradation of articular cartilage [1]. In the long-term, this disease is characterized by significant morbidity, loss of functional capacity and increased mortality. This disease affects approximately 1% of the general population worldwide and the main cause of death in patients with RA is cardiovascular disease (CVD) [2].

Inflammation is an intrinsic part of RA and it has been recognized that inflammation also plays an important role in atherosclerosis. This shared pathogenesis may explain the link between RA and CVD [3]. Endothelial dysfunction is a key event in the initiation of atherogenesis, injury and activation of the endothelium, altering endothelial permeability and increasing the adhesion of leukocytes and platelets. Platelet adhesion and thrombus formation is a ubiquitous feature in the initiation and generation of atherosclerotic lesions [4].

Extracellular adenine nucleotides such as ATP, ADP and adenosine are known to regulate the vascular response to endothelial damage by interacting with specific receptors in platelets and endothelial cells [5]. ADP is a major promoter of platelet aggregation and its metabolism in circulation is important for the regulation of platelet activation and recruitment. In contrast, adenosine is a potent inhibitor of this aggregation which is known to afford anti-inflammatory and analgesic properties and to influence the proliferation, survival or apoptosis of many different cells, working as a potent suppressor in the immune system [6]. Studies have suggested a complex role of ATP in the regulation of platelet

aggregation [7]. In vitro studies showed that high concentrations of ATP inhibit ADP-induced platelet aggregation. [8].

Platelets express a multienzymatic complex on their surface, which is responsible for extracellular nucleotide hydrolysis. This complex includes enzymes such as NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase), Ecto-NPP (ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase), ecto-5'-nucleotidase and ecto-adenosine deaminase(ADA) [9].

NTPDases are a group of ectoenzymes capable of hydrolyzing nucleoside tri and/ or diphosphates to adenosine monophosphate, and require millimolar concentrations of  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Mg}^{+2}$  for maximal activity [10]. E-NPPs hydrolyze 5'-phosphodiester bonds into nucleotides and their derivatives, releasing 5'-nucleotide monophosphates [11]. AMP resulting from the action of NTPDase and E-NPP is subsequently hydrolyzed to adenosine by the enzyme ecto-5'-nucleotidase. In contrast to NTPDase, 5'-nucleotidase is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored enzyme [12]. ADA is another important enzyme, which catalyzes the irreversible deamination of adenosine and 2'-deoxyadenosine to inosine and 2'-deoxyinosine respectively, therefore contributing to the removal of adenosine from the extracellular compartment [13].

Together, these enzymes constitute a highly organized enzymatic cascade that is able to regulate the extracellular concentration of adenine nucleotides and nucleosides, having an important role in the maintenance of normal homeostasis and in the prevention of excessive platelet aggregation [14].

More studies have confirmed that CVD is the most common cause of mortality in RA, and accelerated atherosclerosis has been observed in these patients [15]. It has become clear that besides their role in homeostasis and

thrombosis, platelets regulate a variety of inflammatory responses and have a key function in atherothrombosis [16]. Considering the importance of platelets in the development of atherosclerosis, and the importance of nucleotides in the regulation of platelet aggregation, this work evaluated NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase and ADA activities in platelets of patients with RA.

## **Patients and methods**

### *Chemicals*

The substrates ATP, ADP, AMP, p-nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate(p-Nph-5'-TMP), adenosine, as well as Trizma base, sodium azide, HEPES and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) and bovine serum albumin,  $K_2HPO_4$ , from Reagen. All the other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

### *Patients and samples*

Thirty-five RA patients (age  $49.77 \pm 12.11$  years) from the Federal University of Santa Maria Hospital were selected for the study and group control consisted of Thirty-five healthy subjects ( $45.31 \pm 8.96$  years). The diagnostic of RA was based in the criteria of American College of Rheumatology [17]. Subjects with hypertension were excluded from the study. Ten milliliters of blood was obtained the each patient and used for platelets-rich plasma preparation and other biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group. The protocol was approved by the Human Ethics Committee



of the Health Science Center from Federal University of Santa Maria, protocol number 23081.018984/2008-93, Brazil. All subjects gave written informed consent to participate in the study.

#### *Platelet preparation*

Platelets were prepared from human donors by the method of Pilla et al. [18] modified by Lunkes et al. [19] Briefly, blood was collected into 0.129 M citrate and centrifuged at 160 x g for 15 min. The platelet-rich plasma was centrifuged at 1400 x g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES isosmolar buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer and protein was adjusted to 0.4–0.6 mg/mL and used to determine enzymatic activities. The integrity of the platelet preparation was confirmed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer).

#### *NTPDase and 5'-nucleotidase activity determination*

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 µL as describe by Lunkes et al. [19]. For AMP hydrolysis, the 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, except that the 5 mM CaCl<sub>2</sub> was replaced by 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Twenty microliters of the enzyme preparation (8-12 µg of protein) was added to the reaction mixture and 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 mM, and the time of incubation was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200  $\mu$ L 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 method of Chan et al. [20] using malachite green as the colorimetric reagent and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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.

#### *E-NPP activity determination*

The E-NPP activity from platelets was assessed using p-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (p-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Fürstenau et al. [9]. The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose and 5.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8.9, was preincubated with approximately 20  $\mu$ g per tube of platelet protein for 10 min at 37  $^\circ\text{C}$  to a final volume of 200  $\mu$ L. The enzyme reaction was started by the addition of p-Nph-5'-TMP at a final concentration of 0.5 mM. After 80 min of incubation, 200  $\mu$ L NaOH 0.2N 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  $18.8 \times 10^{-3} \text{ M/cm}$ . Enzyme activity were expressed as nmol p-nitrophenol released/min/mg protein.

#### *Adenosine deaminase activity determination (ADA)*

ADA activity from platelets was determined according to Giusti and Galanti [21] which is based on the direct measurement of the formation of ammonia, produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 60 min. The protein content used for the platelet experiment was adjusted to between 0.7 and 0.9 mg/mL. Results were expressed in units per liter (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.

#### *Platelet aggregation*

Platelet aggregation was measured by the method of Born and Cross [22] by turbidimetric measurement with a Chrono-log optical aggregometer, with AGGRO/LINK<sup>®</sup> Model 810-CA software for Windows version 5.1. The preparation of platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of blood for 20 min at 1000 rpm and the preparation of platelet poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation of the sample by 3700 rpm for 30 minutes. After calibration of the aggregometer, the patient's data concerning the assays and reagents were entered on a computer coupled to the equipment, and the patient's test was then performed. Aggregation was measured at 37 $^{\circ}\text{C}$  and expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline at 5 min after the addition of the agonist ADP at concentrations of 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$ , with platelet poor plasma as a reference. The results were expressed as percentage of aggregation.

*Effects in vitro of drugs used in the treatment of patients with RA on activity of enzymes that degraded adenine nucleotides and nucleoside*

The in vitro effects of methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone 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 drugs used in vitro represent approximately the mean plasma values of the medication [23,24,25,26].

*Protein determination*

Protein content was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford [27], using bovine serum albumin as the standard. This assay is based on the binding of the dye Coomassie Blue G-250 to protein, and this binding is accompanied by measuring the absorbance maximum of the solution at 595 nm.

*Statistical analysis*

The data obtained for the enzyme activities in platelets from patients were analyzed statistically by the Student's T test for independent samples. The in vitro effects of the drugs upon ectoenzymes activities were evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference in all analyses used. All data were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### *LDH determination*

Almost 4% of the platelets were disrupted indicating that the preparation was predominantly intact, as observed by LDH determination (data not shown).

### *ATP, ADP and AMP hydrolysis*

The results obtained for ATP, ADP and AMP hydrolysis are shown in Fig. 1, demonstrating that platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities were altered in patients with RA. As can be observed, ATP hydrolysis was increased in the RA patient group ( $23.35 \pm 1.04$  nmol Pi released/min/mg of protein) when compared with the control group ( $11.16 \pm 0.39$  nmol Pi released/min/mg of protein) ( $p < 0.001$ ). The results showed enhanced ADP hydrolysis in patients with RA ( $13.76 \pm 0.52$  nmol Pi released/min/mg of protein) in relation to the control group ( $7.38 \pm 0.26$  nmol Pi released/min/mg of protein) ( $p < 0.001$ ). The same behavior was observed in AMP hydrolysis ( $8.21 \pm 0.44$  nmol Pi released/min/mg of protein,  $3.04 \pm 0.15$  nmol Pi released/min/mg of protein for patients and controls, respectively ( $p < 0.001$ )).

### *Ecto-NPP activity*

The results obtained for the E-NPP activity are shown in Fig. 2. Statistical analysis showed a significant increase in the RA group ( $5.47 \pm 0.27$  nmol p-nitrophenol released/min/mg protein) when compared with the control group ( $2.44 \pm 0.12$  nmol p-nitrophenol released/min/mg protein) ( $p < 0.001$ ).

### *ADA activity*

ADA activity in the platelets, shown in Fig. 3, was significantly increased in the RA group ( $5.75 \pm 0.48$  U/L) in relation to the control group ( $3.95 \pm 0.25$  U/L) ( $p < 0.01$ ).

### *Platelet aggregate*

Using ADP as an agonist, there were no differences between RA and control groups at any of the tested concentrations (data not shown).

### *Effects of drugs used in the treatment of rheumatoid arthritis on NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities*

Concentrations of methotrexate (0, 5, 10 and 15  $\mu$ M), leflunomide (0, 25, 35 and 45  $\mu$ g/mL), hydroxychloroquine (0, 540, 1079 and 1618 ng/mL) and prednisone (0, 15, 25 and 35  $\mu$ g/mL) were tested in vitro. The results obtained, shown in Tables 1 and 2, demonstrate that NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities were not affected by the presence of the medications at the concentrations cited above.

## **Discussion**

Rheumatoid arthritis and atherosclerosis have similar pathogenic mechanisms, including the involvement of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)-alpha and auto reactive T cells [28]. In RA, the synovial tissue is the first place where inflammation occurs, releasing cytokines into the systemic circulation. These circulating cytokines may alter the function of distant tissues, including adipose, skeletal muscle, liver and vascular

endothelium; generating a spectrum of proatherogenic changes that includes: prothrombotic effects, pro-oxidative stress and endothelial dysfunction. These changes in turn converge to promote atherogenesis [29], leading to the subsequent development of cardiovascular (CV) events.

Platelets are known to play a major role in the maintenance of endothelial integrity and homeostasis. They also participate in inflammatory responses as well as events leading to thrombus formation [6]. Platelet activation, which occurs during the adhesion process, and thrombus formation are a ubiquitous feature in the initiation and generation of atherosclerosis lesions [4]. Activation of circulating platelets occurs in patients with RA [30]. Excessive platelet aggregation can occur in injured vasculature, as a consequence of inflammation [31].

Extracellular nucleotides such as ATP and ADP and their nucleoside adenosine are able to regulate the vascular response to endothelial damage by exerting a variety of effects on platelets [10]. The effects of extracellular nucleotides are mediated by cell surface receptors belonging to two structurally distinct families: the G- protein- coupled receptors (P2Y) and the ligand-gated ion channel (P2X). ADP can interact with P2Y receptors and ATP interacts with P2X and P2Y receptors [32]. Four adenosine receptors have been described: A1, A2A, A2B and A3. These receptors are transmembrane glycoproteins coupled to protein G [33].

The extensive tissue damage in inflammatory processes may lead to a significant increase in levels of purine and pyrimidine nucleotides on the sites involved, probably contributing to the amplification of the inflammatory reaction. It is well documented that ATP is often found in the synovial fluid of RA patients

[34]. The metabolism of extracellular nucleotides of adenosine and their nucleoside adenosine occurs by the action of enzymes such NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase and ADA; which constitute a multiple system for extracellular nucleotide degradation [35].

The alteration in activity of these enzymes has been observed in various diseases, suggesting that this could be an important physiological and pathological parameter [36,37,38]. The results of present study show an increase in NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities in patients with RA when compared with the control group. While the enzymes, NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA, constitute a multiple system for extracellular nucleotide hydrolysis, we may suggest that the increase of these activities reflects an increased degradation of the mentioned nucleotides as a compensatory organic response.

As large amounts of ATP are released from injured cells, the rapid hydrolysis of ATP and ADP (by NTPDase and E-NPP) and AMP (by 5'-nucleotidase) favors the production of adenosine, which possesses anti-inflammatory and analgesic properties [32]. ATP has an important physiological role in platelet activation associated with homeostasis and thrombosis under normal and pathological conditions. Therefore, the organism could avoid thrombotic processes by depleting ADP and enhancing adenosine production which induces vasodilatation and inhibits platelet aggregation [7]. NTPDase and E-NPP prevent blood platelet aggregation directly, decreasing the ADP concentration, and the enzyme 5'-nucleotidase increases the adenosine concentration. With raised activities of NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP, the organism would decrease platelet aggregation avoiding thrombus formation.



Corroborating with our results, Nakamachi et al. [39] found increased ADA activity in patients with RA. A rise in ADA activity leads to a decrease of adenosine levels in the circulation. This situation may be related to the development of vascular complications observed in patients with RA, since adenosine has an important role in the prevention of thrombotic processes and anti-inflammatory properties [33].

Although excessive platelet aggregation can occur as a consequence of inflammation [34], our data show that there was no significant difference in platelet aggregation in the RA group when compared to the control group, possibly due to the action of NTPDase and E-NPP, which hydrolyze ADP, a molecule with aggregation properties [6].

The increased activity of ADA (approximately 45%) is not proportional to the rise in the activities of NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP (approximately 100%). With the increase of NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP activities there is a decrease of ADP, an aggregant, generating a large amount of adenosine which is converted to inosine by ADA. However, the increase of ADA activity observed in this work is smaller than the rise of NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP activities. The adenosine generated by these enzymes is not fully converted, which may explain why there was no change in platelet aggregation observed in this work. This mechanism could be seen as a compensatory response of the organism, since ADA activity is increased in patients with RA compared to control, which would favor inflammation in these patients.

To exclude a direct effect of drugs commonly used for treatment of RA, we investigated the influence of methotrexate (MTX), leflunomide,

hydroxychloroquine and prednisone in nucleotide hydrolysis. Methotrexate, a folate antagonist, inhibits the production of cytokines that promote inflammation while enhancing the production of cytokines with anti-inflammatory properties [40]. Animal model evidence suggests that low-dose MTX treatment promotes an accumulation of adenosine, a potent anti-inflammatory agent [41]. Leflunomide limits the proliferation of in vitro activated lymphocytes by inhibiting dihydroorotate dehydrogenase [42]. Hydroxychloroquine inhibits a variety of macrophage-derived cytokines and, to a lesser extent T-cell molecules [43]. The mechanism of prednisone is manifold, including: inhibition of enzyme phospholipase, responsible for generating the precursor of prostaglandins, and suppression of humoral and cellular immunity [44].

Our results did not show any significant alteration in NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activity when methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone were used. We suggest that the increase observed in nucleotide hydrolysis is not caused by the medicines used in RA.

In conclusion, these results show that the increased enzyme activity (NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP) decreases the concentration of ADP, an aggregant, producing adenosine, thus generating a compensatory mechanism. However, ADA converts adenosine rapidly, favoring the inflammatory process by decreasing the concentration of this molecule which has anti-inflammatory properties. This inflammatory process is an important mechanism involved in the development of endothelial dysfunction and atherosclerotic disease in patients with RA.

**Acknowledgments**

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

## References

- [1] Kamanli A, Naziroglu M, Aydilek N, et al. Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 2004; 22:53-7.
- [2] Myllykangas-Luosujarvi R, Aho K, Kautiainen H, et al. Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:1065-7.
- [3] Kullo I, Gau G, Tajik A. Novel risk factors for atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2000;75:369-80.
- [4] Vitta JA, Keaney Jr JF. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002;106:640-2.
- [5] Leon C, Hechler B, Vial C, et al. The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonist by ATP and expressed in platelets and megakaryoblasti cells. *FEBS Lett* 1997;403:26-30.
- [6] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, et al. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 1997;99:1351-60.
- [7] Birk AV, Broekman J, Gladek EM, et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J Lab Clin Med* 2002;140:166-175.
- [8] Park HS, Hourani SM. Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5-diphosphate (ADP) in human platelet. *Br J Pharmacol* 1999;127:1359-66.
- [9] Fürstenau CR, Trentin DS, Barreto-Chaves MLM, et al. 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.

[10] Pearson JD, Carleton JS, Gordon JL. Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem J* 1980;190:421-429.

[11] Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 2004; 43:5511-5519.

[12] Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006;2:351-360.

[13] Franco R, Casado V, Ciruela F, et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 1997;52:283-294.

[14] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2008;1783:673-694.

[15] Goodson N, Marks J, Lunt M, et al. Cardiovascular admissions and mortality in an inception cohort of patients with rheumatoid arthritis with onset in the 1980s and 1990s. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1595-601.

[16] Gawaz, M. Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:206-210.

[17] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.

[18] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E.C. 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 2006;7:225-230.

- [19] Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2004;109:189-194.
- [20] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375-378.
- [21] Guisti G, Galanti B. Colorimetric Method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim 1984; 315-323.
- [22] Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963;95:168-78.
- [23] Estlin EJ. Continuing therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: clinical and cellular pharmacology of methotrexate, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *Cancer Treat Rev* 2001;27:351-363.
- [24] Chan V, Charles BG, Tett SE. Rapid determination of the active leflunomide metabolite A77 1726 in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 803 2004;331–335.
- [25] Haaksonen AL, Koshiade V, Juva K. Dosage of antimalarial drugs for children with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. A clinical study with determination of serum concentrations of chloroquine and hydroxicloroquine. *Scand J Rheumatol* 1974; 3:103.
- [26] Goyal RN, Bishnoi S. Simultaneous voltammetric determination of prednisone and prednisolone in human body fluids. *Talanta* 2009;768–774.
- [27] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.

- [28] Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999;100:2124-6.
- [29] McInnes IB. Rheumatoid arthritis: from bench to bedside. *Rheum Dis Clin North Am* 2001;27:373-387.
- [30] Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, et al. Increased circulating platelet-leukocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erithematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol* 2001;115:451-459.
- [31] Massberg S, Brand K, Gruner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002;196:887-896.
- [32] Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, et al. Nomenclature and classification of purinoreceptors. *Pharmacol Rev* 1994;46:143-152.
- [33] Merighi S, Mirandola P, Varani K, et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* 2003;100:31-48.
- [34] Ryan LM, Rachow JW, McCarty. Synovial fluid ATP: a potential substrate for the production of inorganic pyrophosphate. *J Rheumatol* 1991; 18:716-720
- [35] Frassetto SS, Dias Rd, Sarkis JJF. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3615) in rat blood platelets. *Mol Cell Biochem* 1993;1:47-55.
- [36] Maldonado, PA, Corrêa MC, Becker LV, et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. *Clin Biochem* 2008;41:400-406.

- [37] Bagatini Md, Martins CC, Battisti V, et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2008;41:1181-1185.
- [38] Schmatz R, Schetinger MRC, Spanevello RM, et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2009;84:345-350.
- [39] Nakamachi Y, Koshiba M, Nakazawa T, et al. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003;48:668-674.
- [40] Firestein GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, Editors. *Textbook of rheumatology*. Vol 1 5th ed. Philadelphia: Saunders 1997:851-97.
- [41] Crostein BN. Methotrexate and its mechanism of action. *Arthritis Rheum* 1996;39:1952-60.
- [42] Fox RI. Mechanism of action of leflunomide in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998;25:20-6.
- [43] Sobsky MA, Wallace DJ. New therapies in systematic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002;16:293-312.
- [44] Wilder RL. Corticosteroids. In: Mc Carty DJ, Koopman WJ, editors. *Arthritis and Allied Conditions: A textbook of Rheumatology*, 13th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins. 1996; 731-750.

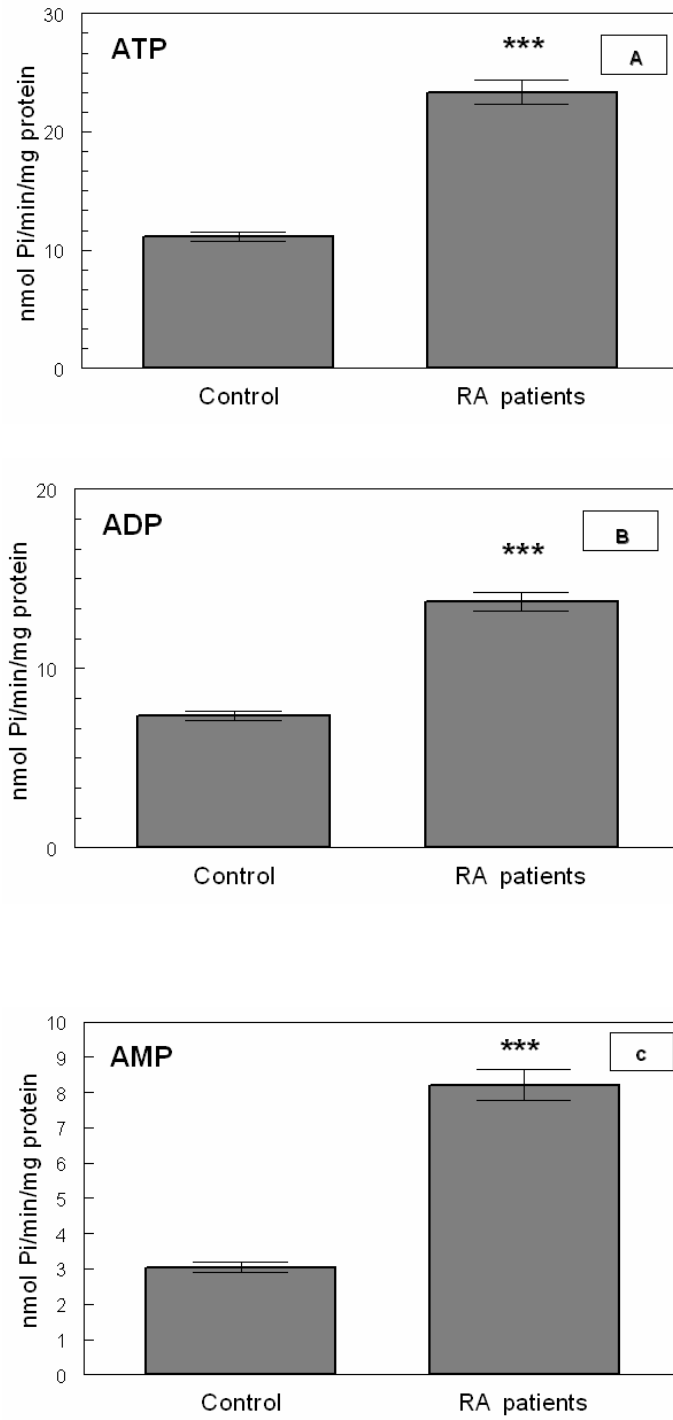


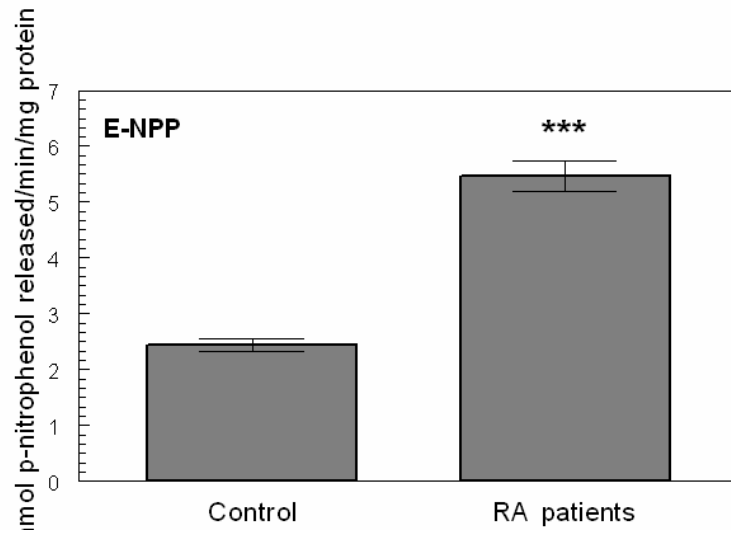
## Figure Legends

**Fig.1.** ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in platelets of rheumatoid arthritis patients (RA). Bars represent mean $\pm$ SEM. The symbol \*\*\* represents statistical difference from the control group (Student's T test,  $p < 0.001$ ,  $n = 35$ ).

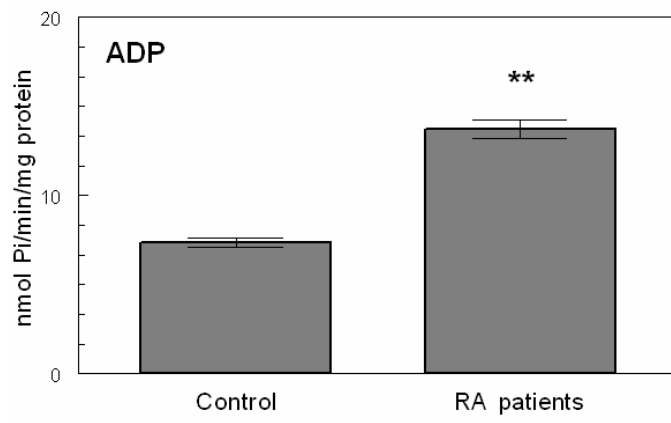
**Fig.2.** E-NPP activity in the platelets of rheumatoid arthritis patients (RA). Bars represent mean $\pm$ SEM. The symbol \*\*\* represents statistical difference from the control group (Student's T test,  $p < 0.001$ ,  $n = 35$ ).

**Fig.3.** ADA activity in the platelets of rheumatoid arthritis patients (RA). Bars represent mean $\pm$ SEM. The symbol \*\* represents statistical difference from the control group (Student's T test,  $p < 0.01$ ,  $n = 30$ ).

**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

Table 1- In vitro effect of methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone on NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of healthy subjects.

<b>Drugs</b>	<b>NTPDase (ATP)</b>	<b>NTPDase (ADP)</b>	<b>5'-nucleotidase (AMP)</b>
<b>Methotrexate</b>			
0 $\mu$ M	14.84 $\pm$ 1.26	7.90 $\pm$ 1.66	5.18 $\pm$ 0.48
5 $\mu$ M	16.36 $\pm$ 1.35	7.78 $\pm$ 0.99	4.47 $\pm$ 0.33
10 $\mu$ M	15.59 $\pm$ 0.95	7.47 $\pm$ 0.85	4.80 $\pm$ 0.8
15 $\mu$ M	15.36 $\pm$ 1.60	6.00 $\pm$ 0.50	4.70 $\pm$ 0.19
<b>Leflunomide</b>			
0 $\mu$ g/ml	17.41 $\pm$ 2.01	8.69 $\pm$ 2.33	5.26 $\pm$ 1.02
25 $\mu$ g/ml	17.17 $\pm$ 2.68	15.50 $\pm$ 1.75	7.05 $\pm$ 2.00
35 $\mu$ g/ml	13.16 $\pm$ 1.59	8.53 $\pm$ 2.17	5.86 $\pm$ 1.70
45 $\mu$ g/ml	16.75 $\pm$ 2.51	11.95 $\pm$ 2.02	6.01 $\pm$ 1.61
<b>Hydroxychloroquine</b>			
0 ng/ml	23.88 $\pm$ 1.74	13.25 $\pm$ 1.62	6.46 $\pm$ 0.93
540 ng/ml	22.41 $\pm$ 1.58	11.89 $\pm$ 2.47	4.75 $\pm$ 1.10
1079 ng/ml	21.97 $\pm$ 1.38	11.38 $\pm$ 1.82	3.99 $\pm$ 0.14
1618 ng/ml	23.79 $\pm$ 1.07	14.32 $\pm$ 2.55	4.28 $\pm$ 0.22
<b>Prednisone</b>			
0 $\mu$ g/ml	11.02 $\pm$ 0.67	7.40 $\pm$ 0.90	4.09 $\pm$ 0.21
15 $\mu$ g/ml	11.25 $\pm$ 0.65	8.14 $\pm$ 1.10	4.93 $\pm$ 0.25
25 $\mu$ g/ml	11.55 $\pm$ 0.49	6.47 $\pm$ 0.99	4.66 $\pm$ 0.50
35 $\mu$ g/ml	11.38 $\pm$ 0.65	5.97 $\pm$ 0.91	4.60 $\pm$ 0.25

Data were evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Values represent mean  $\pm$  SEM (nmol Pi/min/mg protein) (n=4).

Table 2- In vitro effect of methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone on E-NPP and ADA activities in platelets of healthy subjects.

<b>Drugs</b>	<b>E-NPP</b>	<b>ADA</b>
<b>Methotrexate</b>		
0 $\mu$ M	2.55 $\pm$ 0.12	14.64 $\pm$ 6.11
5 $\mu$ M	2.44 $\pm$ 0.46	9.41 $\pm$ 2.37
10 $\mu$ M	2.41 $\pm$ 0.48	12.60 $\pm$ 1.17
15 $\mu$ M	2.53 $\pm$ 0.18	9.14 $\pm$ 1.69
<b>Leflunomide</b>		
0 $\mu$ g/ml	3.22 $\pm$ 0.57	12.49 $\pm$ 2.57
25 $\mu$ g/ml	3.32 $\pm$ 0.37	10.90 $\pm$ 1.73
35 $\mu$ g/ml	3.03 $\pm$ 0.40	10.62 $\pm$ 2.76
45 $\mu$ g/ml	3.20 $\pm$ 0.17	7.32 $\pm$ 3.11
<b>Hydroxychloroquine</b>		
0 ng/ml	5.67 $\pm$ 0.55	9.14 $\pm$ 2.78
540 ng/ml	6.12 $\pm$ 0.70	13.59 $\pm$ 1.14
1079 ng/ml	6.76 $\pm$ 0.68	10.27 $\pm$ 2.26
1618 ng/ml	5.58 $\pm$ 0.82	8.97 $\pm$ 2.02
<b>Prednisone</b>		
0 $\mu$ g/ml	2.47 $\pm$ 0.17	9.60 $\pm$ 2.76
15 $\mu$ g/ml	2.30 $\pm$ 0.27	11.29 $\pm$ 2.63
25 $\mu$ g/ml	2.40 $\pm$ 0.15	11.43 $\pm$ 0.78
35 $\mu$ g/ml	2.42 $\pm$ 0.16	11.21 $\pm$ 1.23

Data were evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Values represent mean  $\pm$  SEM (n=4). E-NPP activity expressed as nmol p-nitrophenol released/min/mg protein, and ADA activity expressed in U/L.

## 4 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se o envolvimento das enzimas denominadas ectonucleotidasas no processo de aterosclerose que ocorre nos pacientes com AR. A AR é uma doença inflamatória crônica que afeta a membrana sinovial, levando ao dano nas articulações e à destruição óssea, causando severa deficiência e aumento da mortalidade (CHOY & PANAYI, 2001). A causa mais comum de mortalidade em pacientes com AR é a doença cardiovascular (DCV) (SOLOMON et al., 2003; GOODSON et al., 2005). Esse risco aumentado para DCV é devido à acelerada aterosclerose que ocorre nesses pacientes (DEL RINCON & ESCALANTE, 2003).

O endotélio tem um importante papel na regulação do tônus vascular, na atividade plaquetária e na trombose. A injúria do endotélio vascular é um evento primário na aterosclerose (ROSS, 1999) e tem sido associada com a disfunção endotelial (CELERMAJER et al., 1992). Portanto, a disfunção endotelial é uma reconhecida via para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares (GOKCE et al., 2002). Nos pacientes com AR, o mecanismo que leva à disfunção endotelial envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias e de metabólitos anormais associados com a inflamação sistêmica (GONZALEZ-GAY et al., 2005).

As citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) e IL-6, geradas no tecido sinovial, podem ser liberadas na circulação sistêmica. Essas citocinas circulantes alteram a função de tecidos distantes, incluindo tecido adiposo, músculo esquelético, fígado e endotélio vascular, gerando um espectro de mudanças proaterogênicas que incluem os efeitos protrombóticos, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial (SATTAR et al., 2003). Portanto, a inflamação crônica pode levar à disfunção endotelial, à subsequente aterosclerose e a eventos cardiovasculares em pacientes com AR (GONZALEZ-GAY et al., 2005).

O endotélio intacto previne a adesão plaquetária na matriz intracelular (GAWAZ, 2006). Quando há injúria e ativação do endotélio ocorre uma

alteração na permeabilidade endotelial e aumento da adesão de leucócitos e de plaquetas (SATTAR et al., 2003).

As plaquetas têm um importante papel na manutenção da integridade endotelial e da hemostasia (MARCUS et al., 1997), e também participam da resposta inflamatória, bem como de eventos que levam à formação de trombos (ARBER et al., 1991). A ativação plaquetária e a formação de trombos são características onipresentes no início e na geração de lesão aterosclerótica (JOSEPH et al., 2001),

Os nucleotídeos extracelulares possuem um importante papel na modulação de uma variedade de processos ligados à inflamação vascular e à trombose (ROBSON et al., 2001) por exercerem uma variedade de efeitos sobre as plaquetas (BIRK et al., 2002). Grandes quantidades de ATP são liberadas das células durante a injúria, para que seja degradado no seu produto, a adenosina, a qual possui propriedades anti-inflamatórias (CRONSTEIN, 1994), vasodilatadoras, neuroprotetoras (JACOBSON et al., 2006), imunossupressoras (SPYCHALA et al., 1997) e atua como um potente inibidor da agregação plaquetária (BOROWIEC et al., 2006). O metabolismo dos nucleotídeos extracelulares de adenina e o nucleosídeo adenosina ocorre pela ação de enzimas como a NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e adenosina deaminase, constituindo um sistema para degradação de nucleotídeos (FRASSETO et al., 1993).

A avaliação da atividade das enzimas NTPDase e E-NPP revelou uma hidrólise aumentada de nucleotídeos em plaquetas de pacientes com AR. A atividade aumentada dessas enzimas poderia estar contribuindo para a diminuição da concentração de ADP, protegendo o organismo contra a formação de trombos e lesões ateroscleróticas, pois o ADP é um agregante plaquetário que provocar a ativação descontrolada de plaquetas desencadeando processos trombogênicos (SPYCHALA, 2000).

BAGATINI e colaboradores (2008) encontraram uma hidrólise aumentada de ATP, ADP e AMP em pacientes com IAM, sugerindo que o aumento da hidrólise de nucleotídeos poderia agir como um mecanismo que atenuaria o evento trombótico. Um dos eventos que ocorre no IAM é a ruptura da placa aterosclerótica, a qual resulta em eventos aterotrombóticos e consequente aumento da agregação plaquetária.



Já o aumento na atividade da enzima 5'-nucleotidase nas plaquetas dos pacientes com AR estaria favorecendo a produção de adenosina, um potente inibidor da agregação plaquetária. Portanto, as alterações observadas nas atividades das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e da E-NPP em plaquetas, poderiam ser consideradas como uma resposta compensatória do organismo frente à doença.

Corroborando com nossos resultados, HENDERSON e colaboradores (1980) encontraram um aumento na atividade da enzima 5'-nucleotidase na membrana sinovial de pacientes com AR. Já STOLK e colaboradores (1996) não encontraram diferença significativa na atividade da enzima 5'-nucleotidase de células mononucleares sanguíneas entre pacientes com AR, antes do tratamento com DMCD ou prednisona, e controles, sugerindo que a atividade da doença não estaria relacionada à atividade da enzima. Porém, nesse mesmo trabalho encontrou-se uma relação significativa entre a atividade da enzima 5'-nucleotidase e o gênero. A atividade da enzima foi 27% menor em homens do que em mulheres com AR, o que possivelmente poderia ser explicado pela diferença hormonal entre os sexos.

A avaliação da enzima ADA nas plaquetas dos pacientes com AR revelou também uma maior conversão da adenosina em inosina, diminuindo sua concentração, o que favoreceria o processo inflamatório, que estaria envolvido na disfunção endotelial e doença aterosclerótica.

YUKSEL & AKOGLU (1988) também encontraram um aumento da atividade da ADA em fluido sinovial de pacientes com AR quando comparados ao controle, sugerindo que a atividade da enzima poderia ser utilizada como diagnóstico da doença.

Embora a agregação plaquetária excessiva possa ocorrer em consequência da inflamação (ESMON 1993), nossos resultados não mostraram diferença significativa na agregação plaquetária induzida por ADP nos pacientes com AR em comparação ao controle. O aumento da atividade da ADA visto neste trabalho não foi proporcional ao aumento da atividade das outras enzimas (NTPDase, 5'-nucleotidase e E-NPP), o que poderia explicar o fato de que não houve alteração na agregação plaquetária, já que a princípio nem toda adenosina formada é convertida pela ADA. Porém, a atividade da ADA encontra-se aumentada, o que favoreceria a inflamação nos pacientes

com AR. NAKAMACHI e colaboradores (2003) também encontraram um aumento da atividade da ADA em pacientes com AR, o que levaria à diminuição dos níveis de adenosina na circulação, favorecendo o desenvolvimento de complicações vasculares nesses pacientes.

Para excluir possíveis efeitos das drogas utilizadas no tratamento da AR, como metotrexato, leflunomida, hidroxicloroquina e prednisona sobre a atividade das ectonucleotidases, foi avaliado *in vitro* o efeito desses medicamentos em plaquetas de voluntários saudáveis. Nossos resultados não mostraram nenhuma alteração significativa nas atividades da NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA quando diferentes concentrações dos medicamentos foram usados. Embora metotrexato seja relatado por aumentar as concentrações extracelulares de adenosina nos sítios da inflamação (CRONSTEIN 1995), nos estudos *in vitro* não houve alteração na atividade das enzimas.

EDE e colaboradores (2002) verificaram uma diminuição da atividade da ADA em células mononucleares sanguíneas de pacientes com AR, que faziam uso de MTX há 48 semanas, em comparação a pacientes com AR antes do tratamento. Esta alteração poderia ser explicado pela inibição direta da ADA pelo MTX, ou indiretamente, através de seus metabólitos. A inibição da rota de degradação levaria conseqüentemente ao aumento da concentração de adenosina extracelular.

Em resumo, pode-se concluir que a AR resulta em uma desordem sistêmica, provocando alterações bioquímicas. Essas alterações podem ser verificadas através das alterações nas atividades das ectonucleotidases em plaquetas de pacientes com AR, o que poderia estar relacionado com um mecanismo compensatório do organismo frente à doença.

## 5 CONCLUSÕES

- As alterações observadas nas atividades das enzimas podem estar relacionadas à uma resposta compensatória do organismo frente à doença, pois um aumento na atividade das enzimas levaria à diminuição da concentração de ADP, uma molécula com propriedades agregantes.
- A maior atividade da enzima ADA, diminuiria a concentração de adenosina, o que poderia favorecer o processo inflamatório que está envolvido no desenvolvimento de disfunção endotelial e lesões ateroscleróticas em pacientes com AR.
- O aumento da atividade da enzima ADA foi menor quando comparado ao aumento das atividades das outras enzimas (NTPDase, 5'-nucleotidase e E-NPP), sugerindo-se que nem toda adenosina gerada é convertida à inosina pela ADA, o que poderia explicar a normalidade da agregação plaquetária nos pacientes com AR. Essa normalidade também pode ser devido à aumentada hidrólise de ADP, o que diminuiria a concentração dessa molécula que possui propriedades agregantes.
- Como não foi observada influência dos fármacos utilizados no tratamento da AR nas concentrações testadas sobre a atividades das enzimas testadas *in vitro*, os resultados obtidos não foram em decorrência do uso dos medicamentos testados e sim da própria atividade da doença.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, A.; HARKNESS, R.A. Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues. **Clinical and Experimental Immunology**, v.26, p.647-9, 1976.

AHO, K.; KAIPAINEN-SEPPANEN, O.; HELIOVAARA, M.; KLAUKKA, T. Epidemiology of rheumatoid arthritis in finland. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.27, p.325-34, 1998.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A.A. Epidemiology of adults rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v.4, p.130-6, 2005.

ALBERS, J.M.; PAIMELA, L.; KURKI, P.; EBERHARDT, K.B.; EMERY, P.; VAN'T HOF, M.A.; SCHREUDER, F.H.; LEIRISALO-REPO, M.; VAN RIEL, P.L. Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.60, p.453-8, 2001.

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON RHEUMATOID ARTHRITIS GUIDELINES, Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v.46, p.328-46, 2002.

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

ARBER, N.; BERLINER, S.; PRAS, E.; ARBER, L.; FISHELSON, Z.; KAHN, Y.; BASSAT, M.B.; PINKHAS, J.; ARORSON, M. Heterotypic leucocyte aggregation in the peripheral blood of patients with leukaemia, inflammation and stress. **Nouvelle Revue Française D'Hématologie**, v.33, p.251-255, 1991.

ARNETT, F.C.; EDWORTHY, S.M.; BLOCH, D.A.; MCSHANE, D.J.; FRIES, J.F.; COOPER, N.S.; HEALEY, L.A.; KAPLAN, S.R.; LIANG, M.H.; LUTHRA, H.S.; et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v.31, p.315-24, 1988.

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

BACON, P.A. Endothelial cell dysfunction in systemic vasculitis: new developments and therapeutic prospects. **Current Opinion in Rheumatology**, v.17, p.49-55, 2005.

BAGATINI, M.D. ; MARTINS, C.C. ; BATTISTI, V. ; SPANEVELLO, R.M. ; GASPARETTO, D. ; ROSA, C.S. ; GONÇALVES, J.F. ; SCHETINGER, M.R.C ; SANTOS, R.B. ; MORSCH, V.M. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v.41, p.1181-1185, 2008.

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

BERGHOLM, R.; LEIRISALO-REPO, M.; VEKAVAARA, S.; MAKIMATTILA, S.; TASKINEN, M.R.; YKI-JARVINEN, H. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.22, p.1637-41, 2002.

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

BOLLEN, M.; GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; STALMANS, W.; STEFAN, C. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.393-432, 2000.

BOROWIEC, A.; LECHWARD, K.; TKACZ-STACHOWSKA, K.; SKLADANOWSKI, A.C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidase. **Acta Biochimica Polonica**, v.53, p.53:269-278, 2006.

BOURS, M.J.; SWENNEN, E.L.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.N.; DAGNELIE, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.358-404, 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews**, v.24, p.509-581, 1972.

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

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

CASTRO, H.C.; FERREIRA, B.L.A.; NAGASCHIMA, T.; SCHUELER, A.; RUEFF, C.; CAMISASCA, D.; MOREIRA, G.; SCOVINO, G.; BORGES, L.; LEAL, M.; FIGUEIRA, M.; PASCHOAL, P.; BERNARDO, V.; BOURGUINHON, S.; RODRIGUES, C.R.; SANTOS, D.O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina laboratorial**, v.42, p.321-332, 2006.

CELERMAJER, D.S.; SORENSEN, K.E.; GOOCH, V.M.; SPIEGELHALTER, D.J.; MILLER, O.I.; SULLIVAN, I.D.; LLOYD, J.K.; DEANFIELD, J.E. Non-

invasive detection endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. **Lancet**, v.340, p.1111-5, 1992.

CHOY, E.H.; PANAYI, G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. The **New England Journal of Medicine**, v.344, p.907-16, 2001.

COLGAN, S.P.; ELTZSCHIG, H.K.; ECKLE; THOMPSON, L.F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling**, v.2, p.351-360, 2006.

CRONSTEIN, B.N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **Journal of Applied Physiology**, v.76, p.5-13, 1994.

CRONSTEIN, B.N. The antirheumatic agents sulphasalazine and methothexate share an anti-inflammatory mechanisms. **British Journal of Rheumatology**, v.34, p.30-2, 1995.

DEL RINCON, I.D.; WILLIAMS, K.; STERN, M.P.; FREEMAN, G.L.; ESCALANT, A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. **Arthritis and Rheumatism**, v.44, p.2737-2745, 2001.

DEL RINCON, I.; ESCALANTE, A. Atherosclerosis cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. **Current Rheumatology Reports**, v.5, p.278-86, 2003.

DEL RINCON, I.; WILLIAMS, K.; STERN, M.P.; FREEMAN, G.L.; O'LEARY, D.H.; ESCALANTE A. Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. **Arthritis and Rheumatism**, v.48, p.1833-40, 2003.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J.M.; MORELLI, A.; TRBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O.R. Nucleotide

receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, p.587-600, 2001.

DORNER, T.; BURMESTER, G.R. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. **Current Opinion in Rheumatology**, v.15, p.246-52, 2003.

DUBYAK, G.R.; ELMOATASSIM, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. **The American Journal of Physiology**, v.265, p.C577-C606, 1993.

EDE, A.E.; LAAN, R.F.J.M.; ABREU, R.A.; STEGEMAN, A.B.J.; PUTTE, L.B.A. Purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.61, p.1060-1064, 2002.

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

ENGEL, A.; ROBERTS, J.; BURCH, T.A. Rheumatoid arthritis in adults. **Vital and Health Statistics 1**, v.11, p.1-43, 1966.

ESMON, C.T. Cell mediated events control blood coagulation and vascular injury. **Annual Review of Cell Biology**, v.9, p.1-26, 1993.

FISCHER, D.; VAN DEN WEYDEN, M.B.; SYNDERMAN, R.; KELLEY, W.N. The role for adenosine deaminase in human monocyte maturation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.58, p.399-407, 1976.

FOX, R.I. Mechanism of action of leflunomide in rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v.53, p.20-6, 1998.



FRASSETTO, S.S.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3615) in rat blood platelets. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v1, p.47-55, 1993.

FÜRSTENAU, C.R. ; TRENTIN, D.S. ; BARRETO-CHAVES, M.L.M. ; SARKIS, J.J.F. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**, v.17, p.17:84-91, 2006.

GABRIEL, S.E.; CROWSON, C.S.; O'FALONN, W.M. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. **Arthritis and Rheumatism**, v.42, p.415-20, 1999.

GACHET, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, p.58-86, 2006.

GAKIS, C.; CALIA, G.; NAITANA, A.; PIRINO, D.; SERRU, G. Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects: a hypothesis on the significance of ADA2. **Panminerva Medica**, v.31, p.107-13, 1989.

GALANTI, B.; NARDIELLO, S.; RUSSO, M.; FIORENTINO, F. Increased lymphocyte adenosine deaminase in typhoid fever. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.13, p.47-50, 1981.

GAWAZ, M. Platelets in the onset of atherosclerosis. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v.36, p.206-210, 2006.

GODING, J.W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **Journal of Leukocyte Biology**, v.67, p.285-311, 2000.

GODING, J.W.; GROBBEN, B.; SLEGERS, H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-pyrophosphatase/ phosphodiesterase family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1638, p.1-19, 2003.

GOKCE, N.; KEANEY JR, J.F.; HUNTER, L.M; WATKINS, M.T.; MENZOIAN, J.O.; VITA, J.A. Risk stratification for post-operative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. **Circulation**, v.105, p.1567-72, 2002.

GOLDRING, S.R. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v.14, p.406-10, 2002.

GOLDRING, S.R. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v.42, p.ii11-ii16, 2003.

GONZALEZ-ALONSO, J.; OLSEN, D.B.; SALTIN, B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery role of circulating ATP. **Circulation Research**, v.91, p.1046-1055, 2002.

GONZALEZ-GAY, M.; GONZALES-JUANATEY, C.; OLLIER, W.E. Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: influence of HLA-DRB1 alleles. **Autoimmunity Reviews**, v.3, p.301-4, 2004.

GONZALEZ-GAY, M.; GONZALES-JUANATEY, C.; MARTIN, J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.35, p.8-17, 2005.

GOODSON, N.; MARKS, J.; LUNT, M.; SYMMONS, D. Cardiovascular admissions and mortality in an inception cohort of patients with rheumatoid arthritis with onset in the 1980s and 1990s. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.64, p.1595-601, 2005.

GRAVALLESE, E.M.; MANNING, C.; TSAY, A.; NAITO, A.; PAN, C.; AMENTO, E.; GOLDRING, S.R. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. **Arthritis and Rheumatism**, v.43, p.250-258, 2000.

HARAHAP, A.R.; GODING, J.W. distribution of the murine plasma cell antigen PC-1 in non-lymphoid tissues. **Journal of Immunology**, v.141, p.2317, 1988.

HARRIS, E.D. **Rheumatoid arthritis**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997.

HAUGEN, H.F.; SKREDE, S. Nucleotide pyrophosphatase and phosphodiesterase I. Demonstration of activity in normal serum, and an increase in cholestatic liver disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.11, p.121-7, 1976.

HENDERSON, B.; JOHNSTONE, J.J.; CHAYEN, J. 5' nucleotidase activity in the human synovial lining in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.39, p.248-252, 1980.

HERMANN, F.; FORSTER, A.; CHENEVARD, R.; ENSELEIT, F.; HURLIMANN, D.; CORTI, R.; SPIEKER, L.E.; FREY, D.; HERMANN, M.; RIESEN, W.; NEIDHART, M.; MICHEL, B.A.; HELLERMANN, J.P.; GAY, R.E.; LÜSCHER, T.F.; GAY, S.; NOLL, G.; RUSCHITZKA, F. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. **Journal of the American College of Cardiology**, v.45, p.461-4, 2005.

HERMAN, S.; KRÖNKE, G.; SCHETT, G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v.14, p.245-252, 2008

HIRSCHHORN, R.; RATECH, H. Isozymes of adenosine deaminase. **Isozymes**, v.4, p.131-157, 1980.

HYNIE, I.; MUEFFELS, M.; POZNANSKI, W.J. Determination of phosphodiesterase I activity in human blood serum. **Clinical Chemistry**, v.21, p.1383-7, 1975.

HOCHBERG, M.C. Adult and juvenile rheumatoid arthritis: Update. **Epidemiologic Reviews**, v.12, p.247-252, 1990.

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

JACOBSON, K.A.; GAO, Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v.5, p.247-264, 2006.

JOSEPH, J.E.; HARRISON, P.; MACKIE, I.J.; ISENBERG, D.A; MACHIN, S.J. Increased circulating platelet-leukocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **British Journal of Haematology**, v.115, p.451-459, 2001.

KEATING, F.; WHITAKER, D.; KABBANI, S.; RICCI, M.; SOBEL, B.; SCHNEIDER, D. 2004. Relation of augmented platelet reactivity to the magnitude of distribution of atherosclerosis. **The American Journal of Cardiology**, v.94, p. 725-728, 2004.

KELLEY, W.N. RUDDY, S., SLEDGE, C.B. Eds. **Textbook of Rheumatology**. 5 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1997.

KIRLEY, T.L.; CRAWFORD, P.A.; SMITH, T.M. The structure of the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses. **Purinergic Signalling**, v.2, p.2:379-389, 2006.

KLIMIUK, P.A.; YANG, H.; GORONZY, J.J.; WEYAND, C.M. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. **Clinical Immunology**, v.90, p.65-78, 1999.

KOBAYASHI, F.; IKEDA, T.; MARUMO, F.; SATO, C. Adenosine deaminase isoenzymes in liver diseases. **The American Journal of Gastroenterology**, v.88, p.266-71, 1993.

KOEHLER, L.H.; BENZ, E. J. Serum adenosine deaminase: methodology and clinical applications. **Clinical Chemistry**, v.8, p.133-40,1962.

KUKULSKI, F.; LÉVESQUES, S.A.; LAVOIE, E.G.; LECKA, J. ; BIGONNESSE, F. ; KNOWLES, A.F. ; ROBSON, S.C. ; KIRLEY, T.L. ; SÉVIGNY, J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonist by NTPDase 1,2,3 and 8. **Purinergic Signalling**, v.1, p.193-204, 2005.

KULLO, I.; GAU, G.; TAJIK, A. Novel risk factors for atherosclerosis. **Mayo Clinic Proceedings**, v.75, p.369-80, 2000.

LEAL, C.A.M.; SCHETINGER, M.R.; LEAL, D.B.; BAUCHSPIESS, K.;SCHEREKKER, C.M.; MALDONADO, P.A.; MORSCH, V.M.; DA SILVA, J.E. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.304, p.325-330, 2007.

LEAL, D.B. ; STREHER, C.A.; BERTONCHELI, C.M.; CARLI, L.F.; LEAL, C.A.; DA SILVA, J.E.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1746, p.129-134, 2005.

LEON, C.; HECHLER, B.; VIAL, C.; LERAY, C.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, C. The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. **FEBS Letters**, v.403, p.26-30, 1997.

LIPSKI, P.E. Rheumatoid arthritis. In: Harrison's principles of internal Medicine. New York: McGraw Hill; 1998.

LORENZI. **Manual de Hematologia**. 2º ed., Editora MEDSI, Rio de Janeiro, 1999.

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

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

MARCUS, A.J.; SAFIER, L.B. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. **The FASEB Journal**, v.7, p.516-22, 1993.

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J. H.; ISLAM, N.; ALYONCHEVA, T.N.; SAFIER, L.B.; HAJJAR, K.A.; POSNETT, D.N.; SCHOENBORN, M.A.; SCHOOLET, K.A.; GAYLE, R.B.; MALISZEWSKI, C.R. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. **The Journal of Clinical Investigation**, v.99, p.1351-60, 1997.

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

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.; ISLAM, N.; PINSKY, D.J.; SESTI, C.; LEVI, R. Metabolic control excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto nucleotidase-1: implications for ischemic vascular disease. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.305, p. 9-16, 2003.

MASSBERG, S.; BRAND, K.; GRUNER, S.; PAGE, S.; MULLER, E.; MULLER, I. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. **The Journal of Experimental Medicine**, v.196, p.887-1182, 2002.

MCINNES, I.B. Rheumatoid arthritis: from bench to bedside. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v.27, p.373-387, 2001.

MIKKELSEN, W.M.; WILLIEM, M.; DODGE; HORACE, J.; DUFF; IVAN, F.; KATO; HIROO. Estimates of the prevalence of rheumatic disease in the population of Tecumseh, Michigan, 1959-1960. **Journal of Chronic Diseases**, v.20, p. 351-369, 1967.

MIOSSEC, P. Na update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v.16, p.218-22, 2004.

NAKAMACHI, Y.; KOSHIBA, M.; NAKAZAWA, T.; HATACHI, S.; SAURA, R.; KUROSAKA, M.; KUSAKA, H.; KUMAGAI, S. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis & Rheumatism**, v.48, p.668-674, 2003.

NEUTEUFL, T.; KATZENSCHLAGER, R.; HASSAN, A.; KLAAR, A.; SCHWARZACHER, S.; GLOGAR, D.; BAUER, P.; WEIDINGER, F. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.129, p.111-8, 1997.

O'BRIEN, W.M.; BENNETT, P.H.; BURCH, T.A.; BUNIM, J.J. A genetic study of rheumatoid arthritis and rheumatoid factor in blackfeet and pima Indians. **Arthritis and Rheumatism**, v.10, p.163-179, 1967.

PASCERI, V.; YEH, E.T.H. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. **Circulation**, v.100, p.2124-6, 1999.

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

PRIOR, P.; SYMMONS, D.P.; SCOTT, D.L.; BROWN, R.; HAWKINS, C.F. Cause of death in rheumatoid arthritis. **British Journal of Rheumatology**, v.23, p.92-9, 1984.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purine and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v.50, p.413-492, 1998.

RATECH, H.; THORBECKE, G.J.; MEREDITH, G.; HIRSCHHOM, R. Comparison and possible homology of isozyme of adenosine deaminase in aves and humans. **Enzyme**, v.26, p.74-84, 1981.

RATECH, H.; MARTINIUK, F.; BORER, W.Z.; RAPPAPORT, H. Differential expression of adenosine deaminase isozymes in acute leukemia. **Blood**, v.72, p.1627-32, 1988.

REDLICH, K.; HAYER, S.; RICCI, R.; DAVID, J.P.; TOHIDAST-AKRAD, M.; KOLLIAS, G.; STEINER, G.; SMOLEN, J.S.; WAGNER, E.F.; SCHETT, G. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. **The Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.1419-1427, 2002.

REMIJIN, J.A.; WU, Y.; JENINGA, E.H.; LJSSELDIJK, J.W.; WILLIGEN, G.; GROOT, P.; SIXMA, J.; NURDEN, A.; NURDEN, P. Role of ADP receptor P2y12 in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. Atherosclerosis. **Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p. 686-691, 2002.

RESTA, R.; YAMASHITA, Y.; THOMPSON, L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. **Immunological Reviews**, v.161, p.95-109, 1998.



RIISE, T.; JACOBSEN, B.K.; GRAN, J.T. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in the county of troms, northern Norway. **The Journal of Rheumatology**, v.27, p.1386-9, 2001.

ROBSON, S.C.; KACZMAREK, E.; SIEGEL, J.B.; CANDINAS, D.; KOZIAK, K.; MILLAN, M.; HANCOCK, W.W.; BACH, F.H. Loss ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v.185, p.153-63, 1997.

ROBSON, S.C. Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.21, p.1251-2, 2001.

ROBSON, S.C.; ENJYOJI, K.; GOEPFERT, C.; IMAI, M.; KACZMAREK, E.; LIN, Y.; SEVIGNY, J.; WARNY, M. Modulation of extracellular nucleotide-mediated signaling by CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1. **Drug Development Research**, v.53, p.193-207, 2001.

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

ROSS, R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v.340, p.115-26, 1999.

SAKURA, H.; NAGASHIMA, S.; NAGASHIMA, A.; MAEDA, M. Characterization of fetalserum 5'-nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a aggregation inhibitor in fetal circulation. **Thrombosis Research**, v.91, p. 83-89, 1998.

SALLES, I.I.; FEVS, H.B.; ISERBYT, B.F.; DE METER, S.F.; VANHOORELBEKE, K.; DECKMYN, H. Inherited traits affecting platelet function. **Blood Review**, v.22, p.155-172, 2008.

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

SATTAR, N.; MCCAREY, D.W.; CAPELL, H.; MCINNES, I.B. Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. **Circulation**, v.108, p. 2957-63, 2003.

SCHWIEBERT, E.M.; ZSEMBERY, A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1615, p.7-32, 2003.

SEVGNY, J.; LEVESQUE, F.P.; GRONDIN, G.; BEAUDOIN, A.R. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localization by immunological techniques. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1334, p.73-88, 1997.

SEYE, C.I.; YU, N.; JAIN, R.; KONG, Q.; MINOR, T.; NEWTON, J.; ERB, L.; GONZÁLEZ, A.; WEISMAN, G.A. The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.24960-24965, 2003.

SHARON, J. **Imunologia Básica**. 1<sup>o</sup> edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

SILVA, R.G.; VANNUCCI, A.B.; LATORRE, L.C.; ZERBINI, C.A.F. Artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Medicina**, v.60, p.554-577, 2003.

SOLOMON, D.H.; KARLSON, E.W.; RIMM, E.B.; CANNUSCIO, C.C.; MANDL, L.A.; MANSON, J.E.; STAMPFER, M.J.; CURHAN, G.C. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. **Circulation**, v.107, p.1303-7, 2003.

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

SPRAGUE, R.S.; STEPHENSON, A.H.; ELLSWORTH, M.L. Red not dead : signaling in and from erythrocytes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, p.350-355, 2007.

SPYCHALA, J.; MITCHEL, B.S.; BARANKIEWICZ. Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase and 5'-nucleotidase. **Journal of Immunology**, v.158, p.158:4947-4952, 1997.

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

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

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

STOLK, J.N.; BOERBOOMS, A.M.T.; ABREU, R.A.; KERSTENS, P.J.S.M.; KONING, D.G.M.; GRAAF, R.; MULDER, J.; PUTTE, L.B.A. Purine enzyme activities in recent onset rheumatoid arthritis: are there differences between patients and healthy controls? **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.55, p.733-738, 1996.

UNEGERER, J.P.; OOSTHUIZEN, H.M.; BISSBORT, S.H.; VERMAAK, W.J. Serum adenosine deaminase : isoenzymes and diagnostic application. **Clinical Chemistry**, v.38, p.1322-1326,1992.

VAN DER WEYDEN, M.B.; KELLEY, W.N. Human adenosine deaminase: distribution and properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v.251, p.5448-56, 1976.

VITTA, J.A.; KEANEYJR, J.F. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? **Circulation**, v.106, p.640-2, 2002.

VOLLMAYER, P.; CLAIR, T.; GODING, J.W.; SANO, K.; SERVOS, J.; ZIMMERMANN, H. Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. **European Journal of Biochemistry**, v.270, p.2971-2978, 2003.

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

WOLFE, A.M.; KELLGREN, J.H.; MASI, A.T. The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. II Incidence and diagnostic criteria, Bull. **The Rheumatic Diseases**, v.19, p.524-529, 1968.

WOLFE, F.; MITCHELL, D.M.; SIBLEY, J.T.; FRIES, J.F.; BLOCH, D.A.; WILLIAMS, C.A.; SPITZ, P.W.; HAGA, M.; KLEINHEKSEL, S.M.; CATHEY, M.A. The mortality of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v.37, p.481-94, 1994.

WOLFE, F. Comparative usefulness of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v.24, p.1477-85, 1997.

WOOD, J.W.; KATO, H.; JOHNSON, K.G.; UDA, Y.; RUSSEL, W.J.; DUFF, I.F.. Rheumatoid arthritis in Hiroshima and Nagasaki, Japan. Prevalence, incidence, and clinical characteristics. **Arthritis and Rheumatism**, v.10, p. 21-31, 1967.

WORTHINGTON, J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v.25, p.16-20, 2005.

YAAR, R.; JONES, M.R.; CHEN, J.F.; RAVID, K. Animal models for the study of adenosine receptor function. **Journal of Cellular Physiology**, v.202, p.9-20, 2005.

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

YUKSEL, H; AKOGLU, T.F. Serum and synovial fluid adenosine deaminase activity in patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.47, p.492-495, 1988.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. 1<sup>o</sup> ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2004.

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

ZIMMERMANN H. Extracellular metabolismo f ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.362, p.299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H.; BEAUDOIN, A.R.; BOLLEN, M.; Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v.362, p.299-309, 2000.

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

ZIMMERMANN, H.; MISHRA, V.; SHUKLA, V.; LANGER, D.; GAMPE, K.; GRIMM, I.; DELIE, J.; BRAUN, N. Ecto-nucleotidase, molecular properties and functional impact, **Anales Real Academia Nacional Farmacia**, v.73, p.537-566, 2007.

ZUKKERMAN, S.H.; OLSON, J.M.; DOUGLAS, S.D. Adenosine deaminase activity during in vitro culture of human peripheral blood monocytes and pulmonary alveolar macrophage. **Experimental Cell Research**, v.129, p.281-7, 1980.

## 7 ANEXOS

### 7.1 Anexo A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo o projeto de pesquisa “**Estudo do perfil oxidativo e avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com Artrite Reumatóide**” através da Mestranda Lara Vargas Becker, orientada pela professora Daniela Bitencourt Rosa Leal. Este projeto tem como objetivo avaliar a atividade de componentes sangüíneos em pacientes com Artrite Reumatóide (AR) e em indivíduos controles, livres de qualquer patologia, com a finalidade de colaborar para um melhor entendimento desta doença, além de proporcionar mais informações aos pacientes, já que estes terão acesso aos resultados da pesquisa.

Será realizada uma coleta de sangue (punção venosa) para obtenção do soro e plasma. O desconforto se resume à picada da agulha, sendo que após a coleta o local poderá ficar dolorido ou arroxeadado, mas não requer nenhum cuidado especial voltando ao normal em poucos dias. Todo o material utilizado para a coleta será descartável e /ou desinfectado. Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação aos pacientes. As amostras serão tratadas de acordo com os protocolos experimentais estabelecidos.

Será mantido sigilo sobre todas as informações obtidas junto aos prontuários. A divulgação dos dados obtidos preservará a identidade dos pacientes sujeitos a pesquisa.

A sua participação neste estudo é livre é voluntária, sendo que não haverá nenhuma forma de compensação financeira ou custos para o participante. A recusa na participação não leva nenhum prejuízo ou comprometimento dos seus cuidados médicos.

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 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 desta pesquisa, assinando este consentimento.

Santa Maria, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2009

Nome do paciente \_\_\_\_\_

Identidade \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

**Em casos de dúvidas entrar em contato com:**



Daniela Bitencourt Rosa Leal (Orientadora): (55) 9946-7672

Lara Vargas Becker (pesquisadora): (55) 9156-6249

Comitê de ética em pesquisa da UFSM: Avenida Roraima 1000, Prédio Reitoria 7<sup>o</sup> andar, sala 702, Cidade Universitária – Bairro Camobi, CEP: 97105-900, Santa Maria - RS. Fone (55) 32209362



## 7.2 Anexo C- 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:** Estudo do perfil oxidativo e avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com artrite reumatóide.

**Número do processo:** 23081.018984/2008-93

**CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética):** 0264.0.243.000-08

**Pesquisador Responsável:** Daniela Bitencourt Rosa Leal

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:

#### março/2010- Relatório final

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

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:** 30/01/2009

Santa Maria, 30 de Janeiro de 2009.



Félix Alexandre Antunes Soares  
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM  
Registro CONEP N. 243.

### 7.3 Anexo C- Carta de Submissão

Gmail - Clinical Biochemistry Submission - Manuscript Number Assigned

Página 1 de 1



Daniela Bitencourt Rosa Leal <[dbitencourtrosaleal@gmail.com](mailto:dbitencourtrosaleal@gmail.com)>

## Clinical Biochemistry Submission - Manuscript Number Assigned

CLB (ELS) <[cibi@elsevier.com](mailto:cibi@elsevier.com)>

18 de fevereiro de 2010 13:43

Para: [danibr1@smail.ufsm.br](mailto:danibr1@smail.ufsm.br)

Ms. No.: CLB-D-10-00080

Title: ACTIVITIES OF ENZYMES THAT HYDROLYZE ADENINE NUCLEOTIDES IN PLATELETS FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Corresponding Author: Dr. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Authors: Lara V Becker; Cintia S Rosa; Viviane G Souza; Margarete D Bagatini; Ana Paula S Lima; Claudio Leal; João Carlos N da Silva; Maria Beatriz Moretto, Ph.D.; Francielle V Pinheiro; Vera Maria Morsch, Ph.D.; Maria Rosa C Schetinger, Ph.D.; Daniela Bitencourt Rosa Leal, Ph.D.

Dear Dr. Leal,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: CLB-D-10-00080

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/cibi/>

Your username is: danibr1

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/\[](http://ees.elsevier.com/[EESACRONYM]/automail_query.asp)

[EESACRONYM\]/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/[EESACRONYM]/automail_query.asp).

Thank you for submitting your work to Clinical Biochemistry.

Kind regards,

Jon Stein  
Journal Manager  
Clinical Biochemistry

Phone: (619) 699-6218  
E-mail: [cibi@elsevier.com](mailto:cibi@elsevier.com)

\*\*\*\*\*  
For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.