



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

**PERFIL DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES E
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CÍNTIA SAYDELLES DA ROSA

Santa Maria, RS, Brasil
2010

**PERFIL DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES E AGREGAÇÃO
PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

por

Cíntia Saydelles da Rosa

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

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

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2010

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

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

**PERFIL DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES E AGREGAÇÃO
PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSOS
SISTÊMICO**

Elaborada por
Cíntia Saydelles da Rosa

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

Comissão examinadora:

Prof. Dra. Vera Maria Morsch
(Presidente/Orientador)

Prof. Dra. Cíntia Melazzo Mazzanti

Prof. Dra. Roselei Fachinetto

Santa Maria, 28 de maio de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais, José Cirne e Maria Madalena, meus incentivadores desde os primeiros passos até hoje, pelo carinho, amor e confiança que sempre depositaram em mim e pelo exemplo de dedicação.

As minhas irmãs e melhores amigas, Simone e Andreza, pelo companheirismo, cumplicidade e ensinamentos.

Ao meu namorado, João Carlos, por iluminar a minha vida com sua alegria e amor.

Obrigada por tudo! Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por guiar meus passos e pelo dom da vida.

A toda minha família, especialmente minha avó Tereza, pelo amor, apoio, carinho e pelos valores transmitidos a mim.

À professora Vera, minha orientadora desde a iniciação científica, pelos ensinamentos e atenção, servindo de exemplo de profissionalismo, dedicação e sinceridade.

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

À Lara, minha eterna colega e grande amiga, pela ajuda na realização dos experimentos, pelos conselhos e principalmente, pela amizade. Juntas nesta “caminhada científica” nos ajudamos e aprendemos muito.

As colegas Paula, Maísa, Margarete e Rosélia pela amizade e pelos ensinamentos, que muito contribuíram para o meu amadurecimento profissional.

Aos farmacêuticos Cláudio, Margarete e Viviane pela disponibilidade para a realização das coletas

Aos colegas do laboratório 2208 pelos momentos compartilhados, pela amizade, pelas horas de descontração e por todo o carinho e ajuda.

Aos pacientes que aceitaram participar deste projeto de pesquisa, sem eles seria impossível a realização do mesmo.

Ao Dr. João Carlos Nunes da Silva pela colaboração.

Aos professores e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que de alguma maneira contribuíram para a minha formação científica.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela oportunidade de realização deste curso.

A CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, minha profunda gratidão.

"Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver."

Amyr Klink, em *Mar sem Fim*

RESUMO

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

PERFIL DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUETAS E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSOS SISTÊMICO

Autora: CÍNTIA SAYDELLES DA ROSA
Orientadora: VERA MARIA MORSCH
Co-Orientadora: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER
Data e local de Defesa: Santa Maria, 28 de maio de 2010.

O lúpus Eritematoso Sistêmico é uma doença crônica, inflamatória e sistêmica, que afeta principalmente mulheres em idade reprodutiva e desencadeia danos permanentes na maioria dos casos. O desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente aterosclerose, é a principal causa de morte em pacientes lúpicos. Entretanto sua etiologia e relação com o desenvolvimento de aterosclerose permanecem desconhecidos. Vários estudos demonstraram que as plaquetas apresentam propriedades relevantes na trombogênese, como a liberação de ADP, uma molécula capaz de induzir a agregação plaquetária. A adenosina, proveniente da hidrólise do ATP e ADP, por sua vez apresenta propriedades antiagregantes. O controle dos níveis extracelulares destas moléculas e a consequente sinalização purinérgica por elas induzidas é realizado pelas enzimas NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade destas ectonucleotidases em plaquetas bem como o perfil da agregação plaquetária em pacientes lúpicos. Um aumento na atividade das enzimas NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA foi observado em plaquetas de pacientes com LES, quando comparado com sujeitos controles. Nenhuma diferença no perfil de agregação plaquetária de pacientes lúpicos foi observada, quando comparado ao controle. O aumento na atividade da NTPDase, da E-NPP e da 5'-nucleotidase parece ser uma resposta compensatória orgânica frente ao estado patológico para gerar maior concentração de adenosina. Porém a atividade da ADA também encontra-se aumentada em plaquetas de pacientes com diagnóstico de LES, podendo diminuir a concentração de adenosina, o que favorece estágios pró-trombóticos. Desse modo, os resultados encontrados sugerem que as ectoenzimas podem estar envolvidas na modulação dos processos ateroscleróticos que ocorrem no LES.

Palavras chave: LES, Aterosclerose, Plaquetas, NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase, ADA, agregação plaquetária

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Biological Sciences – Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

PROFÍL DE ATIVIDADE DA ECTONUCLEOTIDASE E AGREGAÇÃO DE PLÁQUETAS EM PACIENTES COM LUPUS ERYTEMATOSO SISTÊMICO

Author: CÍNTIA SAYDELLES DA ROSA
Adviser: VERA MARIA MORSCH
Co-adviser: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER
Date and place of the defense: Santa Maria, May 30nd, 2010.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disease that affects mostly women in reproductive age and sometimes cause permanent damage. The development of cardiovascular disease, especially atherosclerosis, is the leading cause of death in SLE. However, its etiology and relationship with the development of atherosclerosis remain unknown. Several studies have shown that platelets have relevant properties to thrombogenesis, such as the release of ADP, a molecule capable of inducing platelet aggregation. Adenosine, derived from the hydrolysis of ATP and ADP, in turn has antiagreggant properties. The control of extracellular levels of these molecules and subsequent purinergic signaling induced by them is carried out by enzymes NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase and ADA. Therefore, the objective of this study was to evaluate the activity of these ectonucleotidases in platelets and platelet aggregation profile in patients with LES. An increase in the activity of the enzymes NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase and ADA was observed in platelets of patients with lupus compared with control subjects. No difference on platelet aggregation of patients with lupus was observed when compared to control. The increase in activity of E-NTPDase, E-NPP and 5'-nucleotidase seems to be a compensatory organic response against the pathological condition, to generate higher concentration of adenosine. But the ADA activity also is increased in platelets of patients with SLE and may decrease the concentration of adenosine, which favors prothrombotics process. Thus, the results suggest that the ectoenzymes may be involved in the modulation of atherosclerotic processes that occur in SLE.

Key words: Systemic Lupus Erythematosus, atherosclerosis, platelets, NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase, ADA, platelets aggregation

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 01 – Representação de uma célula plaquetária.....	24
FIGURA 02 – Componentes da função plaquetária.....	24
FIGURA 03 – Tipo de receptores para nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	27
FIGURA 04 - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	28
FIGURA 05 – Membros da família das NTPDases.....	29
FIGURA 06 – Estrutura das NTPDases.....	29
FIGURA 07 – Estrutura da 5-nucleotidase.....	30
FIGURA 08 – Estrutura das E-NPPs.....	31

MANUSCRITO

FIGURE 01 – NTPDase (ATP and ADP) and 5'-nucleotidase (AMP) activities in platelets of SLE patients.	52
FIGURE 02 – E-NPP activity in platelets of SLE patients.....	53
FIGURE 03 – ADA activity in platelets of SLE patients.....	54
FIGURE 04 – Platelets aggregation profile in SLE and healthy subjects (control)..	55

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 01- Principais manifestações clínicas do LES.....	19
TABELA 02- Critérios para classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico do Colégio Americano de Reumatologia.....	21

MANUSCRITO

TABLE 01 - In vitro effect of methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone on NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities in platelets of healthy subjects.....	56
--	----

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADA - adenosina deaminase
ADP- adenosina difosfato
AMP- adenosina monofosfato
ATP- adenosina trifosfato
E-NPP – ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases
NTPDases – nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
FAN- fator anti-nuclear
GPI - glicosilfosfatidilinositol
GP IIb/IIIa – glicoproteína IIb/IIIa
IFN- γ – interferon gama
IL-1 – interleucina 1
LES- lúpus eritematoso sistêmico
SNC- sistema nervoso central
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.1.1 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Lúpus Eritematoso sistêmico	17
3.1.1 Conceito e etiologia.....	17
3.1.2 Epidemiologia.....	18
3.1.3 Sintomatologia.....	18
3.1.4 Fisiopatologia.....	20
3.1.5 Diagnóstico.....	20
3.1.6 Tratamento medicamentoso.....	22
3.2 Lúpus Eritematoso Sistêmico e aterosclerose	22
3.3 Plaquetas	23
3.3.1 Estrutura.....	23
3.3.2 Hemostasia.....	24
3.4 Sistema Purinérgico	25
3.4.1 Nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	25
3.4.2 Receptores Purinérgicos.....	26
3.4.3 Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina.....	27
3.4.3.1 E-NPDases.....	28
3.4.3.2 5'-Nucleotidase.....	30
3.4.3.3 E-NPP.....	31
3.4.3.4 ADA.....	32
4. MANUSCRITO	33
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8. ANEXOS	72
8.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	72
8.2 Anexo B – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética.....	73

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão escritos sob a forma de manuscrito, os quais se encontram no item manuscrito. As seções Pacientes e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final da dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

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

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica ao qual foi submetido: Clinical Biochemistry

1. INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pela produção de auto-anticorpos direcionados contra uma grande variedade de antígenos. Esta patologia acarreta diversos quadros clínicos, que variam de intensidade conforme a combinação de fatores imunes, genéticos, hormonais e ambientais (D'CRUZ et al., 2007).

O LES possui maior prevalência entre mulheres jovens, na faixa de 15-40 anos. Africanos e asiáticos parecem ser mais afetados pelo LES do que outros grupos étnicos e a prevalência do LES varia conforme a região de estudo (PETRI, 2002). Sua etiologia permanece desconhecida e precisa ser elucidada (D'CRUZ et al., 2007).

Alguns sintomas, como fadiga crônica e fibromialgia, reduzem a qualidade de vida destes pacientes (GOLDENBERG et al., 2004). O Lúpus pode afetar diferentes órgãos e sistemas em combinações variáveis (MAGALHÃES et al., 2003). O desenvolvimento de aterosclerose em pacientes jovens tem sido reconhecido como a principal causa de morte no LES. Mulheres portadoras de Lúpus, em idade reprodutiva, apresentam risco 50% aumentado de sofrerem infarto agudo do miocárdio, em relação a mulheres saudáveis na mesma faixa etária (MANZI et al., 1997). Além disso, a vasculopatia aterosclerótica foi identificada como a segunda principal causa de internação hospitalar, após períodos de exacerbação da doença (PETRI & GENOVESE, 1992). Somente os fatores de risco tradicionais não explicam adequadamente o aumento de doenças vasculares em pacientes lúpicos, estudos controlando estes fatores demonstram ainda maior chance de desenvolvimento de doenças vasculares neste grupo (ESDAILE, 2001; McMAHON, 2007).

A aterosclerose, enfermidade crônica da parede vascular resultante da interação de fatores locais e sistêmicos, é a base etiológica da maior parte dos eventos cardiovasculares (BADIMÓN et al., 2009). Alguns componentes celulares, como as plaquetas, apresentam funções relevantes na patogênese aterosclerótica (BADIMÓN et al., 2009). Além disso, estas células desempenham importantes funções hemostáticas e trombóticas (VANNI et al., 2007).

As plaquetas regulam a formação do trombo por meio da liberação de substâncias ativas como adenosina difosfato (ADP) (ALTMAN, 1995). É bem conhecido que concentrações micromolares de ADP são suficientes para induzir a

agregação plaquetária, enquanto a adenosina (o produto final da hidrólise da adenosina trifosfato/ATP) pode inibir a agregação plaquetária (ZIMMERMANN, 1999). O ATP é considerado um inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP, embora evidências indiquem a existência de mecanismos não competitivos e demonstrem que o ATP em altas ou baixas concentrações modula diferentemente a agregação plaquetária (LÉON et al., 1997).

As concentrações de ATP, ADP e adenosina no compartimento extracelular são controladas por enzimas que catalisam a sua conversão (ZIMMERMANN, 2000). Estas enzimas, também conhecidas como ectonucleotidases, localizam-se ancoradas na membrana ou solúveis no meio intersticial e agem sequencialmente formando uma cadeia enzimática. Dentre elas pode-se destacar as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase), a família das E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/ Fosfodiesterase), 5'-nucleotidase e a adenosina deaminase (ADA) (YEGUTKIN, 2008).

A NTPDase, a E-NPP e a 5'-nucleotidase são ecto-enzimas que desempenham um importante papel na hidrólise de nucleotídeos extracelulares trifosfatos, difosfatos e monofosfatos. Estas enzimas inibem a agregação plaquetária pela hidrólise do ATP, ADP e AMP com formação subsequente de adenosina, agindo assim como fatores trombaregulatórios podendo, desta forma, modular os efeitos destes nucleotídeos dentro dos vasos e nos sítios de inflamação (SÉVGNÝ et al., 2002; MARCUS et al., 2003; STEFAN et al., 2006).

A ADA é uma importante enzima da cadeia de inativação de purinas, que catalisa a conversão de adenosina em inosina. Desta forma, é também responsável por regular as concentrações extracelulares de adenosina (YEGUTKIN, 2008).

Pode-se prever a importância dessas enzimas na trombaregulação, já que os nucleotídeos ATP e ADP e o nucleosídeo adenosina são responsáveis pela regulação do tônus vascular e da função plaquetária (PILLA et al., 1996). Além disso, estudos realizados em nosso laboratório revelam o envolvimento das ectonucleotidases em algumas patologias, entre elas, diabetes e hipertensão (LUNKES et al., 2003), câncer (ARAÚJO et al., 2005; MALDONADO et al., 2006), insuficiência renal crônica (SILVA et al., 2005), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2007), infarto agudo do miocárdio (IAM) (BAGATINI et al., 2008), esclerose múltipla (SPANVELLO et al., 2010), entre outras.

Considerando o exposto acima e baseado na alta incidência de doenças cardiovasculares, especialmente desenvolvimento prematuro de aterosclerose, em pacientes lúpicos é de grande interesse clínico e científico a avaliação da atividade das ectonucleotidasas em pacientes com diagnósticos de LES.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade das ectonucleotidases e o perfil de agregação plaquetária em pacientes com LES.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA em plaquetas de pacientes lúpicos.
- Avaliar o perfil de agregação plaquetária, induzida por ADP, em pacientes com LES.
- Verificar *in vitro* a influência de drogas comumente usadas no tratamento do LES como metotrexato, leflumomida, hidroxiclороquina e prednisona, na atividade das enzimas acima citadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Lúpus Eritematosos Sistêmico

3.1.1 Conceito e etiologia

O LES é uma doença crônica inflamatória auto-imune com manifestações clínicas variadas, que acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva. Esta desordem crônica complexa afeta diferentes órgãos em combinações variáveis e em mais de 70 % dos casos pode desencadear danos permanentes (PETRI, 2007).

A doença é caracterizada por períodos de surto e de remissão e também pela produção de auto-anticorpos direcionados contra antígenos localizados intracelularmente ou na superfície celular (HAQ & ISENBERG, 2002). A qualidade de vida de pacientes lúpicos é significativamente reduzida quando comparada com a população em geral, esta redução deve-se principalmente a fadiga crônica e a fibromialgia (GOLDENBERG et al., 2004).

Os aspectos etiológicos do LES não estão completamente elucidados (D´CRUZ et al., 2007). Contudo, a base genética é claramente evidente na patogênese do LES, devido ao fato que a concordância estimada desta patologia em gêmeos monozigóticos, é de 50%, e a prevalência da doença é maior entre membros da família de pacientes lúpicos. (ARNETT et al., 1984; NATH & HARLEY, 2004). Além dos fatores genéticos, fatores hormonais e ambientais também parecem estar envolvidos na patogênese do LES (D´CRUZ et al., 2007).

Fatores ambientais tais como: luz solar, apoptose, alguns medicamentos e fatores virais, podem favorecer o começo da doença (D´CRUZ et al., 2007). A combinação da predisposição genética com os fatores ambientais de risco pode levar a perda da auto-tolerância imunológica. Neste cenário, parece ocorrer uma ativação na produção de interleucina I (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ). Estes mediadores têm ações pró-inflamatórias e são capazes de atrair e estimular neutrófilos, macrófagos e células T, os quais perpetuam os processos inflamatórios característicos desta patologia (DAS, 1991; KARIUKI & NIEWOLD, 2009).

3.1.2 Epidemiologia

O LES afeta principalmente mulheres em idade reprodutiva numa proporção de nove mulheres para cada homem afetado. A incidência da doença varia conforme a região de estudo, de aproximadamente 12-64 casos /100.000 habitantes por ano (HAQ & ISENBERG, 2002). A prevalência relatada na população norte-americana é de 40 a 50 casos por 100.000 habitantes por ano (HELMICK et al., 2007). No Reino Unido, nas Ilhas Caribenhas e nos Estados Unidos a doença é mais comum e mais severa em mulheres afro-descendentes do que em brancas caucasianas (PETRI, 2002).

No Brasil apenas um estudo foi realizado em região tropical, relatando a incidência de Lúpus na população. A taxa estimada de prevalência de LES encontrada foi de 8,7 casos/ 100.000 habitantes por ano (VILAR & SATO, 2002). Os estudos mais atuais de prevalência têm demonstrado uma aumentada incidência da doença, isso ocorre principalmente devido ao diagnóstico mais precoce do LES e o aumento da sobrevivência destes pacientes (PETRI, 2002).

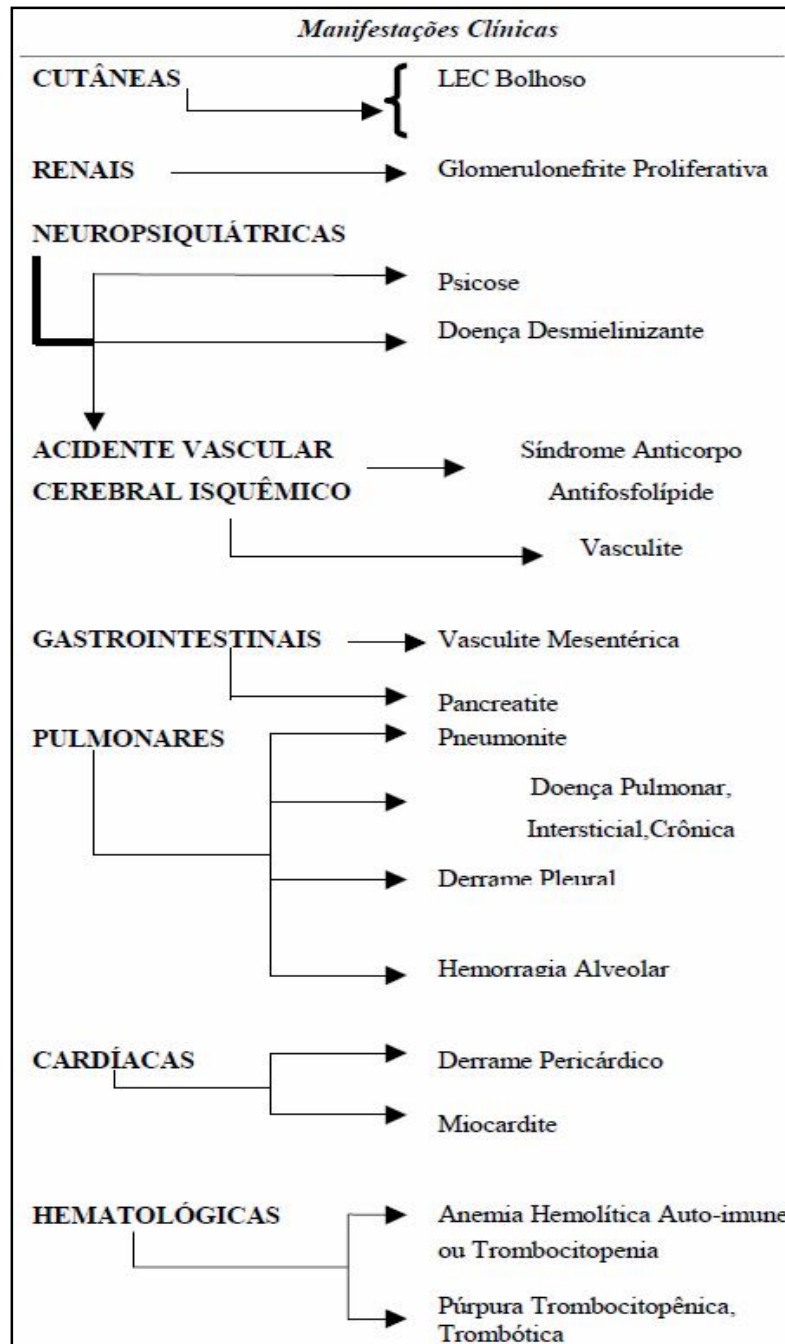
3.1.3 Sintomatologia

As manifestações clínicas no LES são muito variáveis, indo de casos leves onde os sintomas podem passar despercebidos, até casos graves e potencialmente letais, acarretando consequências sociais e perda na qualidade de vida dos pacientes (PETRI, 2007).

Os principais sintomas do LES são: eritema facial em forma de borboleta e artrite, mas a presença destes sintomas não é uniforme. Os primeiros sintomas apresentados por estes pacientes, geralmente pouco específicos, são fadiga, mal-estar, poliartralgia, fotossensibilidade, úlceras orais, cefaleias, fenômeno de Raynaud, perda de cabelo e olhos e boca seca (D'CRUZ et al, 2007).

O Lúpus pode afetar diferentes órgãos, causando manifestações cutâneas, renais, neuropsiquiátricas, vasculares, cardíacas e hematológicas (MAGALHÃES et al., 2003). As principais manifestações clínicas estão diagramatizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Principais manifestações clínicas do LES (Adaptada de Magalhães, 2003)



3.1.4 Fisiopatologia

Uma característica bem definida da doença é o desequilíbrio do sistema imunológico, caracterizado principalmente pelo desbalanço na produção de citocinas, hiperatividade das células B, células T e células apresentadoras de antígenos (KYTTARIS et al., 2005).

A fisiopatologia do LES caracteriza-se principalmente pela formação de imunocomplexos constituídos por auto-anticorpos e auto ou hetero-antígenos que se depositam na parede de vasos de pequeno e médio calibre, em território da microcirculação. Estes, após a ativação do sistema de complemento, ativam os mediadores da inflamação, produzindo ao final um processo de vasculite leucocitoclástica, com freqüente necrose da parede vascular e dos tecidos por ela nutridos, gerando alterações estruturais e funcionais em vários órgãos ou sistemas (HAHN, 1997).

3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico do LES baseia-se nos critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 1997 (Tabela 2). Para o diagnóstico de LES é necessária a presença de quatro ou mais dos 11 critérios.

Tabela 2 - Critérios para classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico do Colégio Americano de Reumatologia (HOCHBERG et al, 1997)

Critérios
1. Eritema malar
2. Eritema discóide
3. Fotossensibilidade
4. Úlcera de mucosa oral ou nasal
5. Artrite não erosiva
6. Serosites (pleurite e/ou pericardite)
7. Alterações renais (proteinúria superior a 500 mg/dia e/ou presença de cilindrúria)
8. Alterações neurológicas (convulsão e/ou psicose na ausência de distúrbios metabólicos, hipertensão arterial ou infecções)
9. Alterações hematológicas [anemia hemolítica com reticulocitose e/ou leucopenia (menos que 4.000/mm ³) e/ou linfopenia (menos que 1.500/mm ³) e/ou plaquetopenia (menos que 100.000/mm ³), em duas ou mais ocasiões]
10. Alterações imunológicas [presença de anticorpos anti-fosfolípidos (anti-cardiolipina IgM ou IgG e/ou anti-coagulante lúpico e/ou reações sorológicas falsamente positivas para sífilis) e/ou anticorpo anti-DNA e/ou anticorpo anti-Sm]
11. FAN positivo

A avaliação laboratorial reforça o diagnóstico quando se observar alterações tais como leucopenia, anemia, linfopenia, plaquetopenia e alterações do sedimento urinário. De particular importância para o diagnóstico é a pesquisa de anticorpos ou fatores antinucleares por imunofluorescência indireta, utilizando como substrato as células HEp-2, conforme proposta do I Consenso Brasileiro Sobre Laudos de FAN (Fator anti-nuclear). A positividade desse teste, embora não específico, serve como triagem devido a sua sensibilidade maior que 95%, sendo altamente improvável a presença da doença se o teste resultar negativo (DELLAVANCE et al., 2002).

3.1.6 Tratamento medicamentoso

O tratamento medicamentoso deve ser individualizado para cada paciente e dependerá dos órgãos ou sistemas acometidos e da gravidade destes acometimentos. Em pacientes com comprometimento de múltiplos sistemas, o tratamento deverá ser orientado para o mais grave. Quando houver manifestação que não responda a uma droga, pode ser necessário fazer uso concomitante de diversos medicamentos (SATO et al., 2002).

O uso contínuo de antimaláricos (difosfato de cloroquina ou sulfato de hidroxicloroquina) é indicado com a finalidade de reduzir a atividade da doença e o uso de corticóides por pacientes com LES (MEINÃO et al., 1996). Melhora do perfil lipídico e redução do risco de trombose são benefícios adicionais atribuídos ao uso de antimaláricos (WALLACE et al., 1993).

Além dos agentes antimaláricos os corticóides também são uma terapia padrão no LES e seus mecanismos de ação são diversos, podendo inibir a proliferação de células T e a produção de citocinas. A dose de glicocorticóides varia de acordo com a gravidade de cada caso e deve ser utilizada em dose efetiva para o controle da atividade da doença, e, assim que possível, fazer redução gradual da sua administração. (O'NEILLA et al., 2005).

Como mecanismos imunológicos estão centralmente envolvidos na patogênese do LES os imunossupressores passaram a oferecer uma alternativa de modificação do curso e da progressão da doença. Alguns dos medicamentos imunomoduladores mais utilizados são a leflunomida e o metotrexato (SOBSKY & WALLACE, 2002). A leflunomida é um inibidor da síntese de pirimidinas que afeta a proliferação das células T (REMER et al., 2001) enquanto o metotrexato, um folato antagonista, é administrado em casos de sinovites e doença leve (CARNEIRO & SATO, 1999).

Embora ainda distantes de uma abordagem curativa, os avanços recentes permitem oferecer tratamentos relativamente efetivos para os portadores de LES. Contudo, novos ensaios laboratoriais e análises experimentais contribuem para que medidas terapêuticas inovadoras possam ser tomadas buscando amenizar as consequências do LES.

3.2 Lúpus Eritematosos Sistêmico e aterosclerose

A aterosclerose é uma enfermidade crônica multifatorial, lenta e progressiva, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas (HACKAM & ANAND, 2003). Ocorre retenção de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos na parede das artérias os quais são responsáveis pela formação de placas ou estrias gordurosas, que geralmente ocasionam a obstrução das mesmas e, conseqüentemente, deterioração da função vascular (LIBBY, 2002).

O desenvolvimento precoce de aterosclerose em pacientes lúpicos tem sido reconhecido como principal condição de comorbidade no LES. Mulheres lúpicas na faixa etária entre 35-44 anos têm aproximadamente 50 % mais chance de sofrerem infarto agudo do miocárdio do que mulheres saudáveis (MANZI et al, 1997). Roman e colaboradores demonstraram incidência aumentada de aterosclerose subclínica em artérias de sujeitos lúpicos. Além disso, a vasculopatia aterosclerótica foi identificada como a segunda causa mais comum de internação hospitalar, após a exacerbação da doença (PETRI & GENOVESE, 1992).

Somente os fatores de risco tradicionais não explicam adequadamente o aumento de doenças vasculares em pacientes lúpicos, estudos controlando estes fatores demonstram ainda maior chance de desenvolvimento de doenças vasculares neste grupo (ESDAILE et al., 2001 e McMAHON & HAHN, 2007). Vários estudos têm sido feitos para relacionar o desenvolvimento de aterosclerose e o LES, contudo este mecanismo ainda não está completamente elucidado.

3.3 Plaquetas

3.3.1 Estrutura

As plaquetas são pequenos fragmentos subcelulares, anucleares que circulam numerosamente no sangue em formato discoide. As plaquetas circulantes são produzidas a partir dos megacariócitos na medula óssea. Apresentam-se heterogêneas sob aspectos morfológicos, como tamanho e densidade (AUSTIN, 2008).

Na estrutura das plaquetas (Figura 1) se distinguem três zonas: (1) zona externa ou periférica que condiciona a propriedade de adesão, onde encontram-se antígenos, glicoproteínas e vários tipos de enzimas. Mais internamente existe a

membrana plaquetária, onde estão localizadas glicoproteínas que são receptores específicos para determinados fatores de coagulação. (2) Uma zona citosol, portadora de microtúbulos e microfilamentos, responsável pelo esqueleto da plaqueta. (3) Uma zona de organelas contendo corpúsculos densos (Ca^{2+} , ADP, ATP, Serotonina, Pirofosfato), grânulos alfa (fatores de crescimento, fatores de coagulação e proteínas de adesão) e um sistema de membrana, local de síntese de prostaglandinas e tromboxano A2 (LORENZI et al., 2003).

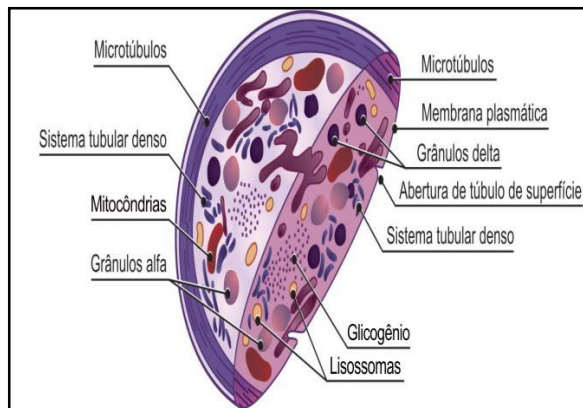


Figura1: Representação de uma célula plaquetária

3.3.2 Hemostasia

As plaquetas são responsáveis pela hemostasia primária, processo que pára o sangramento decorrente da injúria vascular através da formação de um tampão plaquetário. Os três componentes principais da função plaquetária são: adesão, ativação e agregação (Figura 2)(VANNI ,2007).

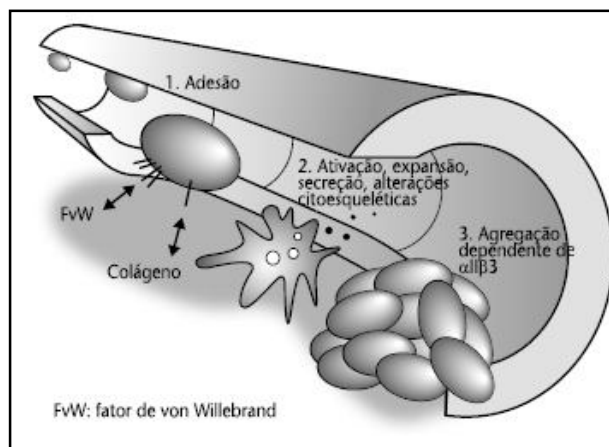


Figura 2: Componentes da função plaquetária

O início deste processo ocorre quando há injúria vascular, com consequente exposição do colágeno subendotelial às plaquetas circulantes. Inicia-se a fase de adesão mediada por receptores de adesão plaquetários, estes receptores ligam-se ao colágeno e ao fator de von Willebrand. Uma vez a plaqueta aderida, o primeiro sinal de ativação plaquetária é sentido na membrana externa, onde os fatores capazes de promover esta ativação como a trombina, a adrenalina e o colágeno se ligam aos seus receptores específicos. A ligação destes agonistas a receptores no citosol ativam cascatas bioquímicas, consequentemente a plaqueta modifica a sua forma que passa de discoide a irregular devido à emissão de pseudópodos a partir da membrana, libera os componentes dos grânulos celulares e promove a ativação do receptor de membrana glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa). (VANNI et al., 2007; LORENZI et al., 2003).

A ligação da adenosina difosfato (ADP) e dos outros agonistas a seus receptores induz o metabolismo do ácido araquidônico, sendo o mesmo liberado a partir da membrana fosfolipídica das plaquetas pela ativação da enzima fosfolipase A2. O ácido araquidônico quando metabolizado tem como um de seus produtos o tromboxano A2, um potente agonista plaquetário e vasoconstritor (VANNI et al., 2007).

Uma vez ativado o receptor GPIIb/IIIa, esse muda a sua conformação, passando a interagir com o fibrinogênio que se encontra solúvel no plasma, com o qual medeia o processo de agregação e, consequentemente, a formação do tampão plaquetário (AUSTIN, 2008; VANNI et al., 2007).

3.4 Sistema purinérgico

3.4.1 Nucleosídeos e nucleotídeos de adenina

Nucleotídeos e nucleosídeos são importantes moléculas sinalizadoras envolvidas em muitos processos biológicos. Os nucleosídeos são formados por uma pentose e uma base púrica ou pirimídica. A fosforilação destes nucleosídeos, por quinases específicas, formam os denominados nucleotídeos. Estas moléculas estão envolvidas na transmissão de informação genética, nos processos de transferência e armazenamento de energia e na sinalização celular (ATKINSON et al., 2006).

Os nucleotídeos de adenina ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina são consideradas importantes moléculas sinalizadoras em vários tecidos (YEGUTKIN, 2008). Entretanto encontram-se nos fluídos extracelulares em concentrações micromolares devido a vários mecanismos como: lise celular, permeabilidade seletiva da membrana plasmática e exocitose de vesículas secretoras como os corpos densos plaquetários (ENJYOJI et al., 1999)

Muitas funções biológicas do ATP têm sido descritas. O ATP presente no compartimento extracelular está envolvido na regulação de múltiplos processos como neurotransmissão, função cardíaca, metabolismo ósseo, metabolismo do glicogênio e inflamação (ATKINSON et al., 2006; BURNSTOCK, 2002).

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

Nucleotídeos extracelulares podem estar envolvidos em muitas patologias, incluindo desordens do sistema imune e degenerativas, além de doenças vasculares (SCHETINGER et al., 2008). Considerando estes dados, torna-se relevante o estudo da importância destes nucleotídeos no LES.

3.4.2 Receptores purinérgicos

Todas as funções dos nucleotídeos são mediadas via receptores purinérgicos. Baseado em estudos de farmacologia e análise de dados moleculares e funcionais, dois grupos de receptores foram descritos, os receptores P2X e P2Y. Os receptores P2X, que são específicos para o ATP, são caracterizados por serem acoplados a canais iônicos e apresentarem seus domínios carboxi e amino terminal voltados para o meio intracelular, já foram descritos sete subtipos deste receptor (P2X₁₋₇) (DI VIRGILIO, 2001). Os receptores P2Y são receptores acoplados a proteína G e 14

subtipos deste receptor foram identificados (P2Y₁₋₁₄). Os receptores P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ e P2Y₁₃ respondem principalmente aos nucleotídeos de adenina, ATP e ADP (YEGUTKIN, 2008).

A adenosina, por sua vez, medeia seus efeitos através de receptores de adenosina acoplados a proteína-G. Existem quatro tipos de receptores: A_{2A}, A_{2B}, A₁ e A₂, os quais são proteínas transmembrana acopladas a proteína G, os dois primeiros ativam a adenilato ciclase, enquanto os últimos a inibem (Figura 3).

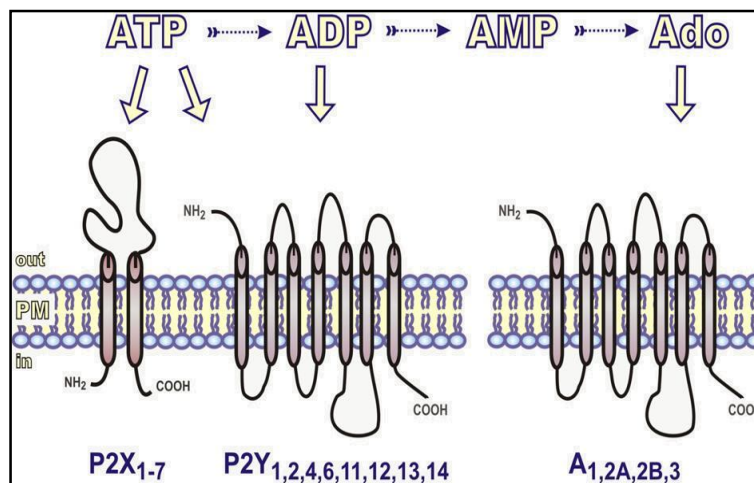


Figura 3: Tipos de receptores para nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (Yegutkin, 2008)

3.4.3 Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina

As concentrações de ATP, ADP e adenosina no compartimento extracelular são controladas por enzimas que catalisam a sua conversão (Zimmermann, 2000). Estas enzimas, denominadas ecto-enzimas, localizam-se ancoradas na membrana ou solúveis no meio intersticial e agem sequencialmente formando uma cadeia enzimática. Dentre elas pode-se destacar as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase), a família das E-NPPs (Ecto- Nucleotídeo Pirofosfatase/ Fosfodiesterase), 5'-nucleotidase e a adenosina deaminase (ADA) (ROBSON et al., 2006 e YEGUTKIN, 2008).

Conforme mostrado na Figura 4, a cadeia enzimática tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise de ATP e ADP formando AMP. A seguir a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula de AMP formando

adenosina, a a qual sofre a ação da ADA gerando inosina (ZIMMERMANN et al., 2007 e YEGUTKIN, 2008).

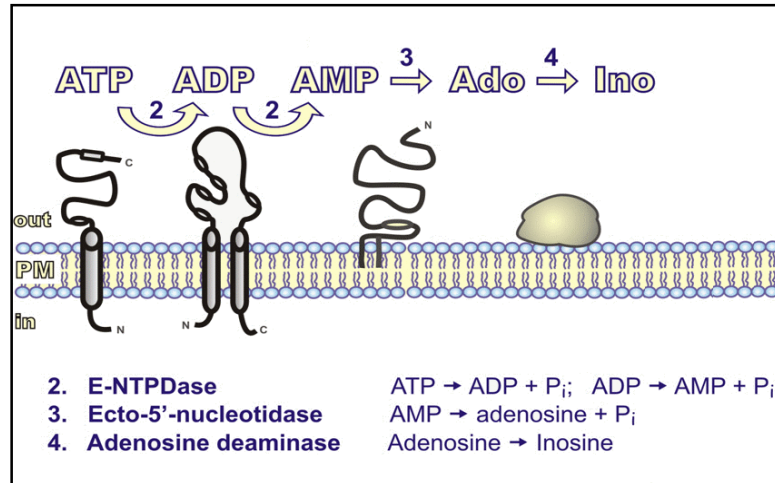


Figura 4: Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Adaptado de Yegutkin (2008)

3.4.3.1 E-NTPDase

As E-NTPDases são um grupo de enzimas extracelulares glicosiladas que hidrolisam ATP e ADP para AMP (ZIMMERMANN et al., 2007). Estas enzimas requerem concentrações milimolares de Ca²⁺ ou Mg²⁺ para exercerem atividade e têm sido bem caracterizadas no sistema nervoso central (SNC) e em outros tecidos, como em plaquetas e em linfócitos (PILLA et al., 1996; ZIMMERMANN, 2001; SCHETINGER et al., 2001; LUNKES et al., 2004; LEAL et al., 2005).

Até o momento, oito diferentes membros da família das E-NTPDases foram descritos, clonados e estudados (NTPDase 1-8). As NTPDases 1,2,3 e 8 são enzimas localizadas na superfície celular, com sítio catalítico localizado extracelularmente, enquanto nas NTPDases 4, 5, 6 e 7 este parece estar localizado intracelularmente (Figura 5) (ROBSON et al., 2006).

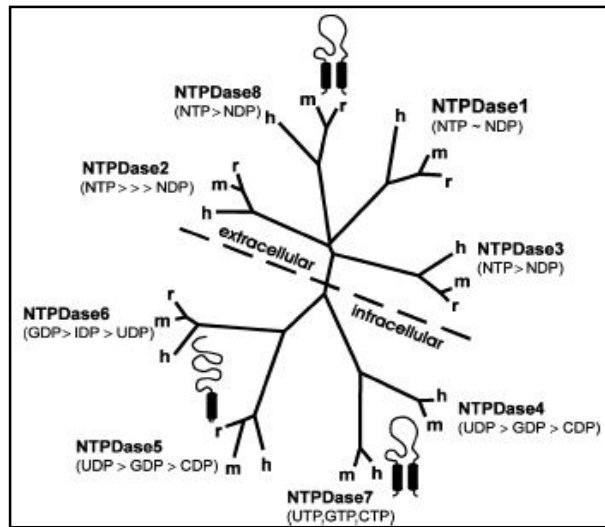


Figura 5: Membros da Família das E-NTPDases (Robson et al., 2006)

A NTPDase-1 (apirase, CD39), a qual hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , foi a primeira enzima da família das NTPDases a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 6) (ZIMMERMANN 2001).

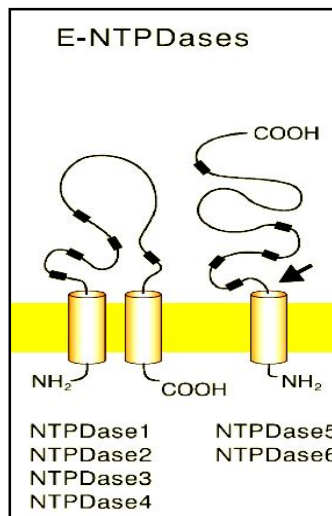


Figura 6: Estrutura das NTPDases. Adaptado de Zimmerman (2001)

A NTPDase-1 de plaquetas intactas de humanos pode estar envolvida na regulação da concentração dos nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular (Enyoji,1999). Estudos demonstraram que a NTPDase-1 inibe a agregação plaquetária por participar da cascata de degradação dos nucleotídeos ATP e ADP

e, juntamente, com a 5'-nucleotidase promover a formação de adenosina, um metabólito anti-agregante, além de inibir a glicoproteína GPIIb/IIIa (SCHETINGER et al., 2008).

Alguns estudos indicam que o uso de CD39 solúvel se constitui num potencial agente terapêutico para inibição de processos trombóticos mediados por plaquetas. A solução purificada de CD39 bloqueou in vitro a agregação plaquetária induzida por ADP e inibiu a reatividade plaquetária induzida pelo colágeno (GAYLE et al., 1998; ENJYOJI et al., 1999).

3.4.3.2 5'-Nucleotidase

A ecto-5'-nucleotidase é uma glicoproteína ligada a membrana via um glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular que catalisa a hidrólise éster fosfórica do 5'-ribonucleotídeo para o correspondente nucleosídeo e fosfato. Geralmente o nucleotídeo mais susceptível a hidrólise é o AMP, o qual formará a adenosina (ZIMMERMANN, 2001).

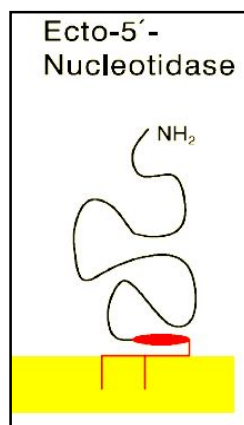


Figura 7: Estrutura da 5'-nucleotidase. Adaptado de Zimmerman (2001)

A ecto-5'-nucleotidase é amplamente distribuída em uma variedade de tecidos como rins, fígado, pulmão, endotélio vascular, plaquetas e células do sistema imune (COLGAN et al., 2006).

As funções da ecto-5'-nucleotidase correlacionam-se diretamente ao seu papel na produção de adenosina. Assim, de acordo com a sua localização tecidual, ela desempenha importantes funções como, por exemplo, no controle da agregação

plaquetária, na regulação do tônus vascular e também na neuromodulação e neuroproteção no sistema nervoso (ZIMMERMANN et al., 1998; KAWASHIMA et al., 2000; DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

3.4.3.3 E-NPP

O grupo das E-NPPs é constituído por sete enzimas estruturalmente relacionadas (NPP1-NPP7), as quais são numeradas conforme a ordem de caracterização. Os membros desta família multigênica possuem uma ampla especificidade de substratos e são capazes de hidrolisar ligações pirofosfato e fosfodiéster em nucleotídeos, ácidos nucleicos e nucleotídeos açúcares (YEGUTKIN, 2008).

Todos os membros da família das E-NPPs são ligados a membrana por um único domínio transmembrana, com exceção da NPP-2. As NPP 1 e NPP3 têm orientação transmembrana do tipo II, ou seja, sua porção aminoterminal está voltada para o meio intracelular, enquanto as NPPs 4-7 têm orientação do tipo I com a porção aminoterminal voltada para o meio extracelular (Figura 8). Entretanto, somente as NPPs 1-3 são capazes de hidrolisar nucleotídeos, sendo relevantes na regulação da cascata de sinalização purinérgica (STEFAN et al., 2006).

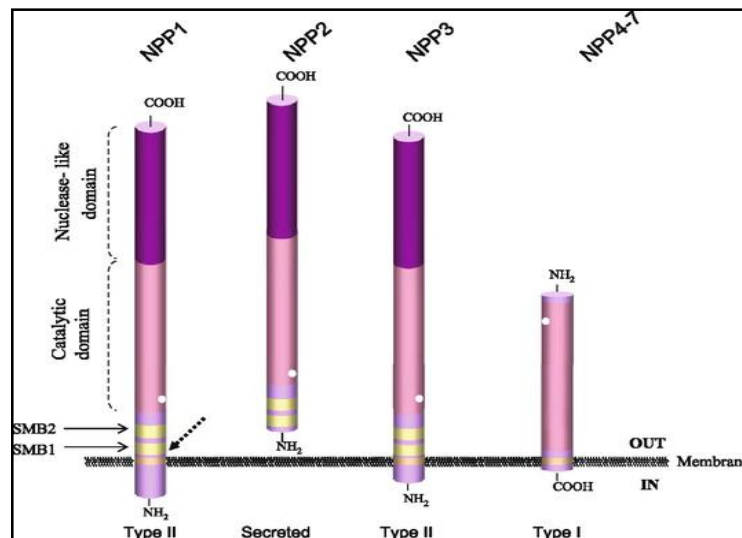


Figura 8: Estrutura das E-NPPs. (Stefan, 2006)

Evidências sugerem que as NPPs apresentam vastos papéis fisiológicos, incluindo reciclagem de nucleotídeos, modulação da sinalização purinérgica, regulação dos níveis de pirofosfato extracelular, proliferação e motilidade celular (STEFAN et al., 2006). As NPPs também têm sido implicadas em várias condições patológicas, incluindo desmineralização óssea, no câncer, no diabetes melitos e na esclerose múltipla (STEFAN et al., 2006; TERKELTAUB, 2006; MALDONADO et al., 2008; SPANEVELLO et al., 2010)

3.4.3.4 ADA

A ADA é uma importante enzima da cadeia de inativação de purinas, que catalisa a deaminação irreversível de adenosina e 2'-deoxiadenosina para inosina e 2'-deoxiinosina, respectivamente. Desta forma, é responsável por regular as concentrações extracelulares de adenosina (YEGUTKIN, 2008).

Estudos têm demonstrado que pelo menos duas proteínas são responsáveis pelo ancoramento da ecto-ADA na membrana celular. A primeira a ser identificada foi a CD26, uma proteína de membrana, e a segunda, o receptor de adenosina A1. Além da propriedade catalítica, esta enzima também apresenta propriedades estimulatórias e desempenha funções importantes no contato entre diferentes tipos de células, quando interage com as proteínas CD26 e A1 (FRANCO et al., 1997).

Em muitos sistemas vivos, a adenosina extracelular é um modulador que atua em diversos tipos celulares, através de receptores específicos. A formação de adenosina, pela enzima 5'-nucleotidase, e sua degradação, por ação da ADA regulam estreitamente a concentração deste metabólito.

4. MANUSCRITO

Type of paper: Clinical investigation, full paper

ACTIVITIES OF ENZYMES THAT HYDROLYZE ADENINE NUCLEOTIDES IN PLATELETS FROM PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Cíntia S. Rosa^b, Lara V. Becker^b, Margarete D. Bagatini^b, Viviane do Carmo G. Souza^d, Claudio Alberto M. Leal^b, João Carlos N. da Silva^c, Maria B. Moretto^a, Faída H Abdalla^a, Maria Rosa C. Schetinger^b, Vera Maria Morsch^{b,*}

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

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

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

* Corresponding author:

Dr^a. Vera Maria Morsch

Departamento de Química/Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, RS, Brasil- 97105-900

Fax: 0+5555 3220 8978 or e-mail: veramorsch@gmail.com

Abstract

Objectives: The aim of the present study was to evaluate the activities of NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate phosphohydrolase), E-NPP (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase), 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) in platelets of SLE patients, as well as to analyze platelet aggregation.

Patients and methods: Twenty patients, diagnosed with LES, through American College of Rheumatology criteria, as well as 20 healthy patients were selected. The NTPDase, 5'-Nucleotidase, E-NPP and ADA activities were verified in isolated platelets of these patients.

Results: The results show that NTPDase, 5' nucleotidase, E-NPP and ADA activities were increased in platelets of patients with SLE when compared with the control group ($p < 0.05$), however no differences were observed in platelet aggregation between groups.

Conclusions: Our results suggest that nucleotide hydrolysis is altered in platelets from LES patients. Possibly, this increase in nucleotide hydrolysis could be related to a compensatory organic response to thrombotic events that occur in LES.

Key words: systemic lupus erythematosus, platelets, adenine nucleotides, adenosine, atherosclerosis

Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disease of unknown etiology which is common in women. Lupus is the leading cause of death among young women with autoimmune diseases. Environmental, genetic and hormonal factors have been associated with the pathogenesis of SLE [1,2].

Vascular complications have been recognized as a major co morbid condition in SLE patients. Women in childbearing age have an estimated 50-fold increased risk of myocardial infarction compared to age and sex-matched controls [3]. The development of accelerated atherosclerosis in SLE remains unclear. The presence of early atherosclerosis in SLE patients cannot be explained only by traditional risk factors, but also by non-traditional factors such immunomediated processes of the disease or its treatment [4].

Haemostasis is a normal physiological response to vascular injuries, and platelets are intimately related and participate in this process. Platelets have been recognized as key pathological components of the processes associated with vascular inflammation and thrombosis via adhesion, aggregation and subsequent thrombus formation at the site of vascular damage [5,6]. In addition, platelets are a potent source of growth factors that can contribute to smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic plaques [7].

When platelets are activated, active substances such as ADP, Ca^{2+} thromboxane A_2 and other active substances are released. It is well known that micromolar concentrations of ADP are sufficient to induce platelet aggregation, while adenosine can inhibit platelet aggregation [8,9]. Moreover, studies have suggested that ATP has a complex role in regulating platelet aggregation [10,11].

Therefore, extracellular concentrations of ATP, ADP and adenosine can rise

under several conditions such as inflammation, hypoxia and ischemia [12]. Extracellular concentrations of these nucleotides are controlled by enzymes that catalyze their conversion [13]. Among the enzymes involved in nucleotide metabolism are NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate phosphohydrolase), E-NPP (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase), ecto-5'-nucleotidase and ecto-adenosine deaminase (ADA) [14]. NTPDases hydrolyze ATP and ADP to AMP [15] while E-NPPs are responsible for hydrolyzing 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives resulting in nucleotide monophosphate [16]. AMP generated from the action of NTPDase and E-NPP is subsequently hydrolyzed to adenosine by ecto-5'-nucleotidase [17]. Alternatively, adenosine can be directly inactivated through sequential action of ADA which catalyses the irreversible deamination of adenosine [18]. Together, these enzymes constitute an organized enzymatic cascade that controls the rate of formation and degradation of these nucleotides [19].

Because of the greater occurrence of cardiovascular diseases in SLE and the importance of adenine nucleotides in the mechanism of thromboregulation, the aim of our study was to evaluate the activity of NTPDase, E-NPP, ecto-5'-nucleotidase and ADA in platelets from patients with SLE.

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

The experimental group consisted of 20 patients with SLE (20 female, aged 29-61 years, mean 40, 60 ± 12, 36) and control group consisted of 20 healthy subjects (20 female, aged 30-61 years, mean 40, 40 ± 8, 70). The diagnostic of SLE was based in the criteria of American College of Rheumatology [20]. Subjects with hypertension were excluded from the study. All patients received current immunosuppressive therapy. Ten milliliters of blood was obtained from each patient and used for platelets rich plasma preparation and other biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group. The study was approved by the Human Ethical Committee of Federal University of Santa Maria, protocol number 23081.019638/2008-22, Brazil. All the participants signed the free consent before the blood was collected.

Platelet preparation

Platelet-Rich Plasma (PRP) was prepared by the method of Pilla et al. [21] modified by Lunkes et.al. [22]. Total blood was collected by cardiac puncture with 0.120 M sodium citrate as anticoagulant. The total blood–citrate system was centrifuged at 160 xg during 15 min. After this, the PRP was centrifuged at 1400 xg for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142mM NaCl, 2.5mM KCl and 5.5mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activities.

NTPDase and 5'-nucleotidase activity determination

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium

containing 5 mM CaCl₂, 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 described by Lunkes et al. [22]. For AMP hydrolysis, the medium reaction was used as previously described except that the 5 mM CaCl₂ was replaced by 10mMMgCl₂. Twenty microliters of the enzyme preparation (8–12 µg of protein) was added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0mM, and AMP at a concentration final of 2 mM. The time of incubation was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [23] using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ 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.

Ecto-NPP activity determination

Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (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. [14]. The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, and 5.0 mM CaCl₂, pH 8.9, was preincubated with approximately 20 mg per tube of platelet protein for 10 min at 37 °C in a final volume of 200 µL. The enzyme reaction was started by the addition of p-Nph- 5'-TMP at a final concentration of 0.5mM. After 80min of incubation, 200 µL NaOH 0.2 N 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 $18.8 \times 10^{-3} \text{ M/cm}$. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were expressed as nmol of p-nitrophenol released per minute per milligram of protein (nmol p-nitrophenol released/min/mg protein).

Adenosine deaminase determination

ADA from platelets was determined according to Guisti and Galanti [24] based on the Bertholet reaction, that is, the formation of colored indophenol complex from ammonia liberated from adenosine and quantified spectrophotometrically. Briefly, 50 μL of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine pH 6.5 and was incubated at 37 °C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. The protein content used for the platelet experiment was adjusted 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.

Protein determination

Protein content was determined according to Bradford [25], using bovine serum albumin as standard.

Platelet aggregation

Platelet aggregation was measured by the method of Born and Cross [26] by turbidimetric measurement with a Chrono-log optical aggregometer, with AGGRO/LINK[®] 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°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 µM, 5 µM and 10 µM, 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 SLE on activity of enzymes that degraded adenine nucleotides and nucleosides

The in vitro effects of methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone on NTPDase, ecto 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 methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone used in vitro represent approximately the mean plasma mean values of the medications [27, 28, 29, 30].

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 oneway 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

ATP, ADP and AMP hydrolysis

The results obtained for ATP, ADP and AMP hydrolysis are shown in Figure 1. As can be observed, ATP, ADP and AMP hydrolysis were significantly enhanced in SLE patients when compared with the control group, $p < 0.05$. ATP hydrolysis was increased in the LES patients group (24.57 ± 0.52 nmol Pi released/min/mg of protein) when compared with the control group (11.43 ± 1.27 nmol Pi released/min/mg of protein) ($p < 0.05$).

The results showed enhanced ADP hydrolysis in patients with LES (15.37 ± 0.85 nmol Pi released/min/mg of protein) in relation to the control group (7.80 ± 0.34 nmol Pi released/min/mg of protein) ($p < 0.05$), and AMP hydrolysis showed a similar behavior (7.51 ± 0.35 nmol Pi released/min/mg of protein for patients and 3.18 ± 0.25 nmol Pi released/min/mg of protein for controls) ($p < 0.05$).

E-NPP activity

The results obtained for E-NPP activity are shown in Figure 2. E-NPP activity also increased in SLE patients (7.88 ± 0.55 nmol p-nitrophenol released/min/mg protein) when compared with the control group (4.23 ± 0.26 nmol p-nitrophenol released/min/mg protein) ($p < 0.05$).

ADA activity

Platelet ADA activity, shown in Figure 3, was significantly increased in the LES group (5.65 ± 0.48 U/L) in relation to the control group (3.95 ± 0.25 U/L) ($p < 0.05$).

Platelet aggregation

Fig. 4 presents the results obtained for platelet aggregation. As can be observed, no differences were found in platelet aggregation between SLE patients and the control group at different concentrations of ADP as agonist.

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

The effect of the drugs used in SLE treatment on nucleotide hydrolysis was tested. The in vitro concentration ranged from zero to 5 μ M for methotrexate, from zero to 45 μ g/ml for leflunomide, from zero to 1618 ng/ml for hydroxychloroquine and from 0 to 35 μ g/ml for prednisone. The results demonstrate that none of the drugs were capable of altering NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities at any concentration tested (Table 1).

Discussion

Extracellular adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their derivate nucleoside adenosine are important signaling molecules in several physiological and pathological processes [31]. Several studies from our laboratory have demonstrated that ectoenzymes play an important role in the thromboregulation mechanism and alterations in their activities have been observed in diabetics, hypertensive patients, diabetic/hypertensive patients [22], patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes [32] and in patients with acute myocardial infarction. [33]. In this context, we evaluated the hydrolysis of adenine nucleotides, which are important molecules in the process of homeostasis and thrombus formation, in platelets from SLE patients.

Previous studies have demonstrated the development of premature atherosclerosis in SLE [34]. Women with SLE also have an increased incidence of

subclinical atherosclerosis [35] and these women have a higher chance of suffering acute myocardial infarction [3]. The cause of accelerated atherosclerosis in SLE patients remains unclear.

It has been established that extracellular adenosine nucleotides and adenosine are versatile signaling molecules known to participate in an array of platelet functions [36]. For example, the nucleotide ADP is the main promoter of platelet aggregation [37] while adenosine can act as a vasodilator and an inhibitor of platelet aggregation [38]. In addition, high concentrations of ATP have been shown to inhibit ADP-induced aggregation *in vitro*, while low concentrations of ATP can significantly enhance platelet aggregation [10].

NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA control the availability of ligands (ATP, ADP, AMP and adenosine) for both nucleotide and nucleoside receptors and, consequently, the duration of receptor activation [39]. In some pathological conditions in which platelets react abnormally, such as diabetes, hypertension, hypercholesterolemia and cancer, the activity of NTPDase, E-NPP and 5'-nucleotidase increased as an organic compensatory response. The organism may be preventing a clotting process by increasing the depletion of ADP and increasing the production of adenosine. [19, 40]. Adenosine has a non-redundant counteracting role in the attenuation of inflammation and tissue damage and mediates diverse cardioprotective and vasodilatory responses [38]. We suggest that this compensatory mechanism may also occur in SLE (Fig. 1 and 2).

However, another important aspect to be discussed is that ADA activity was also enhanced in SLE patients (Fig.3). ADA activity had a similar profile in serum and platelets of patients with rheumatoid arthritis, which is also an autoimmune rheumatic disease [41,42]. ADA participates in the control of the extracellular concentration of

adenosine [18]. Based on these findings, we may suggest that a rapid deamination of adenosine by ADA and consequently a decrease in the levels of adenosine in the circulation may be associated with the development of vascular complications observed in SLE, since adenosine has an important role in preventing the thrombotic process.

We have shown that the use of different concentrations of ADP as agonist did not lead to differences in platelet aggregation between SLE patients and control group (Fig. 4). These findings differ from previous studies that found significantly increased ADP-induced platelet aggregation. [43]. However, the increased activity of ADA is not proportional to the increase of NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP. With the increased activity of NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP there is a decrease of ADP, an aggregant, generating a large amount of adenosine which is hydrolyzed by ADA. The increase of ADA observed in this study is smaller than the increase of NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP. The adenosine generated by these enzymes may not be fully hydrolyzed, which could explain why there was no change in platelet aggregation observed. This mechanism could be seen as a compensatory response to the disease. We believe that these differences may also be attributed to the phase and severity of the disease.

With the objective of excluding a direct effect of the drugs commonly used for the treatment of SLE, we investigated the influence of methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and prednisone in nucleotide hydrolysis. Methotrexate, a folate antagonist, is used in the treatment of synovitis and mild disease symptoms in SLE. Leflunomide is a pyrimidine synthesis inhibitor that affects the proliferation of T-cells. The anti-malarial, hydroxychloroquine, is the main drug used for treatment of cutaneous manifestations of SLE. Anti-malarial agents exert their therapeutic effect

by inhibiting a variety of macrophage-derived cytokines and, to a lesser extent, T cell-derived cytokines. Prednisone is the standard therapy for management of patients with moderate and severe SLE. [44,45]. Our results demonstrate that these drugs did not alter NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities. Consequently, we may suggest that the increase observed in nucleotide hydrolysis was not due to the medicines used by SLE patients. These findings support the argument that it is the pathological condition that generates alterations of enzyme activities.

Based on the results presented here we may suggest that the purinergic cascade in platelets is altered in SLE patients. This finding supports the hypothesis that alterations in NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities may contribute to the development of endothelial dysfunction. Further studies are needed to clarify the possible relationship between circulating levels of adenine nucleotides and the occurrence of premature atherosclerosis in SLE patients.

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] Pan Y, Sawalha AH. Epigenetic regulation and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Trans Res* 2009; 153:4-10.
- [2] Tracey KJ. TNF and Mae West or: death from too much of a good thing. *Lancet* 1995; 345:75–76.
- [3] Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1997; 145:408-415.
- [4] McMahon M, Hahn BH. Atherosclerosis and systemic lupus erythematosus – mechanistic basis of the association. *Curr Opin Immunology* 2007; 19:633-639.
- [5] Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells Dis* 2007; 36:217-222.
- [6] Austin SK. Haemostasis. *Medicine* 2008; 37:133-136.
- [7] Ross R. Mechanisms of disease: atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999; 340:115-126.
- [8] Bakker WW, Poelstra A, Barradas K et al. Platelets and ectonucleotidases. *Platelets* 1994; 5:121-129.
- [9] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF et. al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *Thromb Haemost* 2003; 1:2497-2409.
- [10] Soslau G, Youngprarakorn D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1355:131-140.

- [11] Birk AV, Broeekman J, Gladek EM, et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J Lab Clin Med* 2002; 140:166-175.
- [12] Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 112:358-404.
- [13] Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001; 52:44–56.
- [14] 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.
- [15] Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; 2:409–430.
- [16] Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 2005; 30:542–550.
- [17] Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle, T et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006; 2: 351–360.
- [18] Franco R, Casadó V, Ciruela F, et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 1997; 52:283-294.
- [19] Zimmermann H, Mishra S, Shukla V, et al. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *An R Acad Nac Farm* 2007; 73:537:566.
- [20] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007; 40:1725.

- [21] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E.C. 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996; 7:225-230.
- [22] Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2004; 109: 189-194.
- [23] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157:375–378.
- [24] Guisti G, Galanti B. Colorimetric Method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim 1984; 315-323.
- [25] 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.
- [26] Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 95:168-178.
- [27] 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
- [28] 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* 2004; 803:331–335.
- [29] Haaksonen AL, Koshiade V, Juva K. Dosage of antimalarial drugs for children with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erithematosus. A clinical study with determination of serum concentrations of chloroquine and hidroxicloroquine, *Scand. J. Rheumatol* 1974; 103:1974.
- [30] Goyal RN, Bishnoi S. Simultaneous voltammeter determination of prednisone

and prednisolone in human body fluids. *Talanta* 2009; 79:768–774.

[31] Ralevic V, Nagashima S, Maeda M. Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thromb Res* 1998; 91:83-89.

[32] Duarte M, Loro V, Rocha J, Leal D, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *FEBS* 2007; 247:2707-2714.

[33] Bagatini M, Martins C, Battisti V, Spanevello R, et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2008; 41:1181-1185.

[34] Leeuw K, Smit AJ, Groot E, et al. Longitudinal study on premature atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Atherosclerosis* 2009; 206:546–550

[35] Roman MJ, Shanker BA, Davis A, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2331-2337.

[36] Di Virgilio F, Chioxxi P, Ferrari D, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2008; 97:587-597.

[37] Birk AV, Broekman J, Gladek EM, et al. Role of a novel soluble nucleotide phosphohydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: hemostasis, thrombosis, and vascular biology. *J Lab Clin Med* 2002; 139:116–124

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

[39] Chen W, Guidotti G. Soluble apyrases releases ADP during ATP hydrolysis.

Biochem Biophys Res Commun 2001; 282:90-95.

[40] Schetinger MR, Morsch V, Bonan C, et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and diseases conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 2008; 31:77-98.

[41] Rani SH., Madhavi G, Srikanth BMV, et al. Serum ADA and C-reactive Protein in Rheumatoid Arthritis. *Int J Hum Genet* 2006; 6:195-198.

[42] Erer B, Yilmaz G, Yilmaz FM, et al. Assessment of adenosine deaminase levels in rheumatoid arthritis patients receiving anti-TNF- α therapy. *Rheumatol Int* 2009; 29:651-654.

[43] Escolar G, Font J, Reverter JC, et al. Plasma from systemic lupus erythematosus patients with antiphospholipid antibodies promotes platelet aggregation. Studies in a perfusion system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992; 12:196-200.

[44] Sobsky MA, Wallace DJ. New therapies in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002; 16:293-312.

[45] O'Neill SG, Schrieber L. Immunotherapy of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 395– 402.

Figure Legends

Figure 1: ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in platelets of SLE patients. Bars represent means \pm SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group (Student's t test, $p<0.05$ n=20).

Figure 2: E-NPP activity in platelets of SLE patients. Bars represent means \pm SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group (Student's t test, $p<0.05$ n=20).

Figure 3: ADA activity in platelets of SLE patients. Bars represent means \pm SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group (Student's t test, $p<0.05$ n=20).

Figure 4: Platelets aggregation profile in SLE and healthy subjects (control). Platelet aggregation was evaluated using ADP as agonist at concentrations of 3, 5 and 10 μ M. The results are expressed as percentage of aggregation.

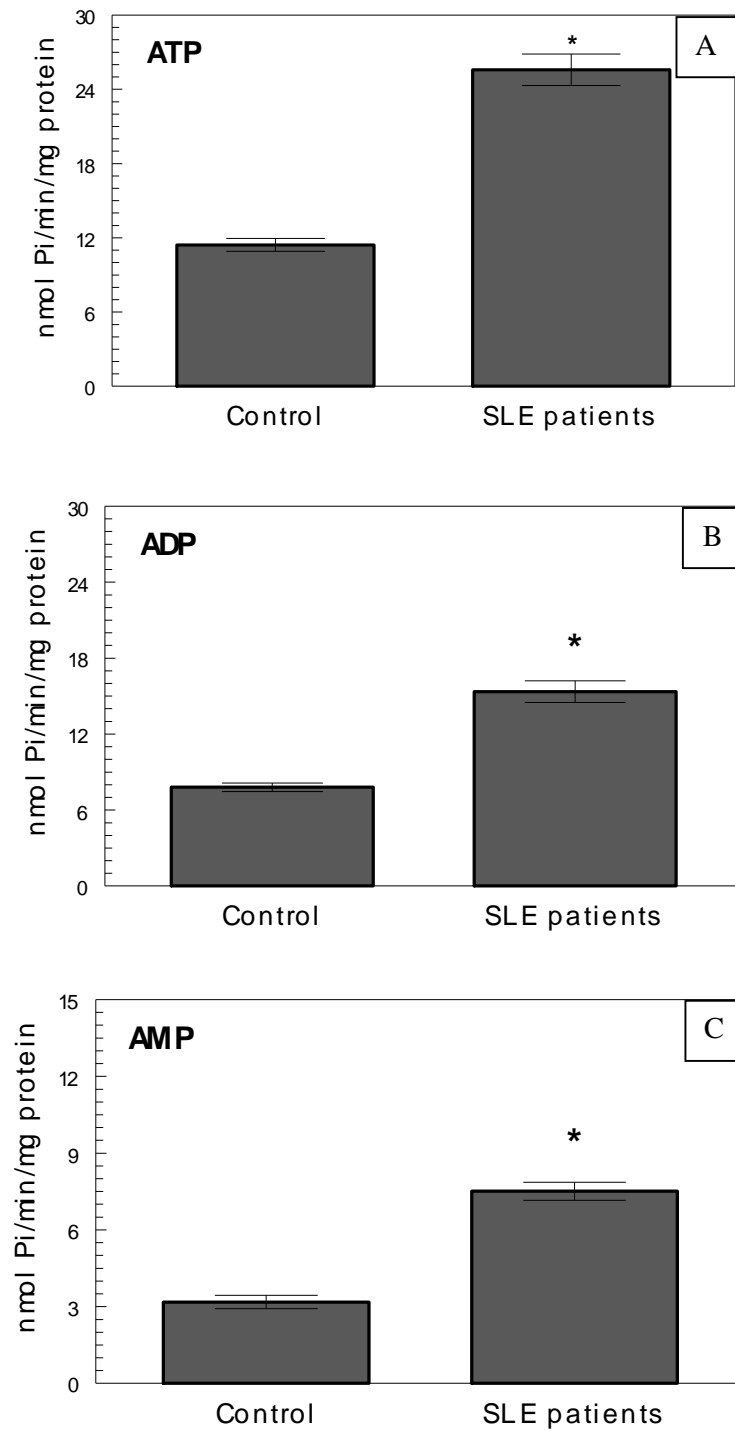


Fig. 1

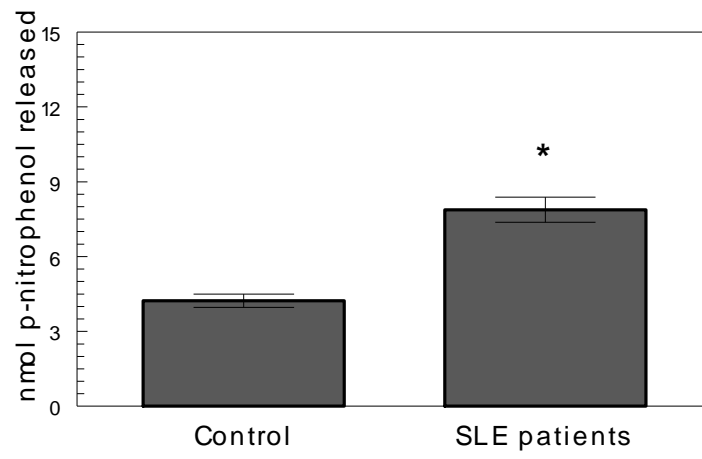


Fig. 2

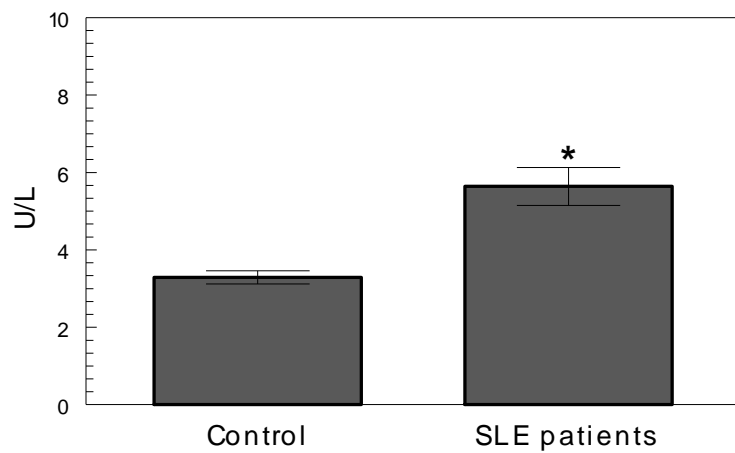


Fig. 3

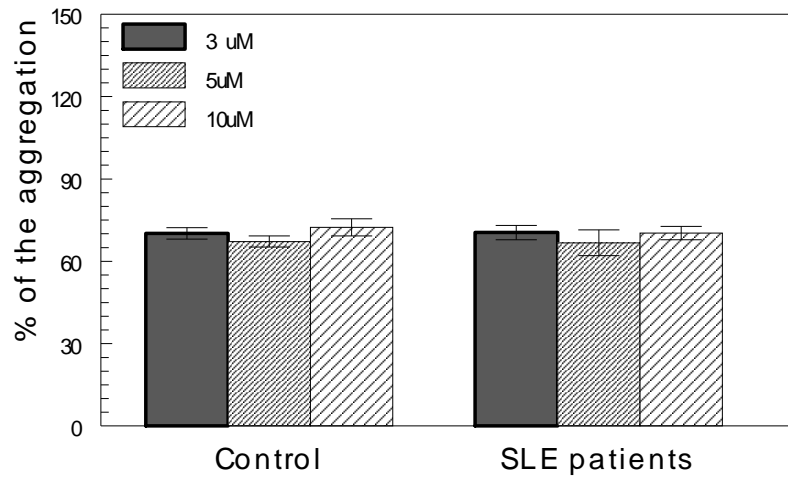


Fig. 4

Table 1: In vitro effect of methotrexate, leflunomide, hydroxycycloquine and prednisone on NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities in platelets of healthy subjects.

<i>Drugs</i>	<i>NTPDase (ATP)</i>	<i>NTPDase (ADP)</i>	<i>5' nucleotidase (AMP)</i>	<i>E-NPP</i>	<i>ADA</i>
Methotrexate					
0 µM	14,84 ± 1,26	7,90 ± 1,66	5,18 ± 0,48	2,55 ± 0,12	14.64 ± 6.11
5 µM	16,36 ± 1,35	7,78 ± 0,99	4,47 ± 0,33	2,44 ± 0,46	9.41 ± 2.37
10 µM	15,59 ± 0,95	7,47 ± 0,85	4,80 ± 0,8	2,41 ± 0,48	12.60± 1.17
15 µM	15,36 ± 1,60	6,00 ± 0,50	4,70 ± 0,19	2,53 ± 0,18	9.14 ± 1.69
Leflunomide					
0 µg/ml	17,41± 2,01	8,69 ± 2,33	5,26 ± 1,02	3,22 ± 0,57	12.49 ±2.57
25 µg/ml	17,17 ± 2,68	15,50 ± 1,75	7,05 ± 2,00	3,32 ± 0,37	10.90±1.73
35 µg/ml	13,16 ± 1,59	8,53 ± 2,17	5,86 ± 1,70	3,03 ± 0,40	10.62±2.76
45 µg/ml	16,75 ± 2,51	11,95± 2,02	6,01± 1,61	3,20 ± 0,17	7.32±3.11
Hydroxycycloquine					
0 ng/ml	23,88 ± 1,74	13,25 ± 1,62	6,46 ± 0,93	5,67 ± 0,55	9.14±2.78
540 ng/ml	22,41 ± 1,58	11,89 ± 2,47	4,75 ± 1,10	6,12 ± 0,70	13.59±1.14
1079 ng/ml	21,97 ± 1,38	11,38 ± 1,82	3,99 ± 0,14	6,76 ± 0,68	10.27±2.26
1618 ng/ml	23,79 ± 1,07	14,32 ± 2,55	4,28 ± 0,22	5,58 ± 0,82	8.97±2.02
Prednisone					
0 µg/ml	11,02 ± 0,67	7,40 ± 0,90	4,09 ± 0,21	2,47 ± 0,17	9.60±2.76
15 µg/ml	11,25 ± 0,65	8,14 ± 1,10	4,93 ± 0,25	2,30 ± 0,27	11.29±2.63
25 µg/ml	11,55 ± 0,49	6,47 ± 0,99	4,66 ± 0,50	2,40 ± 0,15	11.43±0.78
35 µg/ml	11,38 ± 0,65	5,97 ± 0,91	4,60 ± 0,25	2,42 ± 0,16	11.21±1.23

Data were evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Values represent mean ± SEM (n=4).

5. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado que NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA estão envolvidas em muitos processos, incluindo os mecanismos de trombaregulação (ZIMMERMANN et al., 2007; Yegutkin, 2008). Alterações nas atividades destas enzimas têm sido descritas em várias patologias como diabetes e hipertensão (LUNKES et al., 2003), câncer (ARAÚJO et al., 2005; MALDONADO et al., 2006), insuficiência renal crônica (SILVA et al., 2005), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2007), infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et al., 2008) e esclerose múltipla (SPANVELLO et al., 2010), entre outras. No presente estudo avaliou-se a atividade destas ectonucleotidases em plaquetas, bem como o perfil da agregação plaquetária em pacientes lúpicos.

O LES é uma patologia crônica, inflamatória e multissistêmica, que acarreta consequências graves para seus portadores com consequente diminuição na qualidade de vida, e em casos mais severos é potencialmente letal (PETRI, 2007). Embora a etiologia e a patogênese da doença não estejam completamente elucidadas, sabe-se que a principal causa de morte no lúpus, e a segunda maior causa de internação é o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (PETRI & GENOVESE, 1992). Estudos prévios têm demonstrado o desenvolvimento de aterosclerose prematura no LES. Mulheres lúpicas apresentam risco aumentado de sofrerem infarto agudo do miocárdio e estudos com ultrasonografia de artérias carótidas demonstraram maior incidência de aterosclerose subclínica no LES (LEEUW et al., 2009; ROMAN et al., 2003; MANZI et al., 1997). O mecanismo de associação entre o LES e o desenvolvimento de aterosclerose permanece não elucidado.

A aterosclerose, enfermidade crônica da parede vascular resultante da interação de fatores locais e sistêmicos, é a base etiológica da maior parte dos eventos cardiovasculares (BADIMÓN et al., 2009). Alguns componentes celulares, como as plaquetas, apresentam funções relevantes na patogênese aterosclerótica por desempenharem funções hemostáticas e trombóticas (VANNI et al., 2007).

É bem conhecido que as plaquetas estão fortemente associadas com a trombaregulação e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, por liberarem substâncias ativas como o ADP, um dos principais fatores responsáveis pela indução da agregação plaquetária (QAWI & ROBSON, 2000), enquanto a adenosina

(o produto final da hidrólise do ATP e ADP) pode inibir a agregação plaquetária (ZIMMERMANN, 1999). O ATP é considerado um inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP, embora evidências indiquem a existência de mecanismos não competitivos e demonstrem que o ATP em altas ou baixas concentrações modula diferentemente a agregação plaquetária (LÉON et al., 1997).

As concentrações de ATP, ADP e adenosina no compartimento extracelular são controladas pelas enzimas NTPDases, E-NPP, 5'- nucleotidase e ADA (ZIMMERMANN, 2000). A rápida hidrólise de ATP, ADP (realizadas pela NTPDase e E-NPP) e AMP (realizada pela 5'-nucleotidase) favorece a produção de adenosina, que possui propriedades anti-inflamatórias e antiagregantes (BOROWIEC et al., 2006). Sendo assim, o organismo pode prevenir processos trombóticos através da degradação de ADP e do aumento na produção de adenosina (BIRK et al., 2002). As enzimas NTPDases e E-NPP previnem a agregação plaquetária diretamente, por diminuírem a concentração de ADP, e a 5'-nucleotidase, por aumentar a concentração de adenosina. Deste modo, o aumento na atividade da NTPDase, da E-NPP e da 5'-nucleotidase pode diminuir a agregação plaquetária e formação do trombo.

Dessa forma o aumento na atividade das enzimas NTPDase, E-NPP e 5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes lúpicos, observado neste trabalho, pode estar relacionado a uma resposta orgânica compensatória, com o objetivo de aumentar a produção de adenosina. Resultados semelhantes foram encontrados em outras patologias (SCHETINGER et al., 2008).

Outro aspecto importante a ser discutido é que atividade da ADA também foi aumentada em plaquetas de pacientes com LES. A ADA também é responsável por regular as concentrações extracelulares de adenosina (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997). E assim pode-se especular que um aumento na sua atividade esteja relacionado com o desenvolvimento de complicações vasculares observadas em pacientes lúpicos. Entretanto, nenhuma mudança no perfil de agregação plaquetária foi observada em pacientes com LES em relação ao grupo controle.

O aumento na atividade da ADA ocorre numa proporção menor que o aumento na atividade da NTPDase, E-NPP e 5'-nucleotidase. A atividade aumentada das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e E-NPP acarreta uma diminuição na concentração de ADP, uma molécula agregante, e aumento na concentração de

adenosina. Como o aumento na atividade da ADA observado neste trabalho é menor do que o aumento observado nas atividades da NTPDase, E-NPP e 5'-nucleotidase, a adenosina formada não é completamente hidrolisada o que pode explicar a não ocorrência de mudanças no perfil de agregação plaquetária no LES. Este mecanismo pode ser uma resposta compensatória do organismo.

Devido ao fato da maioria dos pacientes participantes deste estudo estarem fazendo uso de alguma terapia, os efeitos per se dos medicamentos mais utilizados por eles foram avaliados na atividade da NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA. Foi investigada a influência do metotrexato, leflunomida, hidroxicloroquina e prednisona na hidrólise de nucleotídeos. Metotrexato, um antagonista de folatos, ajuda no tratamento de sinovites e sintomas leves da doença. A leflunomida é um inibidor da síntese de piriminas que afeta a proliferação de células-T. A hidroxicloroquina, um agente antimalárico, é o principal medicamento para o tratamento das manifestações cutâneas do LES e sintomas sistêmicos leves, este agente exerce seu efeito terapêutico por inibir a produção de uma variedade de citocinas produzidas por macrófagos. Prednisona é a terapia padrão para tratamento de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico moderado e grave (SOBSKY & WALLACE, 2002; O'NEILLA & SCHRIEBERA, 2005). Os resultados encontrados demonstraram que essas drogas não alteraram a atividade da NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA e, plaquetas. Por conseguinte, podemos inferir que o aumento observado na hidrólise de nucleotídeos não é efeito da medicação utilizada por estes pacientes. Esses resultados apoiam o argumento de que é a condição patológica que gera alterações na atividade das ecto-nucleotidases.

Em resumo, os resultados apresentados aqui sugerem que a cascata de sinalização purinérgica está alterada em plaquetas de pacientes com LES. Estes dados suportam a hipótese que alterações nas atividades das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA podem contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose e de disfunções endoteliais características do LES.

6. CONCLUSÕES

- Ocorreu um aumento nas atividades das enzimas NTPDase, E-NPP e 5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com LES. Isso pode estar relacionado a uma resposta orgânica compensatória, com o objetivo de diminuir a concentração de ADP e aumentar a produção de adenosina, tendo em vista o papel anti-agregante desta molécula.

- Nenhuma alteração na agregação plaquetária foi observada. Isto pode ser explicado pelo aumento menos acentuado na atividade da ADA em relação à NTPDase, E-NPP e 5'-nucleotidase. Dessa forma, a adenosina que está sendo formada em maior quantidade não é completamente convertida em inosina. A adenosina evita alterações na agregação plaquetária.

- Não se observou influência das drogas utilizadas no tratamento do LES nas concentrações plasmáticas sobre os parâmetros testados *in vitro*, dessa forma conclui-se que os resultados obtidos não foram em decorrência do uso dos medicamentos testados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ARNETT F. C.; REVEILLE J. D. ; WILSON R. W. ; PROVOST T. T. ; BIAS W. B. Systemic Lupus Erythematosus: Current state of genetic hypothesis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 14(1), p. 24-35, 1984

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, R. Ecto-nucleotidases of CD39/NTPDase family and thrombus formation: potencial as therapeutic targets. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 36, p. 217-222, 2006.

AUSTIN, S.K. Haemostasis. **Medicine**, v. 37 (1), p. 133-136, 2008.

BADIMÓN, L.; VILAHUR, G.; PADRÓ, T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. **Revista Española de Cardiología**, v. 62(10), p. 1161-78, 2009.

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

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

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

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends in pharmacological Science**, v. 27, p. 166-176, 2006.

CARNEIRO, J.R.; SATO, E.I. Double blind, randomized, placebo controlled clinical trial of methotrexate in systemic lupus erythematosus. **Journal of Rheumatology**, v. 26(6), p. 1275-1279, 1999.

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

COLGAN, S.; ELTZCHIG, H.; ECKLE, T.; THOMPSON, L. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 351-360, 2006.

DAS, U. N. Interactions between essential fatty acids, eicosanoids, cytokines, growth factors and free radicals: Relevance to new therapeutic strategies in rheumatoid arthritis an other collagen vascular diseases. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 44, p. 201-210, 1991.

D'CRUZ, D.P.; KHAMASHTA, M.A.; HUGHES, G.R. Systemic lupus erythematosus. **Lancet**, v. 369(9561), p. 587-96, 2007.

DELLAVANCE, A.; GABRIEL-J, A.; CINTRA, A.F.; XIMENES, A.C.; NUCCITELLI, B.; VON-MUHLEN, C.A. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 207-216, 2002.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FAALZONI, S.; SANZ, J.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O. Nucleotide receptors: an

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

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

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

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

ESDAILE, J.M.; ABRAHAMOWICZ, M.; GRODZICKY, T.; LI, Y.; PANARITIS, C.; DU BERGER, R.; CÔTE, R.; GROVER, S.A.; FORTIN, P.R.; CLARKE, A.E.; SENÉCAL, J.L. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus, **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, p. 2331–2337, 2001.

FRANCO, R.; CASADÓ, V.; CIRUELA, F.; LAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E.; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase : much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 283-292, 1997

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

GOLDENBERG, D.L.; BURCKHARDT C.; CROFFORD L. Management of fibromyalgia syndrome. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 292(19), p. 2388–2395, 2004.

HACKAM, G.D.; ANAND, S.S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **Journal of the American Medical Association**, v. 290, p. 932-940, 2003.

HAHN, B.H. Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. **Textbook of Rheumatology**, v. 2, p. 1089-103, 1997.

HAQ, I.; ISENBERG, D.A. Systemic Lupus Erythematosus. **The Medicine Publishing Company Ltd**, p. 6-12, 2002.

HELMICK, C.G.; FELSON, D.T.; LAWRENCE, R.C.; GABRIEL, S.; HIRSCH, R.; KWOH, C.K.; LIANG, M.H.; KREMERS, H.M., MAYES, M.D.; MERKEL, P.A.; PILLEMER, S.R.; REVEILLE, J.D.; STONE, J.H. Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States.National. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58 (1), p 15–25, 2008.

HOCHBERG, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the Classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 40, p. 1725, 1997.

KARIUKI, S.N.; NIEWOLD, T.B.; Genetic regulation of serum cytokines in systemic lupus erythematosus. **Translational Research**, v. 155 (3), p. 109-117, 2009.

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

KYTTARIS, V.C.; KATSIARI, C.G.; JUANG, Y.; TSOKOS, G.C. New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Current Rheumatology Reports**, v. 7(6), p. 469:475, 2005

LEAL, D.B.R.; STREHER, C.A.; NEU, T.N.; BITTENCOURT, F.P.; LEAL, C.A.M.; SILVA, J.E.P.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ectoapyrase; ecto-diphosphohydrolase, CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica & Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9-15, 2005.

LEEuw, K.; SMIT, A.J.; GROOT, E.; RONN, A.M.V.; KALLENBERG, C.G.; BIJL, M. Longitudinal study on premature atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. **Atherosclerosis**, v. 206, p. 546–550, 2009.

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

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

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

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

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

MAGALHÃES, M.B.; DONADI, E.A.; LOUZADA, P. Manifestações clínicas do lúpus eritematoso sistêmico: abordagem diagnóstica e terapêutica na sala de urgência. Medicina, Ribeirão Preto, **Simpósio: URGÊNCIAS E EMERGÊNCIAS IMUNOLÓGICAS Capítulo II**, v. 36, p.409-417, 2003.

MALDONADO, P.A.; CORRÊA, M.C.; BECKER, L.V.; FLORES, C.; MORETTO, M.B.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NNP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 400-406, 2008.

MANZI, S.; MEILAHN, E.N.; RAIRIE, J.E.; CONTE, C.G.; MEDSGER-JR, T.A.; JANSEN-McWILLIAMS, L.; D'AGOSTINO, R.B.; KULLER, L.H. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 145, p. 408–415, 1997.

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

McMAHON, M.; HAHN B.H. Atherosclerosis and systemic lupus erythematosus — mechanistic basis of the association. **Current Opinion in Immunology**, v. 19 (6), December 2007, p. 633-639, 2007.

MEINÃO, I.M.; SATO, E.I.; ANDRADE, L.E.; FERRAZ, M.B.; ATRA, E. Controlled trial with chloroquine diphosphate in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 5, p. 237-241, 1996.

NATH, J.K.; HARLEY, J.B. Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 794–800, 2004.

O'NEILLA, S.G.; SCHRIEBERA, L. Immunotherapy of systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, p. 395-402, 2005.

PETRI, M. Epidemiology of sistemic lupus erythematosus. **Best Practice e Research Clinical Rheumatology**, v. 16(5), p 847-858, 2002.

PETRI, M.; GENOVESE, M. Incidence of end risk factors for hospitalizations in systemic lupus erythematosus: a prospective study of the Hopkins Lupus Cohort. **Journal of Rheumatology**, v. 19(10), p 1559-65, 1992.

PETRI, M. Monitoring systemic lupus erythematosus in standard clinical care. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 21(4), p. 687–697, 2007.

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

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

REMER, C.F.; WEISMAN, M.H.; WALLACE, D.J. Benefits of leflunomide in systemic lupus erythematosus: a pilot observational study. **Lupus**, v. 10 (7), p. 480-483, 2001.

REMIJIN, J.; WU, Y.; JENINGA, E.; IJSSELDIJK, M.; WILLIGEN, G.; GROOT, P.; SIXMA, J.; NURDEN, A.; NURDEN, P. Role of ADP receptor P2Y₁₂ in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.22, p. 686-691, 2002.

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

ROMAN, M.J.; SHANKER, B.A.; DAVIS, A.; LOCKSHIN, M.D.; SAMMARITANO, L.; SIMANTOV, R.; CROW, M.K.; SCHWARTZ, J.E.; PAGET, S.A.; DEVEREUX, R.B. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 2399–2406, 2003.

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

SATO, E.I.; BONFÁ, E.D.; COSTALLAT, L.T.L.; SILVA, N.A.; BRENOL, J.C.T.; SANTIAGO, M.B.; SZAJUBOK, J.C.M.; FILHO, A.R.; BARROS, R.T.; VASCONCELOS, M. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42(6), p. 362-370, 2002.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N.; GUCKELBERGER, O.; CSIZMADIA, E.; QAWI, I.; IAMI, M.; ZIMMERMAN, H.; ROBSON, S.C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1) and NTPDase 2 have implications for thromboregulation. **Blood**, v. 99, p. 2801-2809, 2002.

SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; BONAN, C.; WYSE, A.T.S. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31(2), p. 77-98, 2008.

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

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

SOBSKY, M.A.; WALLACE, D.J. New therapies in systemic lupus erythematosus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 16 (2), p. 293-312, 2002.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKOM, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular and Cell Biology**, v. 1355, p.131–140, 1997.

SPANEVERELLO, R.M.; MAZZANTI, C.M.; BAGATINI, M.D.; CORRÊA, M.C.; SCHMATZ, R.; STEFANELLO, N.; THOMÉ, G.; MORSCH, V.M.; BELLÉ, L.; OLIVEIRA, L.; SCHETINGER, M.R.C. (2010). Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. **Journal of Neurology**, v. 257, p. 24–30, 2010.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterase: unity and diversity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, p. 542-550, 2006.

TERKELTAUB, R. Physiologic and pathologic functions of the NPP nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase family focusing on NPP1 in calcification. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 371:377, 2006.

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

VILAR, M.J.; SATO, E.I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, v. 11, p. 528-32, 2002.

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

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

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

ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S.; SHUKLA, V., LANGER, D.; GAMPE, K.; GRIMM, I.; DELIC, J.; BRAUN, N. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional

impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, p. 537-566, 2007

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

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

WALLACE, D.J.; LINKER-ISRAELI, M.; METZGER, A.L. The relevance of antimalarial therapy with regard to thrombosis, hipercolesterolemia and cytokines in SLE. **Lupus**, v. 2, p. 13-15, 1993.

8. ANEXOS

8.1 Anexo A - 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 Lupus eritematoso Sistêmico**” através da mestranda Cíntia Saydelles da Rosa, orientada pela prof^a Dr^a Vera Maria Morsch. Este projeto tem como objetivo avaliar a atividade de componentes do sangue em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e em indivíduos controles, livres de qualquer doença (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 de 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 material utilizado para a coleta será descartável e/ou desinfetado. Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação aos pacientes. As amostras serão tratadas de acordo com os protocolos experimentais estabelecidos.

Fica garantido que os dados coletados ficarão sob responsabilidade do pesquisador e que os mesmos serão utilizados apenas para fins científicos, sem que o paciente seja identificado, garantindo assim o anonimato.

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

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

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu _____estou de acordo em participar desta pesquisa, assinando este consentimento.

Santa Maria, ____ de _____200_.

Nome Paciente

Identidade

Assinatura-Responsável pelo paciente Identidade
(nos casos em que o paciente for menor de 18 anos)

Identidade

Assinatura do pesquisador

Em caso de dúvidas, entrar em contato com Profª Drª orientadora Vera Maria Morsch, (55)3220-8665, ou com Cíntia Saydelles da Rosa (pesquisadora), (55) 9142-3206.

Comitê de Ética em Pesquisa - UFSM



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

Cidade Universitária - Bairro Camobi

97105-900 - Santa Maria - RS

Tel.: (55)32209362 - e-mail: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br

8.2 Anexo B – 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> 
--	---

PARECER PROTOCOLO DE PESQUISA

Protocolo CEP-UFSM: 23081.019638/2008-22 **CAAE:** 0294.0.243.000-08

Data entrada CEP: 09/12/2008 **Data do parecer CEP:** 13/01/2009

Data encaminhamento CONEP (caso necessário): / /

IDENTIFICAÇÃO

Título do Projeto: Estudo do perfil oxidativo e avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com Lupus eritematoso Sistêmico.

Pesquisador Responsável: Vera Maria Morsch

Instituição: Universidade Federal de Santa Maria.

Unidade/Órgão: Departamento de Química

Área Temática: III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

OBJETIVOS DO PROJETO (Descrever os objetivos e metas do projeto)

Os objetivos do projeto são: verificar a atividade das enzimas NTPDases e adenosina deaminase em linfócitos de pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico; determinar a atividade das mesmas enzimas mais a 5'-nucleotidase em plaquetas dos mesmos pacientes; verificar as alterações na atividade da acetilcolinesterase de linfócitos e sangue total de pacientes com LES; analisar a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas no soro de pacientes com LES; verificar as defesas antioxidantes enzimáticas em sangue total e verificar as defesas antioxidantes não-enzimáticas em soro dos pacientes com LES.

RESUMO (Descrever o objeto de pesquisa, justificativa, condições de realização, aspectos metodológicos, cronograma, orçamento e financiamento)

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida. Nesta patologia acontece uma alteração no sistema imune sendo que os linfócitos são as principais células envolvidas no processo de liberação de citocinas pró-inflamatórias. Dentre os mediadores das ações dos linfócitos estão o ATP e acetilcolina, cujo os níveis são mantidos por enzimas como as NTPDases e a acetilcolinesterase. Além disso, espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido consideradas agentes que sustentam os efeitos inflamatórios em diferentes patologias. Dessa forma torna-se relevante a avaliação do papel destas enzimas regulatórias bem como o estudo do perfil oxidativo de pacientes com LES, com o objetivo de colaborar para um melhor entendimento da doença. O estudo prevê dois grupos de 25 pacientes, um grupo controle e outro com LES oriundos do HUSM com idade entre 20 e 55 anos. A coleta será realizada por um farmacêutico autorizado pelo médico responsável pelo setor de reumatologia. O material coletado será utilizado apenas para os ensaios previstos no projeto. O Cronograma prevê atividades de setembro de 2008 até fevereiro de 2010. O orçamento está presente.