

**CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA)**

**PERFIL LIPÍDICO, AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA
E ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA
PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE PACIENTES
HIV POSITIVOS SOB TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

João Felipe Peres Rezer

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**PERFIL LIPÍDICO, AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E
ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA
PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE PACIENTES HIV
POSITIVOS SOB TERAPIA ANTIRRETROVIRAL**

João Felipe Peres Rezer

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 a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS, Brasil
2013

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

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

**PERFIL LIPIDÍCO, AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E ATIVIDADE DE
ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE
PACIENTES HIV POSITIVOS SOB TERAPIA ANTIRRETROVIRAL**

elaborada por
João Felipe Peres Rezer

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica)

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Profª Drª Daniela Bitencourt Rosa Leal (UFSM)
(Presidente/ Orientador)**

Profª Drª Rosélia Maria Spanevello (UFPeI)

Prof. Dr. Sydney Hartz Alves (UFSM)

Santa Maria, 23 de Agosto de 2013

“É bem por aí... O resto vem... O tempo traz...

E ninguém tira...

Não se perde o que se conquista, só o que se compra...

E conquistar sai bem mais caro, mas vale a pena.

Vai valer”

(Esteban Tavares)

*É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do
que se vê... (Los Hermanos)*

Dedico este trabalho aos meus pais, João Aramis e Dalva... Que sempre apostaram e confiaram na minha capacidade;

*Por suas palavras de incentivo, apoio, dedicação e exemplo de caráter. Que permitiram eu chegar mais longe, em passos às vezes pesados...
....mas nunca inalcançáveis....*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e proteção. Pela luz dirigida ao meu caminhar, podendo assim chegar mais longe e possibilitar que as minhas conquistas sejam alcançadas.

Aos meus pais João Aramis e Dalva, meu melhor e mais sincero agradecimento: pela compreensão, amor e educação, por sempre me concederem segurança e base para eu seguir em frente nas minhas escolhas e assim alcançar minhas conquistas, não só minhas... deles também!

Aos meus irmãos Jean e Naila pelo convívio, palavras de apoio e por eu saber que sempre terei alguém que posso confiar, pelo vínculo que nos une para sempre. Aos cunhados, tios, primos e à minha vó, sei que sempre torceram por mim. Muito obrigado.

À minha sobrinha e afilhada linda Brenda. Pelo seu carinho, amor e felicidade que transmite a cada momento. Fazendo com que meu espírito de criança prevaleça mesmo que nas dificuldades.

À minha namorada Carina, meu amor, que o destino me presenteou no início desta jornada, que tanto me apoiou, compreendeu e principalmente incentivou, dando força para que este sonho fosse realizado e tornando meus dias mais felizes e minha vida mais completa.

À minha orientadora Daniela Bitencourt Rosa Leal pela oportunidade, compreensão, amizade e por todo aprendizado... Pela confiança depositada nesses quase 7 anos, desde a iniciação científica. Minha "*mãe científica*". Também ao seu esposo Cláudio Leal pela oportunidade. Muito obrigado.

O meu agradecimento também à professora Maria Rosa Schetinger e Vera Morsch pela oportunidade de ingressar em seu laboratório e permitir o acompanhamento de diversos estudos. Aos colegas do Lab 2208 Rosélia, Marga, Victor, Dani, Gustavo, Lara, Juci, Carol e Jamile por me acolherem e não medirem esforços ao compartilhar conhecimentos. Além da amizade construída neste período.

Aos colegas e amigos do laboratório 4229: Jader, Viviane, Maria Luiza e Tati pela colaboração para a realização deste trabalho. Lívia, Cristiano, Karine B., Karine L., Kelly, Renata, Josiane, Jeandre, Pedro, Fernanda e Claudia pela amizade durante o período de convívio, a troca de conhecimento e por sempre acreditarem que podemos ser melhores. Pela alegria de todos, tornando os longos dias de experimentos menos cansativos. O companheirismo e o empenho de todos... Muito obrigado!

Ao pessoal do laboratório de Parasitologia veterinária, prof^a Silvia, Camila e Aleks, pela amizade e companheirismo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia e do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM pelo auxílio e apoio prestados.

Aos componentes da banca, Prof^a Rosélia Spanevello, Prof^o Sydney Hartz e a Pós-doutoranda Luciane Pereira que dispuseram tempo e atenção para avaliação deste trabalho. Muito obrigado.

A minha sincera gratidão aos pacientes por participarem deste estudo e compartilharem suas histórias de vida, a luta continua. Fé sempre...

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida desde minha iniciação científica.

Enfim, a todos que colaboraram, seja de forma profissional ou pessoal,

Muito obrigado...

RESUMO

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

PERFIL LIPÍDICO, AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE PACIENTES HIV POSITIVOS SOB TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

Autor: João Felipe Peres Rezer

Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Data e local de Defesa: Santa Maria, 23 de agosto de 2013.

A infecção pelo HIV é caracterizada por uma contínua replicação viral e depleção dos linfócitos T CD4+, acarretando alterações imunológicas e infecções por patógenos oportunistas. A utilização da terapia antirretroviral (TARV) tornou evidente a regressão das manifestações clínicas, acompanhada por melhora nas condições de saúde do paciente. Fato que indica um aumento na expectativa de vida. Entretanto, junto aos benefícios da medicação, surgem também complicações relacionadas com a toxicidade destas drogas. A infecção pelo HIV e o uso da TARV tem sido fortemente associados com o risco de doença cardiovascular e possíveis eventos pró-trombóticos. Sabendo da participação de plaquetas como células efetoras na resposta imune, na resposta inflamatória e na coagulação sanguínea e ainda, que o sistema purinérgico é constituído por ectoenzimas (E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA) que possuem ações importantes na tromborregulação e na hemostasia o objetivo deste estudo foi determinar o perfil de agregação plaquetária, a atividade de ectoenzimas em plaquetas e possíveis alterações metabólicas de indivíduos infectados pelo HIV. Foram incluídos no estudo 20 indivíduos controle (sorologia negativa para HIV), 10 indivíduos HIV (sorologia reagente para HIV e sem tratamento antirretroviral) e 50 indivíduos HIV TARV (com sorologia reagente para HIV e em tratamento com TARV). Os resultados mostram que não houve alteração da atividade da E-NTPDase para hidrólise do ATP, mas houve uma diminuição de hidrólise do ADP no grupo HIV TARV. A atividade da E-5'-nucleotidase não está alterada para hidrólise do AMP nos pacientes HIV TARV. Contudo, a atividade da E-ADA está diminuída nos grupos HIV e HIV TARV, fato que pode promover um aumento nos níveis extracelulares de adenosina. Ainda foi encontrado aumento da agregação plaquetária e aumento do colesterol LDL e triglicérides no grupo HIV TARV, dados estes sugerem risco de doença cardiovascular aumentado. Com isso, os resultados aqui relatados sugerem que o tratamento antirretroviral exerce uma importante alteração, tanto na atividade das ectoenzimas do sistema purinérgico envolvidas no processo tromborregulatório, quanto no perfil de agregação plaquetária destes pacientes e nos parâmetros metabólicos, dados que podem suportar hipóteses de risco cardiovascular neste grupo de pacientes e um possível efeito cardioprotetor da adenosina extracelular durante o tratamento antirretroviral.

Palavras - chave: Plaquetas, HIV, ectoenzimas, antirretroviral, adenosina.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post- Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

LIPID PROFILE, PLATELET AGGREGATION AND ACTIVITY OF ECTOENZYMES PURINERGIC SYSTEM IN PLATELETS OF HIV POSITIVE PATIENTS UNDER THERAPY ANTIRETROVIRAL

Author: João Felipe Peres Rezer
Advisor: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Place and Date: Santa Maria, 23 august 2013.

HIV infection is characterized by continuous viral replication and depletion of CD4 + T lymphocytes, leading to immunological changes and opportunistic infections by pathogens. The use of antiretroviral therapy (ART) became apparent regression of clinical manifestations, accompanied by improvement in the patient's clinical condition. Fact which indicates an increase in life expectancy. However, with the benefits of medication complications arise also related to the toxicity of these drugs. HIV infection and HAART has been strongly associated with the risk of cardiovascular disease and possible prothrombotic events. Knowing the participation of platelets as effector cells in the immune response, inflammatory and clotting and that the purinergic system comprising ectoenzymes as E-NTPDase, and 5'-nucleotidase and E-ADA besides their role in regulating levels of adenine nucleotides and nucleoside have important actions in thromboregulation hemostasis and the aim of this study was to determine the profile of platelet aggregation activity ectoenzymes in platelets and metabolic changes in HIV-infected individuals. The study included 20 control subjects (tested negative for HIV), 10 HIV individuals (seropositive for HIV without antiretroviral treatment) and 50 HIV-HAART (seropositive for HIV and treated with HAART). The results show that there was no change in the activity of the E-NTPDase for ATP hydrolysis, but there was a decrease in the hydrolysis of ADP in HIV HAART group. The activity of E-5'-nucleotidase is not changed to AMP hydrolysis in HIV HAART. However, the activity of E-ADA groups is decreased in HIV and HIV HAART, which may promote an increase in extracellular levels of adenosine. Also found increased platelet aggregation and increased LDL cholesterol and triglyceride levels in HIV HAART group, these data suggest increased risk of cardiovascular disease. Thus, the results reported here suggest that antiretroviral treatment has a significant change, both in the activity of the purinergic system ectoenzymes involved in thromboregulation, as the profile of platelet aggregation in these patients and metabolic parameters, data that can support risk hypotheses cardiovascular this group of patients and a possible cardioprotective effect of extracellular adenosine during antiretroviral treatment.

Keywords: Platelets, HIV, ectoenzymes, antiretroviral adenosine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura do HIV-1.....	18
FIGURA 2: Infecção pelo HIV-1: Dinâmica da carga viral e células TCD4+.....	21
FIGURA 3: Ação das drogas da terapia antirretroviral no ciclo de vida do HIV.....	23
FIGURA 4: Mecanismos protetores e deletérios da terapia antirretroviral nas células endoteliais.....	25
FIGURA 5: Forma e apresentação das plaquetas.....	26
FIGURA 6: Representação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão.....	28
FIGURA 7: Caminhos da liberação de nucleotídeos.....	31
FIGURA 8: Ectoenzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos.....	33
FIGURA 9: Estrutura das NTPDases.....	35
FIGURA 10: Estrutura E-5'-nucleotidase.....	36

MANUSCRITO I

Figure 1: Activity of the E-NTDase by the hydrolysis of ATP (1A) and ADP (1B). Bars represent means \pm SEM. The letters represents statistical difference from the control group.....	57
Figure 2: Activity of the E-5'-nucleotidase by the hydrolysis of AMP. Bars represent means \pm SEM. The letters represents statistical difference from the control group.....	58

Figure 3: E-ADA activity of platelets. Bars represent means \pm SEM. The letters represents statistical difference from the control group.....58

Figure 4: Platelet aggregation was evaluated by using ADP as agonist at concentrations of 5 and 7.5 μ M. The results are expressed as percentage of aggregation (n=15). Bars represent means \pm SEM. The symbol * represents statistical difference from the control group.....59

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Table 1: General characteristics and coagulation parameters from HIV patients (n= 60) and control group (n=20). Continuous variables are shown as means \pm SEM. PTT: Partial Thromboplastin time, PT: Prothrombin time.....61

Table 2: Evaluation of cellular integrity on platelet preparation. Results are presents as means \pm SEM with the number of experiments given in parenthesis LDH activity is expressed as U/L.....62

Table 3: Metabolic characteristics. Amounts in ml/dL. LDL: *low-density lipoprotein*; HDL: *high-density lipoprotein*. Reference values according to Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults.....63

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRs: Regiões conservadas da apirase

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina monofosfato

ATP: Adenosina trifosfato

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

ADA: Adenosina deaminase

CDC: Center for Disease Control and Prevention

DNA: Ácido desoxiribunucleíco

E-NTPDase: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

E-NPP: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-5-NT: Ecto-5'-nucleotidase

E-ADA: Ecto-adenosina desaminase

HDL- High Density Lipoproteins

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HUSM: Hospital Universitário de Santa Maria

IN: Integrase

IP3: Inositol trifosfato

LDL- Low Density Lipoproteins

PIC: Complexo de pré-integração

PR: Protease

PPP: Plasma pobre em plaquetas

PRP: Plasma rico em plaquetas

RNA: Ácido ribonucleico

SIDA: Síndrome da imunodeficiência humana

TARV: Terapia antirretroviral

TR: Transcriptase reversa

TCD4+: Linfócitos TCD4+

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76
Apêndice B Coleta de dados	78
Apêndice C Termo de confidencialidade.....	80
Apêndice D Parecer de aprovação do Comitê de Ética	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	39
3 MANUSCRITO.....	40
3.1 Introdução.....	41
3.2 Materiais e Métodos.....	42
3.2.1 Pacientes e Amostras.....	42
3.3 Resultados.....	44
3.4 Discussão.....	46
4 CONCLUSÃO	63
5 REFERÊNCIAS.....	65
6 APÊNDICES.....	76

1. INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) é uma doença causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), caracterizada por ser uma infecção crônica (KLIMAS et al., 2008). O HIV pertence a uma classe de microrganismos denominada de retrovírus e ao subgrupo lentivírus (CHIU e YANIV et al., 1985). Evidências relatam que o HIV, anteriormente teria como seu hospedeiro natural o chipanzé, foi transmitido para o homem no início do século XX nos países do oeste africano (KEELE et al., 2006).

No ano de 1981, a epidemia da infecção pelo HIV teve seu início, quando o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) relatou a morte de cinco indivíduos homossexuais masculinos devido a uma infecção pulmonar rara causada pelo agente *Pneumocystis carinii* (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1981). A identificação do agente causador desta epidemia foi reconhecida somente no ano de 1983 (FAUCI, 1999; ELEOPULOS et al., 2004).

Dados revelam que em 2011, 2,5 milhões de novas infecções foram identificadas no mundo, sendo 2,2 milhões em adultos e 330 mil em menores de 15 anos. O número representa mais de 7 mil novas infecções diárias e 97% delas foram notificadas em países de baixa e média renda. Já as mortes provocadas pelo HIV no mesmo período totalizaram 1,7 milhão, sendo 1,5 milhão entre adultos e 230 mil entre menores de 15 anos de idade. Na América do Norte, 20 mil pessoas morreram no ano de 2010 em decorrência do HIV; na região do Caribe, 10 mil; na América Latina, 57 mil; na Europa Ocidental e Central, 9,3 mil; na Europa Oriental e Ásia Central, 90 mil; na Ásia Oriental, 60 mil; na Ásia Meridional e Sul-oriental, 270 mil; no Norte da África e Oriente Médio, 25 mil; na África Subsaariana, 1,2 milhões; e na Oceania, 1,3 mil (UNAIDS, 2012).

No Brasil, os registros indicam que já foram notificados 656.701 casos de AIDS (de 1980 a junho de 2012). Dados atuais estimam que 530 mil pessoas vivam com HIV/AIDS em nosso país. Do total estimado, 135 mil desconhecem ou nunca realizaram a testagem sorológica para o HIV (BRASIL, 2012).

Este vírus tem sua estrutura formada por um envelope, uma bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro e as glicoproteínas gp120 e gp41, responsáveis pela entrada do vírus na célula do hospedeiro. Internamente, uma matriz protéica (p17) envolve o capsídeo viral (p24). No interior do capsídeo esta o genoma viral que consiste de duas fitas simples de RNA associadas a três enzimas virais, denominadas transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e protease (PR) (BARRE-SINOUSI, 1996) (FIGURA 1).

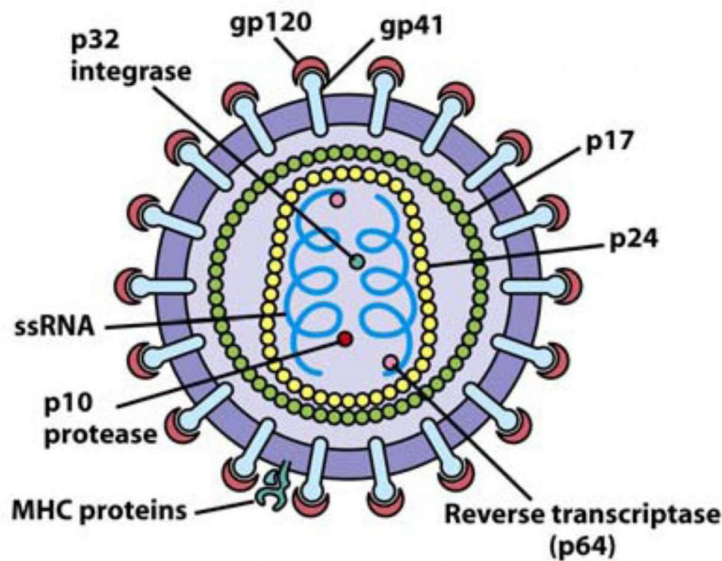


FIGURA 1: Estrutura do HIV-1 (KUBY, 2007).

O vírus da imunodeficiência humana se subdivide em dois tipos geneticamente diferentes (BUTLER et al., 2007). O HIV-1 é o vírus predominante nas regiões da Europa, Estados Unidos, África Central e em inúmeras outras partes do mundo, incluindo o Brasil, sendo o mais prevalente entre os dois tipos. O HIV-2 é encontrado principalmente em indivíduos infectados na região oeste do continente Africano, possuindo características muito similares ao HIV-1, visto que tem o mesmo tropismo por células do sistema imune e causa a síndrome da imunodeficiência aguda (TEBIT et al., 2007).

A transmissão do HIV acontece durante o contato sexual sem o uso de preservativos, de mãe para filho, na exposição a produtos contaminados com sangue e em usuários de drogas injetáveis que podem contaminar-se com o

vírus assim como em pessoas que manipulam inadequadamente produtos contendo sangue contaminado (SLEASMAN; GOODENOW, 2003).

Após a transmissão do HIV, as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos TCD4+ migram e hospedam o vírus para região dos tecidos linfóides durante um período de três a cinco dias. Essas células permitem que ocorra a replicação viral dentro de aproximadamente quatorze dias após a exposição (ZHANG et al., 1999). O ciclo de vida do HIV pode ser dividido em fases precoces e tardia. Geralmente, a fusão viral inicia-se após uma interação entre as glicoproteínas virais e a superfície das células TCD4+. Isto é seguido pelo desencapsulamento do vírus e a transcrição reversa do genoma do RNA viral em DNA pró-viral. Subsequentemente, o DNA recém sintetizado é associado a um complexo de núcleo-proteína, denominado complexo de pré-integração (PIC), que inclui a proteína viral matriz, transcriptase reversa, integrase e a proteína acessória VPR (NISOLE; SAIB, 2004).

Este ciclo viral tem continuação com a expressão do gene pró viral pela maquinaria da célula hospedeira, o que resulta em poliproteínas precursoras virais. A poliproteína gag-pol, é clivada pela enzima viral protease, ocorrendo então a produção de proteínas virais maduras para a montagem do virion. Isto é seguido pelo brotamento, maturação viral e finalmente, a liberação de virions infectantes para novas células do hospedeiro (LAITH; NOURI, 2007).

Fatores como infecções oportunistas, marcadores de ativação imunológica e perda de peso dos indivíduos infectados, estão associados com a progressão da doença causada pelo HIV. Em alguns casos, estes fatores, podem estar relacionados com a diminuição da sobrevida, os quais podem ser relacionados entre os indicadores da gravidade e/ou progressão da doença (SULLIVAN et al., 1998; SULLIVAN, 2002).

A infecção pelo HIV-1 cursa com um amplo espectro de manifestações clínicas, desde a fase aguda até a fase avançada da doença. Em pessoas que se infectam com o HIV e não realizam tratamento, é estimado que o tempo médio entre o contágio e o aparecimento da doença esteja em torno de dez anos (BRASIL, 2013).

A evolução da infecção pelo HIV inicia com a infecção primária ou fase aguda da infecção, que geralmente é assintomática e corresponde ao período de elevada carga viral (FIGURA 2). Em geral, as manifestações começam a

surgir de duas a quatro semanas após a contaminação e podem apresentar características clínicas inespecíficas como febre, linfadenopatia, cefaléia, mialgia, artralgia, anorexia, náusea, vômito, diarreia e exantema maculopapular eritematoso. Mas a fase aguda é autolimitante e rápida, com duração aproximada de até 30 dias. A infecção primária de curso mais severo tem sido relacionada a uma rápida progressão da doença. Nesta fase, os exames laboratoriais apresentam uma diminuição na contagem de células T CD4+ (BARTLETT; MOORE, 1999).

A soroconversão em geral ocorre após duas a seis semanas do contágio e antes desse período, os testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-HIV-1 não são reagentes em decorrência da pequena quantidade de anticorpos produzida e também devido à sensibilidade dos testes. Este período é compreendido como janela imunológica, quando a resposta imune adaptativa é capaz de controlar parcialmente a infecção e a replicação viral (STAPRANS; FEINBERG, 2004).

Com a resolução do quadro de infecção primária e a soroconversão, o paciente entra na fase crônica da infecção assintomática sendo conhecida como fase de latência clínica. Esta fase pode subsistir por vários meses ou até alguns anos. A replicação viral permanece nos órgãos linfóides, porém, identifica-se um processo de equilíbrio dinâmico no qual a destruição das células TCD4+ é parcialmente contrabalanceada pela sua produção. Por conseguinte, ocorre uma destruição lenta e gradativa de células TCD4+, macrófagos e células dendríticas (BARTLETT; MOORE, 1999; GESKUS et al., 2007).

Ao término do período de latência, com o declínio constante de células T CD4+, o sistema imunológico começa a evidenciar a sua fragilidade frente ao HIV-1; apresentando a contagem absoluta de células TCD4+ que pode chegar a níveis abaixo de 200 céls/mm³ e o surgimento de doenças oportunistas, caracterizando assim, o início da infecção sintomática pelo HIV e o desenvolvimento de AIDS (KARON et al., 1992; BARTLETT; MOORE 1999, STAPRANS; FEINBERG, 2004).

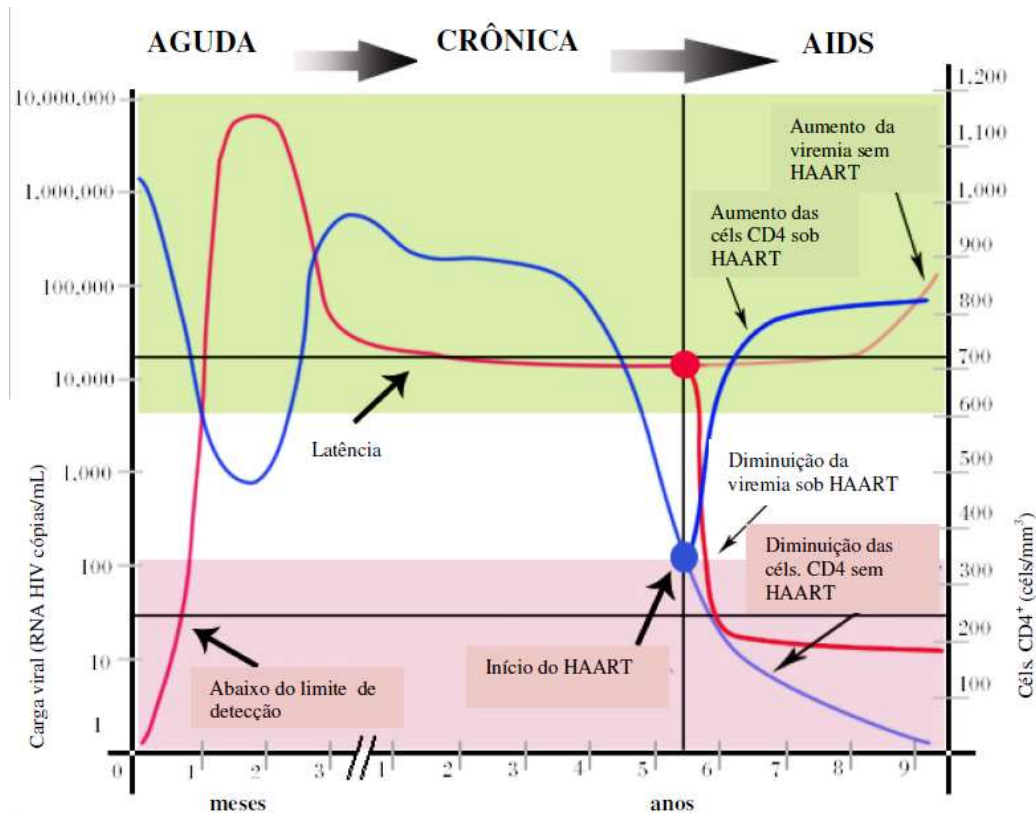


FIGURA 2: Infecção pelo HIV-1: dinâmica da carga viral e das células T CD4+. Disponível em: <http://www.metapathogen.com/HIV-1/HIV-1-disease> progression (adaptado)

Nos primeiros anos da epidemia, a maioria dos indivíduos infectados progredia para um estado de quase completa destruição das funções do sistema imunológico. Anteposto, vale destacar que somente a partir do ano de 1996, com o surgimento da terapia antirretroviral (TARV), houve uma grande mudança no curso da história natural da infecção pelo HIV. O uso combinado dos antirretrovirais levou à redução acentuada da carga viral plasmática, elevação significativa e prolongada no número de linfócitos TCD4+ e, conseqüentemente, à diminuição de qualquer processo definidor de AIDS e da mortalidade relacionada ao HIV (HOGG et al., 1993; MARINS et al., 2003; D'ARMINIO et al., 2005).

Os fármacos antirretrovirais disponíveis para o uso podem ser divididas em cinco grupos de acordo com o mecanismo pelo qual eles interrompem o ciclo de vida do vírus. Estes grupos dividem-se entre: os Inibidores da transcriptase reversa, que inibem a transcriptase reversa viral por competição com os nucleosídeos naturais, ou por redução da sua atividade catalítica. Já os

inibidores de protease desativam a protease e com isso, impedem a geração de novos virions capazes de infectar outras células. Outra classe são os inibidores de integrase que atuam impedindo a integração do DNA viral no genoma nuclear. Os inibidores de fusão impedem a fusão entre o invólucro do vírus e a membrana da célula hospedeira (APOSTOLOVA et al., 2011).

Com o advento desta terapia, a sobrevivência de pacientes infectados pelo HIV melhorou significativamente. No entanto, em estudos de observação, o uso da terapia antirretroviral foi fortemente associado com o risco de doença cardiovascular (FOWKES et al., 2003; KLEIN et al., 2005; UNAIDS/WHO, 2008).

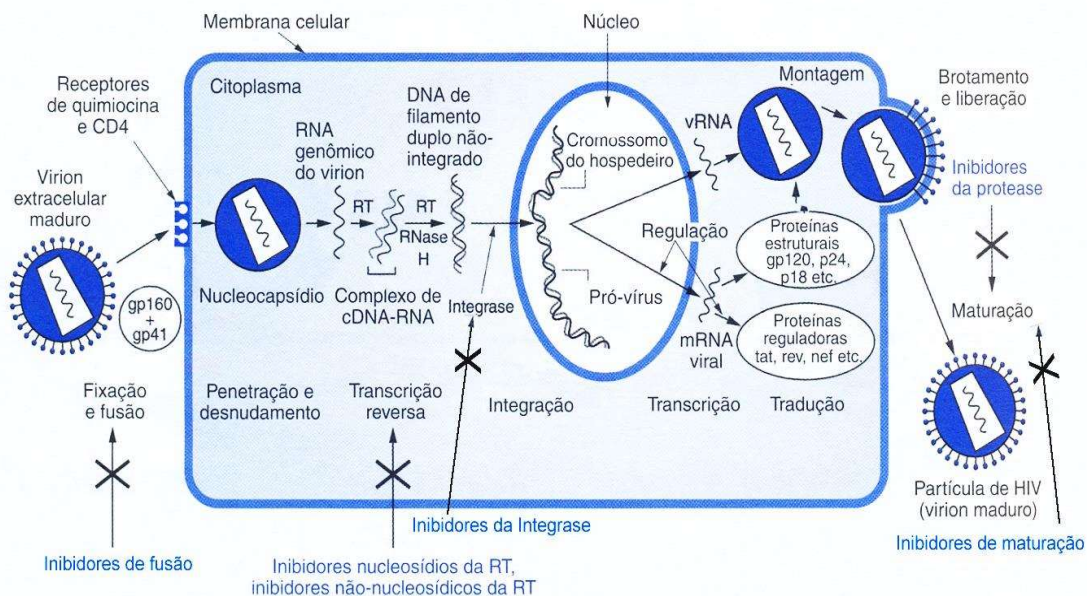


FIGURA 3: Ação das drogas da terapia antirretroviral no ciclo de vida do HIV (Adaptado de GOODMAN; GILMAN, 2009)

Antes do início da terapia antirretroviral, pensou-se que a doença cardíaca coronariana relacionada ao HIV estava associada à infecção pelo citomegalovírus ou ao HIV *per se*, apesar da associação entre a infecção viral e lesões arteriais coronarianas não ter ficado bem estabelecida (ANDERSON et al., 1990). Posteriormente, estudos imunohistoquímicos possibilitaram a documentação objetiva da presença do HIV em artérias coronárias comprometidas por inflamação e obstrução aterosclerótica (BARBARO et al., 2001). Diversos distúrbios clínicos e laboratoriais de lipídios e metabolismo da

glicose têm sido cada vez mais relacionados em pacientes com infecção por HIV após o advento da terapia antirretroviral (VIRABEN; AQUILINA, 1999; BEHRENS et al., 1999). Várias vias metabólicas foram postuladas para explicar o uso da terapia antirretroviral associada à alterações no metabolismo lipídico, incluindo a indução da resistência à insulina, a inibição da lipoproteína-lipase causada por fator de necrose tumoral-alfa, a supressão da replicação do HIV, ou mudanças sutis no sistema endócrino e na homeostase (CALZA; MANFREDO; CHIODO, 2003).

Sposito e colaboradores (2007) evidenciaram que o aumento da incidência de eventos vasculares e trombóticos agudos nestes pacientes foi atribuída também à trombofilia e a um perfil lipídico desfavorável devido à redução dos níveis de HDL e à elevação de triglicerídeos e de lipoproteínas. Além disso, tem sido demonstrado que uma alta proporção de pacientes tratados com TARV, especialmente aqueles que incluem inibidores de protease, apresentam distúrbios metabólicos (dislipidemia, resistência à insulina) e alterações fisiológicas (lipodistrofia e lipoatrofia), bem como aumento do risco de doença cardiovascular (doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral) (MULLIGAN et al., 2000; BARBARO, 2003; SWEET, 2005; GRINSPOON; CARR, 2005).

Algumas linhas de pesquisas defendem que a aterosclerose pode ser influenciada pelas doenças causadas por diversos microrganismos como vírus e bactérias, já que estes possuem papel importante no desenvolvimento da placa aterosclerótica (LEINONEN et al., 2000; KURANO et al., 2011). A partir disso, pessoas infectadas e que fazem o uso da terapia antirretroviral, têm na doença aterosclerótica prematura cardiovascular uma das principais causas de morbidade e mortalidade (MOCROFT et al., 2010). O aumento do risco de doença cardiovascular em pacientes que recebem terapia antirretroviral parece estar relacionado, em parte, aos efeitos de certos componentes da mesma, no entanto, os efeitos diretos da terapia sobre a vasculatura também podem contribuir para este problema. A disfunção endotelial (FIGURA 4) é um passo chave na aterogênese que contribui para a iniciação, perpetuação e para as manifestações clínicas da aterosclerose (LOUW et al., 2008).

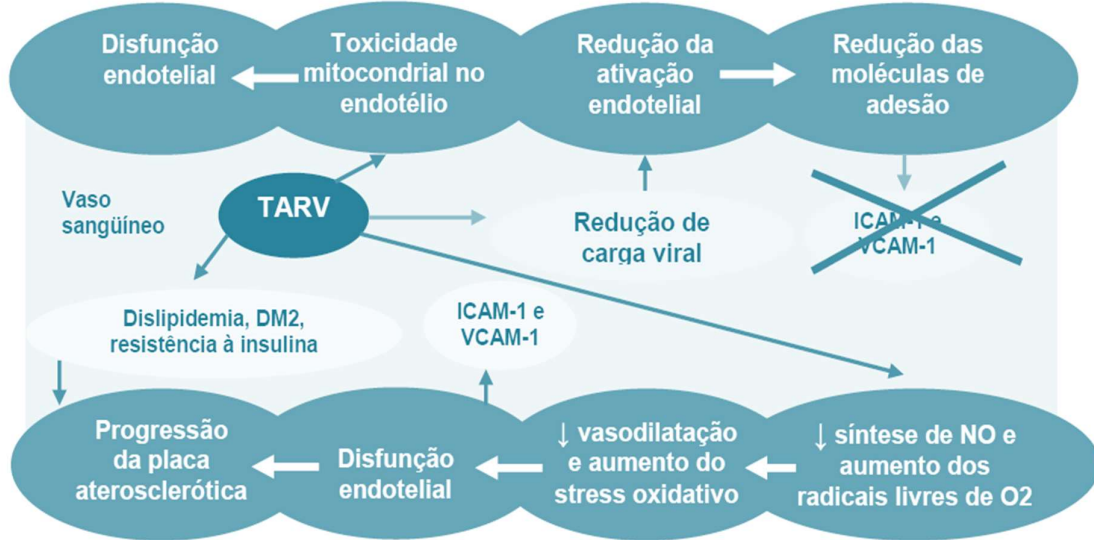


FIGURA 4: Mecanismos protetores e deletérios da terapia antirretroviral nas células endoteliais. (ICAM-1: Molécula de adesão intracelular-1; V-CAM 1: Moléculas de adesão vascular-1; DM2: Diabetes tipo II; NO: óxido nítrico (Adaptado de CALZA; MANFREDI; VERUCHHI, 2010).

A função endotelial tem sido implicada na aterogênese e no controle do comportamento dinâmico de placa, prevendo a ocorrência de futuros eventos cardiovasculares (LAING et al., 1996; LOUW et al., 2008). Ainda não está totalmente esclarecido o efeito da infecção pelo HIV e/ou da terapia antirretroviral na elasticidade das grandes ou pequenas artérias (BAKER et al., 2009).

As plaquetas, além de participar da cicatrização de feridas e da hemostasia, são componentes envolvidos também nos processos inflamatórios e imunológicos (PAGE, 1989; WEKSLER, 1992).

As alterações inflamatórias subclínicas que ocorrem na parede arterial, desencadeadas por fatores de risco cardiovascular, são implicadas na patogênese da doença aterosclerótica (ROSS, 1999). Embora a infecção pelo HIV provoque imunossupressão e consequente diminuição da resposta inflamatória sistêmica, a mesma provoca profundas alterações da função endotelial, semelhante às encontradas na reação inflamatória subclínica própria da doença aterosclerótica difusa. Os níveis elevados de fator de von

Willebrand, uma glicoproteína que provoca agregação plaquetária, são encontrados nestas duas situações e se correlacionam com níveis de citocinas pró-inflamatórias. Considerando que os níveis plasmáticos de fator de von Willebrand têm valor prognóstico na doença coronariana se faz necessário também salientar que a expressão da proteína S está diminuída na infecção pelo HIV e auto- anticorpos pró-trombóticos anti-fosfolípidos são produzidos em maior quantidade nestes pacientes (SUDANO et al., 2006).

Ante o exposto, fica evidente que as plaquetas (FIGURA 5) são as principais responsáveis pela manutenção da integridade da vasculatura, sendo capazes de responder rapidamente frente a qualquer alteração no endotélio vascular devido a suas propriedades de adesão, liberação de substâncias e agregação. Ressalta-se ainda, que os eventos cardiovasculares resultantes da oclusão por trombos em locais que apresentam ruptura de placas devido à ativação, adesão de plaquetas e a formação de coágulo de fibrina (FIGURA 6) são a principal causa de morte e invalidez mundial (BAKKER et al., 1994; MARCUS et al., 2001; BIRCK et al., 2002).

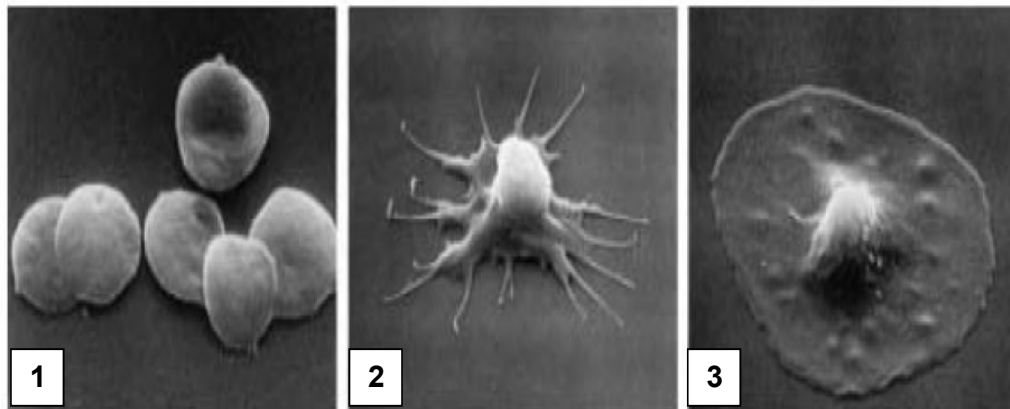


FIGURA 5: Formas de apresentação das plaquetas: 1. Plaquetas em repouso com forma discoide; 2. Plaquetas expostas a agentes pró-agregantes, aderem ao substrato e estendem diversos filopódios; 3. As plaquetas se espalham para exercer suas funções. (Adaptado de *Molecular Cell Biology*, Lodish, 5ª edição).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos, derivadas do megacariócito e são envolvidas por membrana. Possuem vida média de 7 a 10 dias, apresentando forma esférica, sendo anucleadas e compostas por diversas organelas, como sistema canicular aberto e grânulos densos. Este sistema é o responsável pela troca de substâncias com o meio externo. Pequenos filamentos de actina estão ligados a proteínas e conectados a membrana plasmática através de glicoproteínas (BLOCKMANS et al., 1995). Estas estruturas não têm capacidade de síntese protéica, mas possuem intensa atividade metabólica em nível de membrana (BATLOUNI, 1993).

Com isso, a hemostasia é reconhecida por ser um processo fisiológico que tem como objetivo manter o sangue em estado fluido no interior dos vasos sanguíneos, evitando a hemorragia ou a trombose. Em condições fisiológicas, as células endoteliais, que revestem os vasos sanguíneos, expressam substâncias com propriedades anticoagulantes. Quando ocorre dano vascular, o fator tissular é exposto, liga-se ao fator VII e ao fator VIIa, iniciando assim, o processo de coagulação (FURIE; FURIE, 1988).

O complexo fator tissular engatilha uma série de reações bioquímicas de ativação e inativação da qual participam proteínas plasmáticas entre elas, os zimogênios de serinoproteases e cofatores; plaquetas e células endoteliais e íons (principalmente o cálcio). O conjunto dessas ações resulta na formação de coágulo constituído por plaquetas e fibrina (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991).

Então, para o desenvolvimento do processo de coagulação, é fundamental que aconteça a ativação plaquetária, desencadeada por um dano vascular e/ou estímulo químico (por trombina, o nucleotídeo ADP, tromboxano A₂ ou epinefrina). Já a adesão plaquetária resulta da ligação do complexo de superfície glicoproteína (Gp) Ib/Gp IX (GpIb/IX) ao fator von Willebrand, presente no subendotélio vascular. A agregabilidade plaquetária, é desencadeada através da liberação de importantes biomoléculas dos seus grânulos, tais como ADP e tromboxano A₂, que ativam e recrutam outras plaquetas para o sítio da lesão (MANN, 1999). Com a ativação das plaquetas, ocorre a expressão do complexo plaquetário IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) na superfície e ligação ao fibrinogênio circulante, mediando a formação do tampão plaquetário (MANN, 1999).

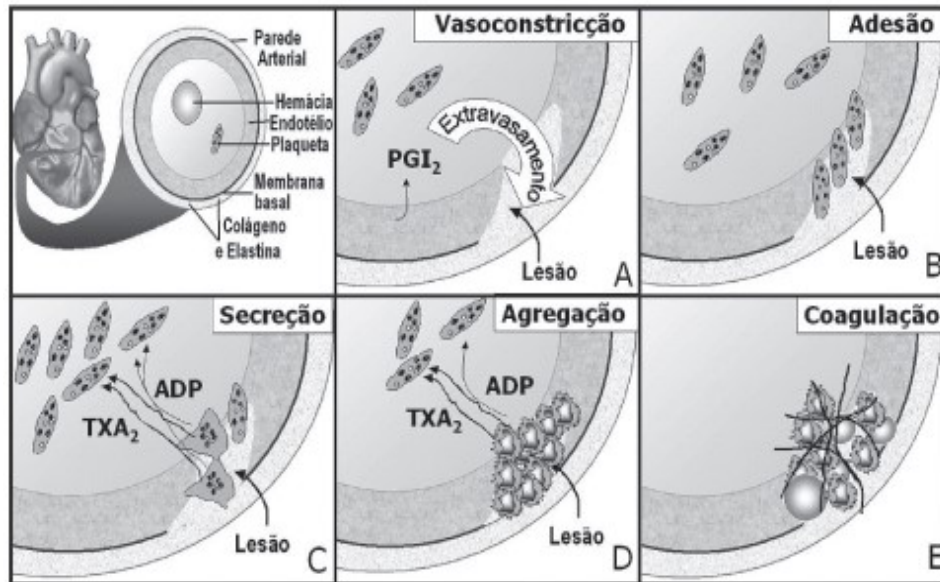


FIGURA 6: Representação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão plaquetário. A- Processo de lesão com exposição de agonistas plaquetários. B- Adesão das plaquetas do subendotélio. C- Mudança de forma da plaqueta com secreção dos grânulos. D- Ligação plaqueta/plaqueta. E- Depósito de fibrina sobre o tampão plaquetário. (Adaptado de CASTRO et al., 2006).

Neste ponto, vale destacar, que a alteração da série megacariocítica mais frequente em indivíduos infectados por HIV é a trombocitopenia (ALAEI et al., 2002; SACHER et al., 2002; MAZZA et al., 2004). Calcula-se que cerca de 11% dos infectados por HIV apresentem contagem de plaquetas inferior a $100 \times 10^3/\mu\text{L}$. Destes, apenas uma pequena proporção (6% a 24%) apresenta trombocitopenia grave (contagem plaquetária inferior a $50 \times 10^3/\mu\text{L}$). No entanto, os quadros hemorrágicos graves, que podem comprometer a vida destas pessoas, não são frequentes (IRIBARREN et al., 1996).

Estudos também relatam a ativação plaquetária em indivíduos infectados pelo HIV. Holme e colaboradores (1998), mostraram que este grupo de pacientes possui aumento significativo dos níveis de plaquetas ativadas, como evidenciado por estas plaquetas possuírem níveis de microvesículas superiores, bem como os níveis de p-selectina, CD63 e aminofosfolípidos.

Porém, os mecanismos que conduzem à ativação das plaquetas em pacientes infectados pelo HIV ainda não foi totalmente elucidados, mas vários fatores podem estar envolvidos. O efeito da terapia antirretroviral sugere que o grau de replicação do HIV está associado com esta ativação. A possibilidade é

de que a replicação do HIV por si só induz esta ativação, a infecção por HIV em megacariócitos e os efeitos do HIV nas proteínas derivadas de plaquetas também podem sustentar esta ideia (ZUCKER-FRANKLIN et al., 1990; ZAULI et al., 1992;).

A agregação plaquetária é a propriedade que as plaquetas possuem de unirem-se entre si e é responsável pelo crescimento do trombo plaquetário. Há três vias principais de agregação plaquetária, que se interrelacionam em várias etapas do processo. Uma vez ativada, a plaqueta sofre ação de agonistas que se ligam a receptores de membrana da plaqueta e ativam cascatas bioquímicas. A primeira via de agregação se manifesta pela ação da fosfolipase C, que atua catalisando a formação de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 se liga aos receptores no sistema tubular denso, elevando a concentração citoplasmática de cálcio. O aumento dos níveis intracelulares de cálcio promove a contração da plaqueta, secreção de ADP e síntese de tromboxano A2 (SOBOL; WATALA, 2000).

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

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

A liberação de agentes agregantes como ADP no meio extracelular, pode estimular a adesão, ativação e agregação plaquetária. Frente a isso, a hidrólise do nucleotídeo ADP extracelular constitui uma importante via para limitar a agregação plaquetária e a formação de trombo (PILLA et al., 1996; ISHII-WATABE et al., 2000).

Diversas biomoléculas são capazes de desempenhar papéis importantes nas funções plaquetárias. Considerando isto, vale ressaltar que aproximadamente 90% dos nucleotídeos presentes nas plaquetas são constituídos por nucleotídeos de adenina (LUTHJE; OGILVIE, 1983). Sendo assim, é importante frisar que diversos estudos referem que os nucleotídeos, ATP e ADP, secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas, servem como mediadores capazes de modular o processo de inflamação e trombose vascular (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). O ATP e outros nucleotídeos e nucleosídeos são encontrados em todos os sistemas de órgãos animais que produzem efeitos tanto por mecanismos intracelulares e extracelulares. O ATP intracelular é principalmente utilizado como forma energética em diversos processos, tais como o transporte ativo, motilidade celular e biossíntese, enquanto ATP extracelular é considerado uma poderosa molécula de sinalização (BURNSTOCK, 1972).

Pesquisas inferem que a liberação de nucleotídeos endógenos (FIGURA 7) representa um componente importante para iniciar uma cascata de sinalização. A liberação massiva de nucleotídeos pode ocorrer após a lise das células, no entanto, este mecanismo não específico é restrito por lesão de órgãos, choque traumático ou determinadas condições inflamatórias (BOURS et al., 2006). Já os mecanismos não-líticos de efluxo de nucleotídeos representam uma via distinta e importante da presença de nucleotídeos no meio extracelular. Vários tecidos excitatórios, tais como células pancreáticas (SORENSEN; NOVAK, 2001) e em destaque as plaquetas circulantes (MARCUS et al., 2003), armazenam ATP e ADP, em grânulos especializados, sendo capazes de regular a liberação de vesículas contendo nucleotídeos de uma forma dependente de Ca^{2+} , via exocitose. Ademais, pode ocorrer a liberação de nucleotídeos a partir de vários tecidos não-excitatórios, incluindo o epitélio (SCHWIEBERT; ZSEMBERY, 2003; OKADA et al., 2006), células endoteliais (BODIN; BURNSTOCK, 2001; BUXTON et al., 2001), cardiomiócitos (VASSORT, 2001) e de outras células hematopoiéticas (BOURS et al., 2006).

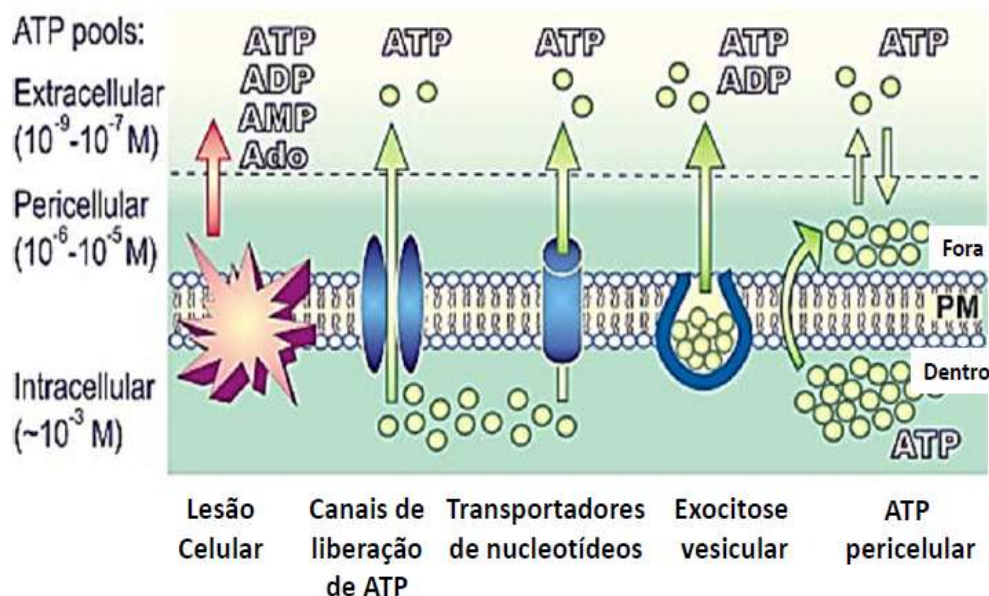


FIGURA 7: Caminhos da liberação de nucleotídeos por vias não líticas, incluindo movimento eletrodifusional através de canais de liberação de ATP, difusão facilitada por transportadores específicos de nucleotídeo e exocitose vesicular e ainda a segregação preferencial de concentração micromolar de ATP no espaço pericelular (Adaptado de YEGUTKIN, 2008).

Os nucleotídeos da adenina como ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina não são capazes de atravessar a membrana celular, porém podem realizar suas ações biológicas através de receptores purinérgicos específicos que estão presentes na superfície celular (DI VIRGÍLIO et al., 2001).

O ATP extracelular e seus metabólitos são reconhecidos por duas famílias de receptores purinérgicos, P1 e P2, presentes na superfície de diversas células cujos membros são ativados pela adenosina e por ATP e ADP respectivamente (BURNSTOCK, 2007). Os receptores P2 podem ainda ser divididos em duas subclasses, acoplados à proteína G (metabotrópicos) e chamados de P2Y e também os ligados a canais iônicos, designados P2X (DI VIRGÍLIO et al., 2001).

Em mamíferos estão identificados oito subtipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14), sete P2X (P2X1-7) e quatro subtipos de receptores P1 (A1, A2A, A2B e A3) (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Receptores do tipo P1 reconhecem a adenosina e também são metabotrópicos (BURNSTOCK, 2007). Os subtipos A2A e A2B de

receptores estão acoplados à proteínas estimulatórias G (Gs) e tipicamente suprimem as respostas celulares por aumentar os níveis de AMPc intracelulares. Enquanto, os receptores subtipos A1 e A3 estão acoplados a proteínas Gi/0 ou Gq/11 e promovem a ativação celular (JUNGER, 2011).

O ATP liberado no meio extracelular exercerá seus efeitos quando ligado a receptores P2X ou a P2Y, e conseqüentemente será metabolizado à adenosina por ectoenzimas, que irão controlar seus níveis extracelulares. A adenosina formada, exercerá seus efeitos biológicos através da ativação de receptores P1 (DI VIRGILIO et al., 2001).

Estudos recentes revelaram que o ATP pode ser liberado em condições basais, influenciando uma grande variedade de respostas celulares. Deste modo, o ATP parece atuar como um mensageiro de dentro para fora, que afina as vias de transdução de sinal (CORRIDEN; INSEL, 2010).

O ATP pode exercer seus efeitos na tromborregulação, pois é liberado dos grânulos plaquetários, juntamente com o ADP, no momento que ocorre ativação das plaquetas. O ATP desempenha um duplo efeito sobre a agregação das plaquetas, ou seja, em baixas concentrações ele induz a agregação plaquetária, e em altas concentrações ele acaba provocando inibição da agregação (SOSLAU; YOUNGPRAPAKORN, 1997).

O nucleotídeo ADP no meio extracelular atua como mediador primário da ativação plaquetária, contribuindo para homeostasia e formação de trombos, através do seu efeito agregatório após danos teciduais. O AMP é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP (BARSOTTI; IPATA, 2004) que exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio no metabolismo, servindo também como substrato para a formação da adenosina (CUNHA, 2001; LATINI; PEDATA, 2001).

A adenosina é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP, tornando-se um agente protetor dos vasos e artérias, protegendo os mesmos da instalação da placa arterosclerótica (SPRONK et al., 2004; DUARTE et al., 2007). Este nucleosídeo pode apresentar também uma ação cardioprotetora em episódios de isquemia ou hipóxia como já relatados em estudos anteriores (MINAMINO et al., 1996, HASKO; CRONSTEIN, 2004).

Para manter os níveis extracelulares em condições fisiológicas, os nucleotídeos ATP, ADP, AMP e o nucleosídeo adenosina, após desempenhar

suas funções orgânicas, devem ser degradados. Para isto, existe um sistema responsável pelo controle dos seus níveis extracelulares, exercido por enzimas ancoradas na membrana plasmática das células, como plaquetas, linfócitos e células endoteliais ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel. Essas enzimas são conhecidas como ectonucleotidases e podem ser classificadas como família das E-NTPDase (nucleosídeo trifostato 5'-difosfohidrolase, CD39 ou apirase), família das E-NPP (nucleosídeo pirofosfato/fosfodiesterase), fosfatases alcalinas e E- 5'-nucleotidase (CD73) sendo amplamente distribuídas nos tecidos (ZIMMERMANN, 2000).

O conjunto de ações destas ectoenzimas, forma uma cadeia enzimática (FIGURA 8) que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP, formando AMP. A seguir a enzima E-5'-nucleotidase hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001, ZIMMERMANN et al., 2012). Ainda, seguindo esta sequência de degradação, existe a enzima adenosina desaminase (ADA), a qual regula as concentrações de adenosina, através da conversão e consequente formação de inosina (ZIMMERMANN, 2000; BOURS et al., 2006).

A E-NTPDase (FIGURA 9) (E.C.3.6.1.5, ATP-difosfohidrolase, ecto ATPase, apirase, CD39), é uma enzima que pertence a família das ectonucleotidases, responsável por catalisar a hidrólise de nucleotídeos extracelulares tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). Oito membros desta família já foram identificados e diferem quanto à especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular. As E-NTPDases 1, 2, 3 e 8 localizam-se na superfície celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Já as E-NTPDases 5 e 6 tem expressão intracelular e as E-NTPDases 4 e 7 têm sua localização intracelular, voltada para o lúmen da organela citoplasmática (ROBSON et al., 2006).

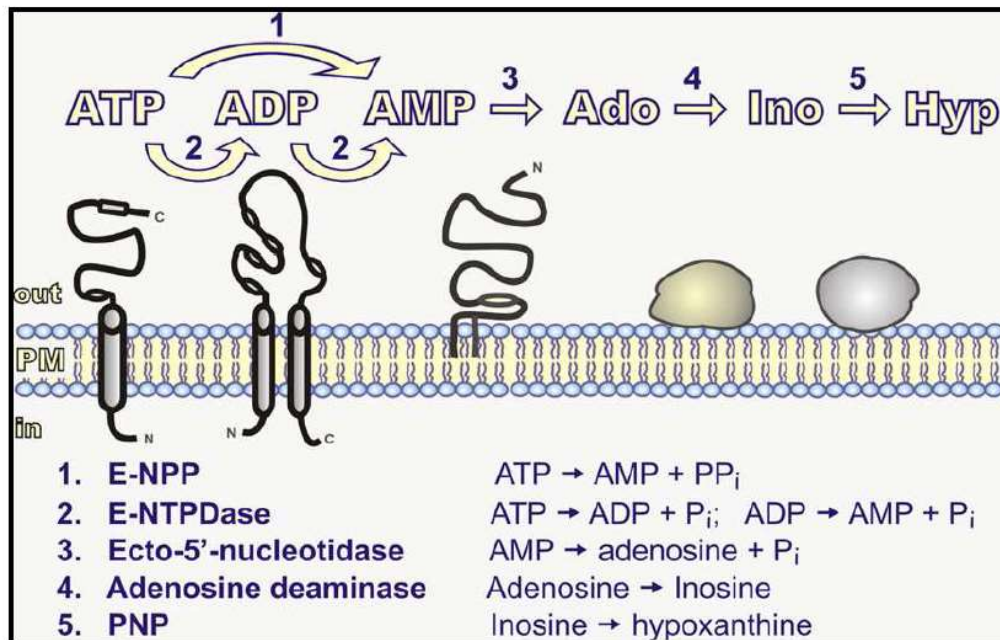


FIGURA 8: Ectoenzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos (Adaptado Yegutkin, 2008).

Estas ectoenzimas estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos e patológicos. Muitas das suas ações biológicas representam consequências da atividade fosfohidrolítica dos nucleotídeos extracelulares que limita os efeitos mediados pela ativação dos receptores P2, além do envolvimento na produção de adenosina, que por sua vez exercerá seus efeitos através da ativação de receptores P1 ou participará da via de recuperação de nucleotídeos (BURNS, 1990).

As NTPDases expressam seus genes em vertebrados e também em invertebrados, plantas, fungos e importantes patógenos humanos, como *Herpetomonas muscarum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis*, *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*, atuando como facilitadores da infecção, estando possivelmente envolvidos com a captação de purinas, capacidade infectiva e modulação da resposta imune do hospedeiro (BERMUDES et al., 1994; BERREDO-PINHO et al., 2001; ALVES-FERREIRA et al., 2003; DE JESUS et al., 2002; FIETTO et al., 2004; PENIDO et al., 2007).

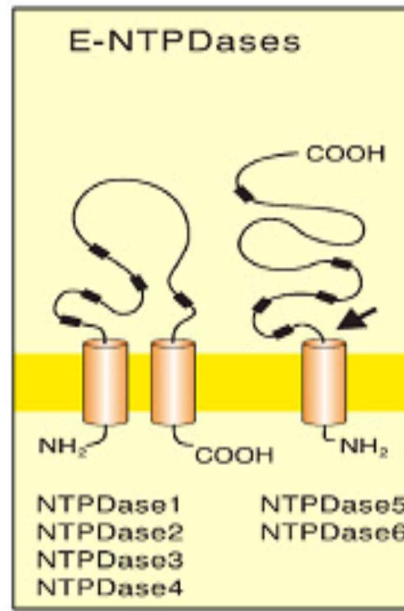


FIGURA 9: Estrutura das NTPDases (Adaptado de ZIMMERMANN, 2001).

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

Um aumento na expressão da CD39 já foi observado em plaquetas de pacientes diabéticos e hipertensos; pacientes com doença de chagas (LUNKES et al., 2008; SOUZA et al., 2012). A presença de E-NTPDase, na membrana de células endoteliais, constitui um fator preponderante na manutenção da homeostasia vascular (BIRK et al., 2002). Enfatiza-se ainda, que as respostas trombóticas e inflamatórias podem ser moduladas pela expressão da CD39/ATPDase (KOZIAK et al., 1999).

A enzima Ecto-5'-nucleotidase (5'-NT; EC 3.1.3.5, CD73) pertence a uma superfamília de dinuclear metalofosfoesterases, a qual hidrolisa diferentes substratos, incluindo fosfoproteínas, nucleotídeos e ácidos nucléicos (HUNSUCKER et al., 2005; STRATER, 2006). Esta amplamente distribuída em bactérias, plantas e animais, a enzima catalisa a hidrólise da ligação

fosfodiéster de vários nucleosídeos 5'-monofosfatado (ex.: AMP) a seus respectivos nucleosídeos (ex.: adenosina) (ZIMMERMANN, 1996). Até o momento, sete membros da enzima E-5'-nucleotidase foram isolados e caracterizados em humanos, diferindo entre si através das suas propriedades moleculares e cinéticas, bem como de sua especificidade pelo substrato e localização celular (BOROWIEC et al., 2006).

Cinco membros estão localizados no citoplasma, um na matriz mitocondrial e um ancorado à membrana plasmática externa, sendo este uma ecto- 5'-nucleotidase (E-5'-NT) (HUNSUCKER et al., 2005). Embora hidrolise uma variedade de nucleosídeos 5'-monofosfatados, foi demonstrado que a E-5'-nucleotidase tem maior afinidade por AMP, com valores de Km na faixa de micromolaridade, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN, 2001).

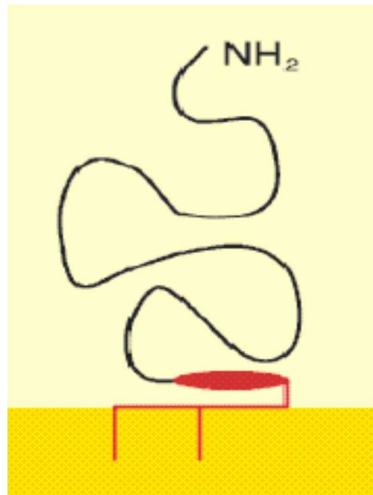


Figura 10: Estrutura da ecto-5'-nucleotidase (Adaptado de ZIMMERMANN, 2001).

A E-5'-nucleotidase ativa é um dímero composto de subunidades de 71kDa ancorado à membrana plasmática por uma glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER et al., 2005).

A enzima adenosina desaminase (ADA; E.C. 3.5.4.4) é parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação dos nucleotídeos e nucleosídeos da adenina (YEGUTKIN, 2008). Responsável por catalisar a desaminação

irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'- deoxinosina, respectivamente (RESTA et al., 1998; ROBSON et al., 2006). A ADA pode ser encontrada em praticamente todos os vertebrados. Nos humanos existe na forma de duas isoenzimas classificadas como ADA1 e ADA2, cada uma com suas particulares propriedades bioquímicas (SHAROYAN et al., 2006).

A regulação da concentração extracelular de adenosina, foi uma das primeiras funções fisiológicas atribuídas à ecto-ADA, logo após sua descoberta na membrana celular (FRANCO et al., 1997). A adenosina é liberada de células, dependendo da sua concentração intracelular ou ser proveniente da degradação do ATP extracelular devido à ação de ectonucleotidases.

O controle da sinalização adenosinérgica também pode ser exercido através da via de recuperação da adenosina através de transportadores de nucleosídeos, seguida por fosforilação à AMP pela adenosina quinase ou desaminação à inosina pela ADA citosólica (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004).

A adenosina é uma biomolécula que sinaliza processos endógenos regulando diversos processos tanto fisiológicos como patológicos (FREDHOLM et al., 2001). Este nucleosídeo é produzido em resposta a situações de estresse metabólico ou dano celular e altas concentrações de adenosina extracelular ocorrem em situações de isquemia, hipóxia inflamação e trauma (HASKÓ; CROSTEIN, 2004). As concentrações de adenosina extracelulares em situações hemostáticas ficam em níveis nanomolares (10 a 20 nM), já em situações de estresse tecidual ou hipóxia estes níveis são elevados a concentrações micromolares (10 a 100µM) (FREDHOLM et al., 2001).

Com isso, sabe-se que os processos fisiológicos cardiovasculares são controlados por uma complexa rede de sinalização celular. Entre os seus mensageiros menos compreendidos, estão os nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e o seu derivado nucleosídeo (adenosina). Como referido anteriormente, essas moléculas regulam diferentes mecanismos. Os níveis extracelulares de ATP, ADP e AMP são regulados, principalmente, pela sua hidrólise através de uma família de enzimas denominadas ectonucleotidases, já citadas anteriormente. Este conjunto, juntamente com os receptores purinérgicos (já relatados à cima), formam o sistema purinérgico, que é caracterizado por ser uma via de sinalização importante, desencadeando múltiplos efeitos celulares, incluindo resposta imune, inflamação, dor,

agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).

Em resumo, tendo em vista que a infecção pelo HIV pode desencadear quadros patológicos cardiovasculares e considerando a evidente participação das plaquetas e das purinas extracelulares em diferentes processos envolvidos na funcionalidade cardiovascular normal e que os distúrbios ou prejuízos na sinalização purinérgica podem estar relacionado ao desenvolvimento de patologias cardiovasculares. Torna-se fundamentalmente importante, considerar a manutenção da sinalização purinérgica, incluindo biomoléculas sinalizadoras e suas ectoenzimas de degradação, pois, este sistema de sinalização têm se mostrado alvo importante para o monitoramento e tratamento de doenças cardiovasculares e suas complicações. Diante do exposto, este trabalho tem como enfoque principal a avaliação do perfil de agregação plaquetária e a atividade das ectoenzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA em plaquetas de pacientes HIV positivos, além da análise de alguns marcadores de perfil lipídico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil lipídico, a agregação plaquetária e a atividade das ectoenzimas do sistema purinérgico em plaquetas de pacientes HIV positivos em tratamento com a terapia antirretroviral.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil da agregação plaquetária, utilizando ADP como agonista em pacientes HIV positivos (em tratamento antirretroviral) e indivíduos controle.
- Avaliar o perfil lipídico (Colesterol total; HDL; LDL e triglicerídeos) de pacientes HIV positivos (com e sem terapia antirretroviral) e indivíduos controle.
- Avaliar a atividade da E-NTPDase e da E-5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes HIV positivos (com e sem tratamento antirretroviral) e em indivíduos controle.
- Avaliar a atividade da E-ADA em plaquetas de pacientes HIV positivos (com e sem tratamento antirretroviral) e em indivíduos controle.

3. METODOLOGIA E RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um manuscrito. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O manuscrito está formatado de acordo com as normas para publicação da revista *Cell Biochemistry and Function*.

Manuscrito: **“EFFECT OF ANTIRETROVIRAL THERAPY IN TROMBORREGULATION THROUGH OF THE HYDROLYSIS OF ADENINE NUCLEOTIDES IN PLATELETS OF HIV PATIENTS”**.

3.1 MANUSCRITO

EFFECT OF ANTIRETROVIRAL THERAPY IN TROMBORREGULATION THROUGH OF THE HYDROLYSIS OF ADENINE NUCLEOTIDES IN PLATELETS OF HIV PATIENTS

João Felipe Peres Rezer ^a; Maria Luiza Thorstenberg ^a; Jader Betsh Ruchel^a, Tatiana Montagner Dalcin Bertoldo ^a; Viviane do Carmo Gonçalves Souza ^a; Daniela Zanini ^b; Karine Lanes da Silveira^a; Maria Rosa Chitolina Schetinger ^b; Daniela Bitencourt Rosa Leal ^a

^a *Departamento de Microbiologia e Parasitologia, 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.*

* *Corresponding author:*

Daniela Bitencourt Rosa Leal

Fax: + 55-55322-08242

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde,

Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 20, 97105-900.

Santa Maria, RS, Brazil

e-mail: daniela.leal@ufsm.br

Abstract: The HIV infection can cause biochemical and vascular. The highly active antiretroviral therapy (HAART) markedly reduced mortality and opportunistic diseases associated with AIDS. With the increased survival shaft engagement of cardiovascular disease. The platelets has on its surface ectoenzymes of the purinergic system including E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-ADA. The aim of this study was to evaluate the activity of these ectoenzymes in platelets of patients with HIV infection, linking them with the profile of platelet aggregation and cholesterol levels. Our results suggest that antiretroviral treatment of HIV and has a significant change, both in the activity of purinergic system ectoenzymes tromborregulation involved in the process. These data can support an increased cardiovascular risk situations this group of

patients and on the other hand a possible cardioprotective effect of extracellular adenosine, generated by the cascade of hydrolysis of adenine nucleotides.

Key Words: HIV, platelets aggregation, adenosine, ATP and antiretroviral therapy.

Introduction

Several studies have demonstrated the significant impact of non-AIDS-defining illnesses, such as cardiovascular disease, kidney disorders and liver disease and its comorbidities in the outcome of HIV infection. Cardiovascular disease had emerged as a major evidence of disease during the period of highly active antiretroviral therapy (HAART).^{1,2}

Cardiovascular complications in HIV-infected individuals include thrombotic microangiopathy, arterial disease, dilated cardiomyopathy, abnormal coronary artery pathology, and myocarditis.^{3,4,5,6} Macrovascular and microvascular disorders involve complications such as thrombosis and atherosclerosis, which can be accelerated by platelet activation.^{7,8} The increased platelet aggregation, as well as the release of vasoactive mediators are factors that contribute to the occlusion of the blood vessel function by reducing cardioprotective effect.⁹

The high concentration of adenine diphosphate (ADP) and calcium present in vascular obstruction, promote platelet recruitment to the blood vessel wall. The control of extracellular levels of adenosine and adenine nucleotides as well as the activation of purinergic receptors is critical in the maintenance of physiological processes including development of purinergic signaling, blood flow, secretion, inflammation and thromboregulation.¹⁰ The ectoenzymes E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-ADA act on the vascular system through the maintenance of hemostasis and thrombogenesis, especially for regulating platelet aggregation.¹¹

Platelets express distinct sets of these ectoenzymes as well as purinergic receptors, regulating the processes thromboembolic induced vascular injuries.¹² Whereas the immune response, inflammatory and vascular

triggered by HIV infection, signaling molecules are modulated by the purinergic system is highly relevant to evaluation of the activity of enzymes present on the platelet membrane. This study aimed to evaluate the activity of ectoenzymes E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-ADA in platelets, and to evaluate the profile of platelet aggregation in patients with HIV infection and also patients using HAART.

Material and Methods

Chemicals: The substrates adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), adenosine 5'- diphosphate sodium salt (ADP), 5'-monophosphate sodium salt (AMP), adenosine, as well as bovine serum albumin, Trizma base, HEPES and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals used in this experiment were of analytical grade and of the highest purity.

Patients and samples: Fifty patients with HIV who were taking HAART at the Federal university of Santa Maria hospital were included in the study. The group of patients in treatment (HAART HIV) showed a mean age of 35.68 ± 1.41 . The group of HIV-infected patients who were not taking antiretroviral therapy (HIV), 10 patients had a mean age of 29.53 ± 1.41 . The control group (control) consisted of 20 healthy subjects with a mean age of 27.93 ± 1.48 years old, and serology nonreactive for HIV. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The Human Ethics Committee of the Health Science Center, from Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 08163912.6.0000.5346, Brazil.

Platelet preparation: PRP was prepared by the method ¹³ modified by ¹⁴. Briefly, peripheral blood was collected in 0.129 M sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 160 g for 15 min. Afterwards, the PRP was centrifuged at 1,400 g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer.

Cellular integrity: The integrity of the platelet preparation was confirmed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity in intact and disrupted

platelets using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer). The procedure was repeated before and after the incubation period.

Protein determination: Protein was determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard.¹⁵

E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activity determination: The E-NTPDase enzymatic assay in platelets was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 µL as described by Pilla et al. For AMP hydrolysis, the E-5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, except that the 5 mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂. Twenty microliters of the isolated platelets (8-12 µg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was started by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1 mM, and AMP at a final concentration of 2 mM, and the time of incubation was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 µL of 10% TCA to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. The Pi released was measured.¹⁶ using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out to correct for nonenzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after 10% TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

E-ADA activity determination: E-ADA activity from platelets was determined based on the direct measurement of the formation of ammonia produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine.¹⁷ Briefly, 50 µL of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37°C for 60 min. Afterwards, the reaction was stopped by adding a solution of 106.2 nM phenol and 167.8 nM sodium nitroprussiate and a hypochlorite solution. The amount of ammonia produced was measured at 620 nm and the results were expressed in units per milligrams of proteins (U/mg of protein).

Quantitative determination of platelets: Total blood was collected in tubes containing 7.2 mg dipotassium EDTA as an anticoagulant and the quantitative

determination of platelets was performed by automated haematology analyzer (SYSMEX XT-1800i, Roche Diagnostic, USA).

Platelet aggregation: Platelet aggregation was measured by turbidimetric measurement¹⁸ with a Chrono-log optical aggregometer (AGGRO/LINK® Model 810-CA software for Windows version 5.1). The PRP was obtained by centrifugation of peripheral blood for 15 min at 160 g and the preparation of platelets poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation of the sample by 1,400 g for 30 min. After the calibration of the aggregometer, the data concerning the assays and reagents were entered on a computer coupled to the equipment, and the test of patient 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 5 µM and 7,5 µM, with PPP as a reference. Results were expressed as percentage of aggregation.

Metabolic characteristics: The cholesterol and total triglycerides were measured in serum by enzymatic method. HDL cholesterol in serum was measured by enzymatic colorimetric method. LDL cholesterol was analyzed by enzymatic colorimetric method by machine LABMAX PLENNO® (Labtest diagnostic SA).

Statistical analysis: Variables were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). The data obtained for the enzymatic activities in platelets from patients were analyzed statistically by ANOVA way via and *post hoc* Newman-Keuls. Differences were considered significant when the probability was $P < 0.05$.

Results

General characteristics and coagulation parameters: HIV patients (n=60), without antiretroviral treatment (n=10), with antiretroviral treatment (n=50) and control group (n=20). The average use of antiretroviral drugs were 7 years. Featuring chronic drug use. The platelet count is shown in table 1. These data show physiological values for human beings, since the normal values for adults is between 150.000 and 400.000 platelets / ml of blood and normal values.

PTT: Partial Thromboplastin time, PT: Prothrombin time.

Lipid profile: Table 3 shows the values of biochemical parameters (n; means \pm SEM). For total cholesterol found an increasing trend for the HIV HAART (n=50; 198.6 ± 11.35). The control group (n=20) had an average of 188.2 ± 6.88 and HIV group an average of 154.0 ± 1.79 . In evaluating the HDL cholesterol found a decrease in both HIV group (n=10; 34.70 ± 3.33) and in HIV-HAART group (n=50; 45.15 ± 2.67). The control group showed satisfactory levels (n=20; 55.95 ± 2.18). For LDL cholesterol increase was observed for HIV HAART group (n=50; 130.8 ± 8.11), since the HIV group and the control group showed satisfactory levels (n=10; 99.20 ± 8.74 and n=20; 72.50 ± 7.04 respectively). An increase in triglycerides in HIV HAART group was found (n=50; 164.2 ± 17.77). In the groups HIV and control satisfactory levels (n=10; 113.0 ± 12.91 and n=20; 79.45 ± 8.69 respectively). Amounts in ml/dL. LDL: *low-density lipoprotein*; HDL: *high-density lipoprotein*. Reference values according to Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Total cholesterol <200 ; LDL <100 ; HDL >60 ; Triglycerides <150).

Platelet aggregation: Figure 4 shows the results for platelet aggregation using as agonists ADP. As can be seen, there was an increase (81.1 ± 6.93) and (86.7 ± 6.37) of platelet aggregation HAART in HIV group with 5 μ M and 7,5 μ M concentrations of ADP, respectively when compared with the control group (n=20; 62.4 ± 2.44 (5 μ l) and 71.5 ± 2.78 (7.5 μ l) ($P < 0.05$, n = 10).

E-NTPDase activity: Figure 1 shows the results obtained for the activity of the E-NTDase by the hydrolysis of ATP (1A) and ADP (1B). As can be seen no change in ATP hydrolysis in the control group (n=20; 13.36 ± 0.54) when compared with HIV HAART (n=50; 14.5 ± 0.49) group ($P > 0.05$). Already the HIV group (n=10; 19.8 ± 1.43) showed an increase of 49% in ATP hydrolysis when compared with the control group (n=20; 13.3 ± 0.54) ($P < 0.0002$).

For hydrolysis of ADP was observed a decrease of 39% in HIV HAART group (n=50; 7.31 ± 0.36) compared with the control group (n=20; 11.90 ± 0.43) ($P < 0.05$). Regarding the HIV group and the control group increased by 32% (P

<0.05). The HIV group compared with the group HIV-HAART increased 1.2 times for hydrolysis of ADP ($P < 0.0001$).

Ecto-5'-nucleotidase activity: Figure 2 shows the enzymatic hydrolysis of AMP and 5'-nucleotidase which increased by 53% ($P < 0.0001$) in the HIV group ($n=10$; 6.20 ± 0.45) compared with the control group ($n=20$; 4.04 ± 0.21). Between the control group ($n=20$; 4.04 ± 0.21) and HIV HAART ($n=10$; 3.36 ± 0.15) there was no difference ($P > 0,05$).

E-ADA activity: E-ADA activity of platelets is shown in Fig. 3. The results showed a 49.63% reduction in the activity of E-ADA in HIV HAART group ($n=50$; 3.40 ± 0.87) compared to the control group ($n=20$; 6.75 ± 0.70). And a 34.83% reduction in the activity of E-ADA when comparing the control group ($n=20$; 6.75 ± 0.70) to group HIV ($n=10$; 4.40 ± 0.52) ($0 < 0.05$). No significant difference between groups HIV HAART and HIV ($P > 0.05$).

Cellular integrity: As demonstrated in Table 2, the measurement of LDH activity showed that approximately 4% of the platelets were disrupted indicating that the preparation was predominantly intact after isolation procedure.

DISCUSSION

HIV-infected patients have persistent inflammatory conditions, the establishment of the activation of immunity and inflammation involving several mechanisms that are directly or indirectly related to viral replication.¹⁹ Moreover, actually many studies have demonstrated that HIV infection may favor a procoagulant state, which contributes to the development of cardiovascular diseases.¹ Furthermore, recent results confirm that HIV viremia is a significant predictor of acute myocardial infarction, regardless of CD4 + cell count.²¹ In this context there is the participation of both platelets on cardiovascular events and responses to inflammatory processes, since no activation current of such structures under these conditions.²² At this point, highlightp the importance of adenine nucleotides ATP, ADP and AMP and its respective nucleoside adenosine in immune process and tromboregulatory. These nucleotides can be released into the circulation by various structures, including the platelets, where

they can modulate the vascular response, since they act as agonists and antagonists of platelet aggregation. The effects of these molecules are mediated by cell surface receptors and their extracellular concentrations are regulated by purinergic system of ectoenzymes, which includes E-NTPDase, E-5'-nucleotidase, E-ADA among others.

Some studies report that the activity of vascular functions E-NTPDase (thromboregulation and vascular permeability) are probably correlated with high hydrolytic activity on endothelial cells and vascular smooth muscle.^{23,24} In this study, changes were observed in the E-NTPDase activity in platelets of HIV patients who were receiving HAART and who did not use this therapy. It was found that the hydrolysis of ATP and ADP are increased in HIV-infected individuals who do not antiretroviral therapy, suggesting low levels of extracellular ATP and ADP. It is worth noting that during metabolic stress situations the release of intracellular ATP, followed by catabolism of this nucleotide is the most important source for the increase in the levels of extracellular adenosine. It is known that ADP interacts with P2Y on platelets and induces platelet aggregation, thus contributing to the normal hemostasis. ATP can now react with P2X preventing this mechanism.²⁵ Regarding the E-NTPDase activity for patients on HAART, there was a decrease in the activity of this enzyme for the hydrolysis of ADP, whereas there was no change in activity for the hydrolysis of ATP. By analyzing these results suggest that the extracellular levels of ADP are elevated in these patients, which would favor the occurrence of thrombotic processes, given that ADP is a strong platelet agonist. In view of that this assumption can be confirmed by increased platelet aggregation viewed in these patients by testing using ADP agonist.

Regarding the activity of E-5'-nucleotidase and in HIV patients who do not make use of antiretroviral therapy, there was a high activity of this enzyme, suggesting that extracellular adenosine levels are increased in these patients, even when one observes that this group of patients showed a decrease in the activity of E-ADA compared to the control group. In this context it is worth mentioning the anti-inflammatory and immunosuppressive effect of the adenosine.^{26,27} Low concentrations of ATP and high concentrations of adenosine into the extracellular medium, exerted by ectoenzymes, induce an

anti-inflammatory response, by neutralizing the stimulation of the immune response mediated by ATP via immunosuppressive effects of adenosine in patients infected with HIV that do not use HAART. When looking at the group of patients treated with HAART, there were no changes in the activity of E-5'-nucleotidase in the control group, however there was a decrease in the activity of E-ADA in patients, which may suggest an increase in extracellular adenosine levels in this group. Although adenosine vasodilatory functions exist, in our study these effects may not have been viewed because platelet aggregation in these patients was increased. However, the increased platelet aggregation is due to high concentrations of ADP induced release of constituents of the granules and prostaglandin synthesis, yielding a characteristic biphasic response with irreversible aggregation.²⁸

It is also known that drugs that comprise HAART work by blocking the action of enzymes that are essential for virus replication and function. The drugs should be used in combinations standard (usually a combination of three drugs).²⁹ An interplay between traditional risk factors in a high risk predominantly male population together with the effect of the long term use of HAART in inducing a metabolic syndrome is leading to a premature and aggressive coronary artery disease phenotype not previously antiretroviral. AIDS patients, now make use of antiretroviral therapy, then our results to hydrolysis of ADP by the enzyme E-NTPDase is expected since the group that makes use of antiretroviral therapy may have increased levels of extracellular ADP, suggesting that the ADP in these patients is a compensatory mechanism of the organism to reverse the deficiency of platelet functions not only due to thrombocytopenias, but also, as is known, protease inhibitors have been associated with increased and severity of bleeding in hemophilia patients with parameters typically normal clotting factor VIII and ineffective to stop bleeding.³⁰ Apart from thrombocytopenia it is known that the effectiveness of HAART in HIV-infected patients live longer and thus have increased prevalence of cardiovascular disease in this population.^{31,32,33} Therefore, there is a protective function of adenosine, which is manifested by coronary vasodilation and collateral vessels, increasing the oxygen supply to the tissues.^{34,35} The high concentrations of extracellular adenosine, resulting from the activity of

ectoenzymes found in this study in platelets could also be responsible for cardioprotective and vasodilatory effects, preventing and/or controlling the development of severe cardiovascular diseases. Supporting these results, known to, in both treated and untreated HIV-infected patients the incidence of arterial thrombosis is increased 2 to 6 fold compared to a healthy population of the same age, while the risk of venous thromboembolism is 2 to 10 fold higher.^{36,37} The current incidence of coronary artery disease in HIV-infected population is at least three times greater than the general population³⁸, suggesting that HIV is an independent risk factor for vascular disease. In addition to these findings our results also show an increase in platelet aggregation in patients infected with HIV. Excessive platelet aggregation can occur in the vasculature damaged as a consequence of the inflammatory process triggered by viral infection or by treatment with HAART.

The action of ectoenzymes the purinergic system is one of the most important factors involved in the modulation of extracellular concentrations of the nucleotide / nucleoside and thus the effect on different platelet receptors.³⁹ In this scenario, the coordinated activity of E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-ADA tends to rapidly hydrolyze extracellular ATP / ADP / AMP with its generation of adenosine, which represents the main effector system for completion responses to pro-inflammatory and pro-thrombotic cardiovascular system.^{10,11,40} The E-ADA activity decreased in all groups HIV and HIV HAART promotes an increase in extracellular levels of adenosine. Although we found increased platelet aggregation and increase in cholesterol LDL cholesterol and triglycerides, and a tendency to decrease in HDL cholesterol among HIV HAART, these data reveal an increased risk of cardiovascular disease. Thus the activity of E-ADA may be contributing to its cardioprotective and vasodilatory effects of adenosine. From the foregoing we can recognize that the platelets and adenine nucleotide and nucleoside can play a important role in cardiovascular disease in HIV-infected patients. Once, several physiological responses vascular involve release of adenine nucleotides, which act on platelet activation. The surface of purinergic receptors expressed platelet type 2 (P2) named P2Y receptors (G protein-coupled) and P2X (linked to ion channels), activated by ADP and ATP, respectively⁴⁰, thus making the

hydrolysis of nucleotides factor important in regulating the hemostatic process. Studies of enzymes E-NTPDase, E-5'-ectonucleotidase and E-ADA demonstrated that these enzymes are involved in the mechanism in various thromboregulation pathologies⁴¹, for example, and also in various sclerosis⁴² Chagas disease.⁴³ In summary, this study is known that HIV infection and its treatment with HAART lead to biochemical changes involving the regulation of thrombotic events. These changes can be observed through the alterations in the activities of platelets ectoenzymes E-NTPDase, E-5'-nucleotidase, E-ADA and profile of platelet aggregation in these patients, lipid profile observed in patients treated reveals a relationship with purinergic cascade. This fact could explain, at least in part, how the body reacts to develop vascular complications that have been observed in patients with HIV positive.

Our results show that there was no change in the activity of NTPDase for ATP hydrolysis or in the activity of 5'-nucleotidase for AMP hydrolysis in patients on antiretroviral therapy, this fact indicates that antiretroviral therapy keeps the hydrolysis of adenine nucleotides equal those of control patients. Corroborating these data, a study evaluated the activity of NTPDase in human peripheral lymphocytes, which was not altered by anti-HIV therapy.⁴⁴

In conclusion, the use of antiretroviral therapy in to HIV infection, may result in an increased risk of cardiovascular disease by changing the profile of platelet aggregation and blood lipids. In addition, the purinergic system ectoenzymes revealed a major role in the hydrolysis of nucleosides and nucleotides of adenine, which interferes with the signaling cells to stimulate the coagulation parameter changes and thus attenuate the effects of platelet procoagulant observed in these patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; FIPE/UFSM and CAPES.

REFERENCES

1. Kuller LH, Tracy R, Bellosso W, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PloS Med.* 2008; **5**(10): 203.
2. Palella FJ, Phair JP. Cardiovascular disease in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;**6**(4): 266-271.
3. Blanchard DG, Hagenhoff C, Chow LC, Mccann HA, Dittrich HC. Reversibility of cardiac abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals: a serial echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol.* 1991;**17**(6): 1270-1276.
4. De castro S, D'amati G, Gallo P, et al. Frequency of development of acute global left ventricular dysfunction in human immunodeficiency virus infection. *J Am Coll Cardiol.* 1994;**24**(4):1018- 1024.
5. Barbaro G, Di lorenzo G, Grisorio B, Barbarini G. Incidence of dilated cardiomyopathy and detection of HIV in myocardial cells of HIV-positive patients. Gruppo Italiano per lo Studio Cardiologico dei Pazienti Affetti da AIDS. *N Engl J Med.* 1998; **339**(16):1093-1099.
6. Butt AA, Chang CC, Kuller L, et al. Risk of heart failure with human immunodeficiency virus in the absence of prior diagnosis of coronary heart disease. *Arch Intern Med.* 2011;**171**(8):737-743.
7. Wajchenberg, B.L. Disfunção endothelial no diabetes do tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2002; **46**.
8. Brydon, L. et al. Platelets, coronary heart disease, and stress. *Brain, Behav Immun.* 2006; **20**: 113-119.
9. Dockrell MEC, Walker BR; Noon JP; Watt GCM; Williams BC; Webb DJ. Platelet aggregation in young men with contrasting predisposition to high blood pressure. *American Journal of Hypertension*, 1999; **12**: 115-119.
10. Robson, S.C.; Sévigny, J.; Zimmermann, H. The NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationship and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*, 2006; **2**: 409-430.

11. Yegutkin G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochim Biophys Acta*; 2008. **1783**:673–694.
12. Fürsternau C, Trentin DDA S, Barreto-chaves ML, Sarkis JJ. 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.
13. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJF. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets* 1996; **7**: 225-230.
14. Lunkes IG, Lunkes D, Stefanello F, Morch A, Morch MV, Mazzantti MC, Schetinger MCR. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research* 2003; **109**: 189-194.
15. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; **72**: 248-54.
16. Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; **157**: 375-80.
17. Giusti G, Galanti B. Colorimetric Method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim 1984; 315-323.
18. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; **95**: 168-78.
19. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature* 2002; **417**:95–98.
20. Friis-moller N, Reiss P, Sabin CA, Weber R, Monforte A, El-sadr W, et al. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2007 **356**(17): 1723-1735.
21. Triant VA, Regan S, Lee H, Sax PE, Meigs JB, Grinspoon SK. Association of Immunologic and Virologic Factors With Myocardial Infarction Rates in a US Healthcare System. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2010; **55**(5):615-619.

22. Massberg, S.; Brand, K.; Grüner, S.; Page, S.; Müller, E.; Müller, I.; Bergmeier, W.; Richter, T.; Lorenz, M.; Konrad, I.; Nieswandt, B.; Gawaz, M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of Experimental Medicine*, 2002; **196**: 887-896.
23. Gordon EL, Pearson JD, Dickinson ES, Moreau D, Slakey LL. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. Regulation of adenosine production at the cell surface. *J Biol Chem* 1989; **264**:18986-95.
24. Kauffenstein G, Drouin A, Thorin-trescases N, Bachelard H, Robaye B, D'orléans-juste P, Marceau F, Thorin E, Sévigny J. NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. *Cardiovasc Res*; 2010.
25. Stafford, N. P. et al. Mechanisms involved in Adenosine Triphosphate-induced platelet aggregation in whole blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003; **23**:1928 – 1933.
26. Stikovsky MV, Phta A. The 'danger' sensor that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors. *Trends Immunol*; 2005; **26**:299-304.
27. Haskó G, Pacher P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J. Leukoc. Biol.*; 2008; **83**:447-455.
28. Rumbaut, R. E.; Thiagarajan, P. Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. 2010 Morgan & Claypool Life Sciences, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53450. acesso em: 27 mar. 2013.
29. Brazil. Ministério da Saúde. Portal sobre AIDS, doenças sexualmente transmissíveis e hepatites virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/>. Acesso em 17/09/2012.
30. Hollmig, K. A.; Beck, S. B.; Doll, D. C. Severe bleeding complications in V-positive haemophiliac patients treated with protease inhibitors. *Eur J Med Res*; 2001; **6**: 112-114.
31. Mangili A, Gerrior J, Tang AM, et al. Risk of cardiovascular disease in a cohort of HIV-infected adults: a study using carotid intima-media thickness and coronary artery calcium score. *Clin Infect Dis*. 2006;**43**(11):1482-1489.

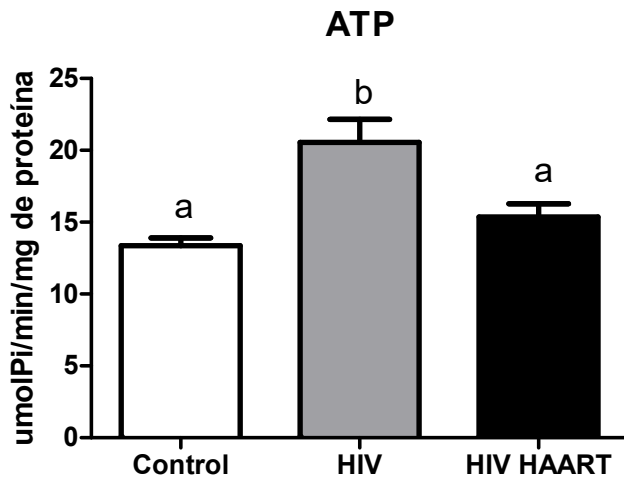
32. Kaplan RC, Kingsley LA, Gange SJ, et al. Low CD4T-cell count as a major atherosclerosis risk factor in HIV-infected women and men. *AIDS*. 2008;**22**(13):1615-1624.
33. Periard D, Cavassini M, Taffe P, et al. High prevalence of peripheral arterial disease in HIVinfected persons. *Clin Infect Dis*. 2008;**46**(5):761-767.
34. Haskó, G.; Cronstein, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, 2004; **25**: 33-39.
35. Kinugawa, T.; Fujita, M.; Ogino, K.; Kato, M.; Osaki, S.; Igawa, O.; Shigemasa, C.; Hisatome, I.; Kitakaze, M. Catabolism of adenine nucleotides favors adenosine production following exercise in patients with chronic heart failure. *Journal Cardiac Failure*, 2006;**12**: 720-725.
36. Micieli E, Dentali F, Giola M, et al. Venous and arterial thrombosis in patients with HIV infection. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 2007;**18**:259-63.
37. Crum-cianflone NF, Weekes J and Bavaro M. Review: nirtretro among HIV-infected patients during the highly active antiretroviral therapy era. *AIDS Patient Care STDs*. 2008;**22**:771-8.
38. Vittecoq D, Escaut L, Chironi G, Teicher E, Monsuez JJ, Andrejak M, et al. Coronary heart disease in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral treatment era. *AIDS*, 2003; **1**: S70-76.
39. Atkinson B, Dwyer K, Enyoji K, Robson R. Ectonucleotidases of the CD39/NTPDase family and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*, 2006; **36**:217–222.
40. Gachet, C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thrombosis Haemostasis*, 2008; **99** 466-472.
41. Schetinger, M. R. C. et al. NTPDase and 5-nucleotidase activities in physiological and disease conditions. New perspectives for human health. *BioFactors*, 2007; **2**: 77- 98.
42. Spanevello, R. M. et al. Activities of the enzymes that hidroyzes adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patient. *Journal of Neurology*, 2010; **257**: 24-30.
43. Souza VCG, Schlemmer KB, Noal CB, Jaques JA, Bagatini M, Pimentel V, Leal CAM, Fleck J, Moretto MB, Shetinger MRC, Leal DBR. Purinergic system ectoenzymes participate in the thromboregulation of patients with

indeterminate form of chagas' disease. *Purinergic Signal*. 2012 ;**8**(4):753-62.

44. Leal DB, Schetinger MR, Leal CA, Bertoncheli Cde M, Morsch VM. NTPDase activity in human lymphocytes is not affected by therapeutic doses of anti-HIV drugs; 2011; **65**(8):594-6.

Figure 1

A



B

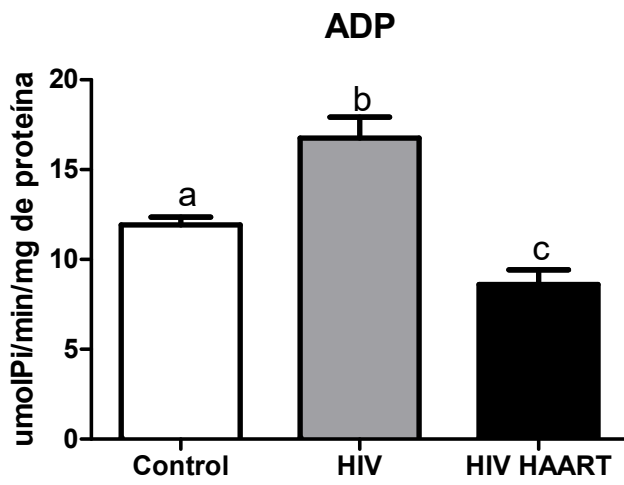


Figure 2

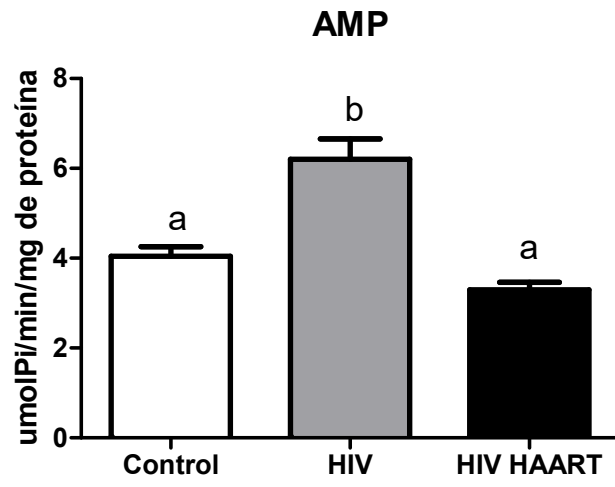


Figure 3

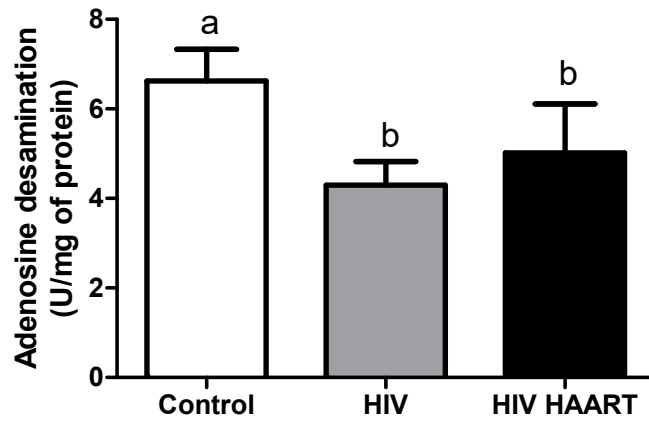


Figure 4

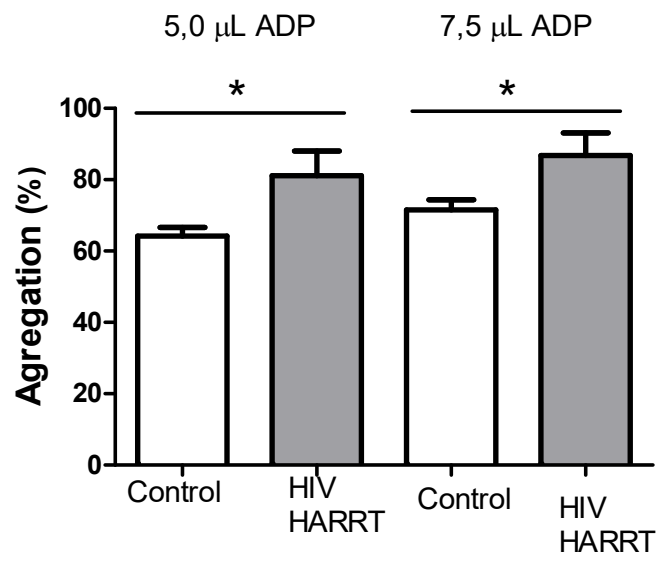


Table 1

General characteristics and coagulation parameters from HIV patients (n= 60) and control group (n=20).			
Variable	HIV HAART n=50	HIV n=10	Control n=20
Age (years)	35.6 ± 1.4	29.5 ± 1.4	27.9 ± 1.4
Platelets (x10 ³ /μL)	172.8 ± 14.5	226.7 ± 9.1	267.7 ± 10.1
PT (s)	9.4 ± 1.7	10.74 ± 0.3	11.6 ± 0.2
PTT (s)	28.6 ± 2.2	27.8 ± 1.3	28.3 ± 0.9

^a Continuous variables are shown as means ± SEM. PTT: Partial Thromboplastin time, PT: Prothrombin time.

Table 2

Evaluation of cellular integrity on platelet preparation			
Variable	HIV HAART	HIV	Control group
Platelets (x10 ⁷ /mL)	11.3 ± 1.6 (5)	15.6 ± 2.2 (5)	15.6 ± 2.2 (5)
LDH (intact platelets) ^b	228.9 ± 36.0 (5)	175.6 ± 39.8 (5)	178.3 ± 39.8 (5)
LDH (lysed platelets) ^b	4923.0 ± 861.0 (5)	3610.0 ± 354.9 (5)	3609.0 ± 355.1 (5)

^a Results are presents as means ± SEM with the number of experiments given in parenthesis.

^b LDH activity is expressed as U/L. Cholesterol In Adults (Total cholesterol <200; LDL<100; HDL>60; Triglycerides<150).

Table 3

Metabolic Characteristics	Control (n=20)	HIV (n=10)	HIV HAART (n=50)
Cholesterol Total	188.2± 6.88	154.0± 1.79	198.6±11.35
HDL	55.95±2.18	34.70±3.33	45.15±2.67
LDL	72.50±7.04	99.20±8.74	130.8±8.11
Tryglycerides	79.45±8.69	113.0±12.91	164.2±17.77

Amounts in ml/dL. LDL: *low-density lipoprotein*; HDL: *high-density lipoprotein*. Reference values according to Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III, 2001).

4. CONCLUSÃO

- O aumento do colesterol LDL e dos triglicerídeos no grupo de pacientes HIV em tratamento antirretroviral, sugerem um aumento do risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares.
- O perfil de agregação plaquetária mostrou-se aumentado no grupo de pacientes HIV em tratamento com terapia antirretroviral.
- A infecção pelo HIV e o uso da terapia antirretroviral foram capazes de alterar a atividade da E-NTPDase, tanto para a hidrólise do ATP quanto do ADP nas plaquetas dos pacientes quando comparadas sua atividade com o grupo controle. Estes resultados sugerem que a cascata purinérgica esta agindo para a formação do nucleosídeo adenosina.
- A atividade da E-NTPDase para hidrólise do ATP e a atividade da E-5'-nucleotidase para a hidrólise do AMP não foi alterada no grupo de pacientes sob uso de terapia antirretroviral. Estes dados sugerem que a terapia antirretroviral é capaz de manter os níveis de ATP e AMP em condições fisiológicas.
- A atividade da E-ADA nas plaquetas de pacientes HIV e em tratamento antirretroviral, mostrou-se significativamente diminuída em relação aos pacientes controles. Isto sugere que as concentrações de adenosina poderiam estar elevadas. Fato que pode estar ocorrendo para que a adenosina exerça seus efeitos vasodilatadores e cardioprotetores, diante de risco cardiovascular nos pacientes que fazem uso de terapia antirretroviral ou exerça seus antiinflamatórios no grupo que não faz uso de terapia.
- Em conjunto, estes resultados são muito importantes do ponto de vista clínico, uma vez que, sugerem que o tratamento antirretroviral exerce

uma importante alteração, tanto na atividade das ectoenzimas do sistema purinérgico, quanto no perfil de agregação plaquetária e nos níveis séricos de colesterol dos pacientes HIV positivos durante o tratamento com terapia antirretroviral. Os parâmetros relatados neste estudo podem ser úteis na identificação do risco cardiovascular e no monitoramento da patologia e a evolução do tratamento antirretroviral no seu uso crônico.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHONKHAI AA, GEBO KA, STREIFF MB, *et al.* Venous thromboembolism in patients with HIV/AIDS. A case control study. **J Acquir Immune Defic Syndr.** v.48: p.310-314, 2008.
- ALAEI K, ALAEI A, MANSOORI D. Thrombocytopenia in HIV-infected patients. **East Mediterr Health J.** v. 8, p.758-64,2002.
- ALVES-FERREIRA, M.; DUTRA, P.M.; LOPES, A.H.; FERREIRA-PEREIRA, A.; SCOFANO, H.M.; MEYER-FERNANDES, J.R. Magnesium-dependent ecto-ATP diphosphohydrolase activity in *Herpetomonas muscarum muscarum*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 265-271, 2003.
- ANDERSON DW, VIRMANI R. Emerging patterns of heart disease in human immunodeficiency virus infection. **Hum Pathol**, v.21: p.253-259, 1990.
- APOSTOLOVA N; GARCIA, A. B, ESPLUGUES. Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: mechanisms beyond Pol- γ inhibition. **Trends in pharmacological sciences.** v. 32: p.715-725, 2011.
- ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S.C. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells & Mol Diseases**, v. 36, p. 217-222, 2006.
- BAIN BJ. The haematological features of HIV infection. **Br J Haematol**; v.99, p. 1-8, 1997.
- BARBARO G, BARBARINI G, PELLICELLI AM. HIV-associated coronary arteritis in a patient with fatal myocardial infarction. **N Engl J Med**; v. 344, p.1799-800, 2001.
- BARBARO G. Metabolic and cardiovascular complications of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. **Curr HIV Res.** 2006, 4: 79-85.
- BARSOTTI, C.; IPATA, P.L. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 2214-2225, 2004.
- BAKKER, W. W. *et al.* Platelets and ectonucleotidases. **Platelets**, v. 5, p. 121-129, 1994.
- BAKER JV, HENRY K, NEATON JD. The consequences of HIV infection and antiretroviral therapy use for cardiovascular disease risk: shifting paradigms. **Curr Opin HIV AIDS.** 2009; 4:176-82.

BARTLETT JG AND MOORE R. A comprehensive plan for managed care of patients infected with human immunodeficiency virus. ***Clin. Infect. Dis.*** 29(1):50-55, 1999.

BENREZZAK, O.; GRONDIN, G.; SÉVIGNY, J.; GENDRON, F.P.; ROUSSEAU, E.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; BEAUDOIN, A.R. Identification and immunolocalization of two isoforms of ATP-diphosphohydrolase (ATPDase) in the pig immune system. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, v. 370, p. 314-322, 1999.

BEHRENS G, DEJAM A, SCHMIDT H, BALKS H, BRABANT G, KORNER T, et al. Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. ***AIDS*** 1999, 13:63–70.

BERRÊDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C.E.; CHRISPIM, P.P.; BELMONT-FIRPO, R.; LEMOS, A.P.; MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M.A.; MEYER-FERNANDES, J.R. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, v. 391, p. 16-24, 2001.

BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. ***Verlag Chemie***, Deerfield Beach, 1983.

BIERLING, P., BETTAIEB, A., AND OKSENHENDLER, E. Human immunodeficiency virus-related immune thrombocytopenia. ***Semin. Thrombosis Hemostasis***, v. 21, p. 68–75, 1995.

BIRCK, A. et al. Role of extracellular atp metabolism in regulation of platelet reactivity. ***Journal of laboratory and clinical medicine***, v. 140, p. 166-175, 2002.

BITHELL TC. The physiology of primary hemostasis. In: ***Clinical Hematology***, Winstrobe's. 19^a edition, Lea & Febing ed., p. 539 – 556. 1993.

BODIN P, BURNSTOCK G. Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. ***J. Cardiovasc. Pharmacol.***, 38 (2001), pp. 900–908

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

BORN GVR, CROSS MJ. The aggregation of blood platelets. ***J Physiol***; 95: 168-78, 1963.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal sobre AIDS, doenças sexualmente transmissíveis e hepatites virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/>. Acesso em 17/09/2012.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacol. Rev.**, 24 (1972), pp. 509–581

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol. Life Sci.** V. 64, n. 12, p. 1471- 1483; 2007.

CALZA L, MANFREDI R, CHIODO F. Statins and fibrates for the treatment of hyperlipidaemia in HIV-infected patients receiving HAART. **AIDS** 2003, 17:851–859.

CASTRO CH; FERREIRA BL; NAGASHIMA T; et al. Platelets: still a therapeutic target. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol.42 no.5 Rio de Janeiro Oct. 2006

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pneumocystis pneumonia. Los Angeles, 1981. Disponível em <http://www.cdc.gov/preview/mmwrhtml/june_5.htm> Acesso em 23 de janeiro de 2013.

CLAUSS, A. Acta Haematol. V.17, p. 237, 1957

CHIU, I. M. et al. Nucleotide-sequence evidence for relationship of aids retrovirus to lentiviruses. **Nature**, v. 317, n. 6035, p. 366-368, 1985.

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

CRUM- CIANFLONE NF, WEEKWS J, BAVARO M. Thromboses among HIV-infected patients during the highly active antiretroviral therapy era. **AIDS Patient Care STDS** 2008 ; 22 (10): 771 - 778 .

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, p. 107-25, 2001.

DAVIE EW, FUJIKAWA K, KISIEL W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**. 1991; 30:10363-9

De JESUS, J.B.; DE SÁ PINHEIRO, A.A.; LOPES, A.H.; MEYER-FERNANDES, J.R. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. **Zeitschrift Für Naturforschung C, Journal of Biosciences**, v. 57, p. 890-896, 2002.

DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS/SVS/MS. BRASÍLIA . DEZEMBRO 2012. Aids no Brasil. Acesso em 22 de maio de 2013. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/page/2010/36364/aids_no_brasil_2012_17137.pdf

DING, Y.; CESARE, P.; DREW, L.; NIKITAKI, D.; WOOD, J.N. ATP, P2X receptors and pain pathways. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81, p. 289-294, 2000

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, n.3, p.587-600, 2001.

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

ELEOPULOS, E.P.; *et al.* A critique of the Montagnier evidence for the HIV/AIDS hypothesis. **Medical Hypotheses**. v. 63: p. 597-601, 2004.

FAUCI, A . The AIDS epidemic. Considerations for the 21^a century. **N.Engl. J. Med.** V. 341, p. 1046-1050, 1999.

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

FEFFER SE, FOX RL, ORSEN MM, *et al.* Thrombotic tendencies and correlation with clinical status in patients infected with HIV. **South Med J**. v. 88, p.1126-1130, 1995.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R.E.; AGUI, T.; SITKOVSKY, M.V. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 334-340, 1990.

FOWKES FJ, PRICE JF, FOWKES FG. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: a system review. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 25, p.1-5, 2003.

FUNDERBURG NT, MAYNE E, SIEG SF, *et al.* Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationsh to in vivo coagulation and immune activation. **Blood** 2010 ; 115 (2): 161 - 167 .

- FURIE B, FURIE BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*.1988; 53:505-518.
- GACHET C, HECHLER B. The platelet P2 receptors in thrombosis. *Sem Thromb Hemost* 31: 162 – 167, 2005.
- GODING, J.W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 67, p. 285-311, 2000.
- GORDON, E.L.; PEARSON, J.D.; DICKINSON, E.S.; MOREAU, D.; SLAKEY, L.L. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. Regulation of adenosine production at the cell surface. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 264, p. 18986-95, 1989.
- GOTTLIEB, M.; DWYER, D.M. Evidence for distinct 5'- and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 7, p. 303-307, 1983.
- GRINSPOON S, CARR A. Cardiovascular risk and body fat abnormalities in HIV infected adults. *N Engl J Med*. 2005; 352: 48-62.
- HASSELL KL, KRESSIN DC, NEUMANN A, *et al*. Correlation of antiphospholipid antibodies and protein S deficiency with thrombosis in HIV-infected men. *Blood Coagul Fibrinolysis*, v. 5, p.455-462, 1994.
- HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, v. 25, p. 33-39, 2004.
- HOGG RS, O'SHAUGHNESSY MV, GATARAC N, *et al*. Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals (letter). *Lancet*, v. 349, p.1294, 1997.
- HOLLMIG, K. A.; BECK, S. B.; DOLL, D. C. Severe bleeding complications in V-positive haemophiliac patients treated with protease inhibitors. *Eur J Med Res*, v. 6, n. 3, p. 112-114, 2001.
- HOLME PA, MULLER F, SOLUM NO, *et al*. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FASEB*, v.12, p. 79-89, 1998.
- HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; STILLWAGGON, E.; BENTWICH, Z.; KUMARESAN, J. Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. *Lancet*, v. 368, p. 1865-1866, 2006.
- IRIBARREN JA, MIRALLES R, BARAIA J & DIEZ F. Tratamiento en situaciones especiales: infección aguda, embarazo, aféccion del sistema nervioso central, trombocitopenia, exposición accidental. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, V.14, p.36-41, 1996.

KACSMARECK, E.; KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; SIEGEL, J.B.; ANRATHER, J.; BEAUDOIN, A.R.; BACH, F.H.; ROBSON, S.C. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33116-33122, 1996.

KARON JM, BUEHLER JW, BYERS RH, FARIZO KM, GREEN TA, HANSON DL, ROSENBLUM LS, GAIL MH, ROSENBERG PS, BROOKMEYER R. Projections of the number of persons diagnosed with AIDS and the number of immunosuppressed HIV-infected persons- United States, 1992-1994. **MMWR Recomm Rep** 41(RR-18): 1-29, 1992.

KEELE B. F. et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 523-526, 2006.

KLEIN SK, SLIM EJ, DE KRUIF MD, *et al.* Is chronic HIV infection associated with venous thrombotic disease? A systemic review. **Neth J Med**, v.63, p. 129-136, 2005.

KLIMAS, N.; KONERU, A. O.; FLETCHER, M. A. Overview of HIV. **Psychosom Med**, v. 70, n. 5, p. 523-30, 2008.

KUBY TK. 2007. Immunology. **Freeman and Company**, New York. Fig. 20.9a

KULLER LH, TRACY R, BELLOSO W, WIT S, F DRUMMOND, LANE HC, LEDERGERBER B, LUNDGREN J, J NEUHAUS, NIXON D, PATON NI, NEATON JD. Biomarcadores inflamatórios e de coagulação e mortalidade em pacientes com infecção pelo HIV **PLoS Med**, 2008.

KURANO M, TSUKAMOTO K. Etiology of atherosclerosis- special reference to bacterial infection and viral infection. **Nihon Rinsho**, v.69, p. 25-29, 2011.

LAING RB, BRETTLE RP, LEEN CL. Venous thrombosis in HIV infection. **Int J STD AIDS**, v. 7, p. 82-85, 1996.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 463-484, 2001.

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

LEINONEM M, SAIKKU P. Infections and atherosclerosis. **Scand Cardiovasc J**, v. 34, p. 12-20, 2000.

LIJFERING WM, SPRENGER HG, GEORG RR, *et al.* Relationship between progression to AIDS and thrombophilic abnormalities in HIV infection. **Clin Chem**, v. 54, p. 1226-1233, 2008.

- LLANOS, B. Nuevas perspectivas en el tratamiento antitrombótico. **Información Terapéutica del sistema Nacional de Salud**, v. 25, n. 4, p. 93-104, 2001.
- LOUW S, JACOBSON BF, BULLER H. Human immunodeficiency virus infection and acute deep vein thrombosis. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 14, p. 352- 355, 2008.
- LUTHJE J, OGILVIE A. The presence of diadenosine 5'5''- p1,p3- triphosphate (Ap3A) in human platelets. **Biochem Biophys Res Com** 115: 235 – 260, 1983.
- MALISZEWSKI, C.R.; DELESPESE, G.J.; SCHOENBORN, M.A.; ARMITAGE, R.J.; FANSLAW, W.C.; NAKAJIMA, T.; BAKER, E.; SUTHERLAND, G.R.; MANN KG. Biochemistry and pathology of blood coagulation. **Thromb Haemost.** 82:165-74, 1999.
- MARCUS, M.J. BROEKMAN, J.H. DROSOPOULOS, N. ISLAM, D.J. PINSKY, C. SESTI, R. LEVI. Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **J. Thromb. Haemost.**, 1 (2003), pp. 2497–2509.
- MARCUS, A. J. et al. Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD 39/ecto-ADPase: Significance for occlusive vascular diseases. **Italian Heart Journal**, v. 2, p. 824-830, 2001.
- MARCUS, A.J. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.31, n.2, p.234- 246, 2005.
- MARINS JRP, JAMAL LF, CHEN SY, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. **AIDS**, v.17, p. 1675-1682, 2003.
- MAZZA JJ. Manual of Clinical Hematology. 3ª ed. Espanha: Marban; 2004.
- MINAMINO, T.; KITAKAZE, M.; MORIOKA, T.; NODE, K.; KOMAMURA, K.; TAKEDA, H.; INOUE, M.; HORI, M.; KAMADA, T. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. 238–244, 1996.
- MOCROFT A, REISS P, GASIOROWSKI J, LEDERGERBER B, KOWALSKA JD, CHIESI A, GATELL J, RAKHMANOVA A, JOHNSON MA, KIRK O, JD L. Serious fatal and non fatal non-AIDS defining illnesses in Europe. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 55, p.262–270, 2010.
- MORRIS L, DISTENFELD A, AMOROSI E, KARPATKIN S. púrpura trombocitopênica auto-imune em homens homossexuais. **Ann Intern Med**; 96:714, 1982.

MULLIGAN K, GRUNFELD C, TAI VW, ALGREN H, PANG M, CHERNOFF DN, et al. Hyperlipidemia and insulin resistance are induced by protease inhibitors independent of changes in body composition in patients with HIV infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2000; 23: 35-43.

NISOLE, S., A. SAIB. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**, v.1, p. 9, 2004.

OKADA, SF, NICHOLAS RA, KREDA SM, LAZAROWSKI ER, BOUCHER RC. Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. **J. Biol. Chem.**, 281 (2006), pp. 22992–23002.

PAGE, C. P. Platelets as inflammatory cells. **Immunopharmacology** v. 17, p. 51–59, 1989.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system, **The Lancet**, v. 357, p. 1777-1789, 2001.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASETTO, 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.

POINDEXTER, K.; BIRKS, C. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. **Journal Immunology**, v. 153, p. 3574-3583, 1994.

PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS - ASSISTENCIA. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/assistencia/etiologia_diagnostico.htm> Acesso em: 24 de janeiro de 2013.

PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS – MANUAL DST. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/assistencia/manualdst/item12.htm>> Acesso em: 24 de janeiro de 2013.

QUINN, T.C. Acute primary HIV infection. **JAMA**, v. 278, p. 58 – 62, 1997.

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

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. **Drug News & Perspectives**, v. 16, p. 133-140, 2003.

SACHER RA, MCPHERSON RA. WIDMAN. Interpretação Clínica dos Exames Laboratoriais. 11^a ed. Brasil: Manole; 2002.

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

SALAZAR-GONZALEZ, J.F.; MOODY, D.J.; GIORGI, J.V.; MARTINEZ-MAZA, O.; MITSUYASU, R.T.; FAHEY, J.L. Reduced ecto-5'-nucleotidase activity and enhanced OKT10 and HLA-DR expression on CD8 (T suppressor/cytotoxic) lymphocytes in the Acquired immune Deficiency Syndrome: evidence of CD8 cell immaturity. **Journal Immunology**, v. 135, p. 17778-17785, 1985.

SCHACKER, T.; COLLIER, A C.; HUGHES, J.; SHEA, T.; COREY, L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. **Ann Intern Med**, v. 125, p. 257 –264, 1996.

SCHVED JF, GRIS JC, ARNAUD A, *et al.* Von Willebrand factor antigen, tissue type plasminogen activator antigen, and risk of death in human immunodeficiency virus 1-related clinical disease: independent prognostic relevance of tissue-type plasminogen activator. **J Lab Clin Med**, v.120, p. 411-419, 1992.

SCHWIEBERT, A. ZSEMBERY. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. **Biochim. Biophys. Acta**, 1615 (2003), pp. 7–32

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

SITKOVSKY, M.V. Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. **Nippon Ika Daigaku Zasshi**, v. 65, p. 351-357, 1998.

SLEASMAN, J.W.; GOODNOW, M.M. HIV-1 Infection, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p.582 – 592, 2003.

SNEDDON, P; WESTFALL, T.D.; TODOROV, L.D.; MIHAYLOVA-TODOROVA, S.; WESTFALL, D.P.; KENNEDY, C. Modulation of purinergic neurotransmission. **Progress in Brain Research**, v. 120, p. 11-20, 1999.

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

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

SPOSITO AC, CARAMELLI B, FONSECA FAH, BERTOLAMI MC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras de Cardiol**, v. 88, p. 2-19, 2007.

SPRONK, H.M.H.; VAN DER VOORT, D.; TEN CATE, H. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. *Thrombosis Journal*, v. 2, p. 1-10, 2004.

STAPRANS SI AND FEINBERG MB. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 3(4) Suppl:S5-32, 2004.

SULLIVAN PS, HANSON DL, CHU SY, JONES JL, WARD JW. Epidemiology of anemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons: results from the multistate adult and adolescent spectrum of HIV disease surveillance project. *Blood*, v. 91, p. 301-8, 1998.

SULLIVAN P. Associations of anemia, treatments for anemias, and survival in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*, v. 185, p. 138-42, 2002.

SWEET DE. Metabolic complications of antiretroviral therapy. *Top HIV Med*. 2005; 13 (2): 70-74.

TASCA, T.; BONAN, C.D.; DE CARLI, G.A.; SARKIS, J.J.; ALDERETE, J.F. Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, v. 131, p. 71-78, 2005.

TEBIT, D. M. et al. HIV diversity, recombination and disease progression: How does fitness "Fit" into the puzzle? *Aids Revs*, v. 9, n. 2, p. 75-87, 2007.

THE AMERICAN HEART ASSOCIATION. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*, v. 99, p.1293–1304, 2006.

THOMPSON, L.F.; RUEDI, J.M.; O'CONNOR, R.D.; BASTIAN, J.F. Ecto-5'-nucleotidase expression during human B cell development. An explanation for the heterogeneity in B lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in patients with hypogammaglobulinemia. *Journal of Immunology*, v. 137, p. 2496-500, 1986.

THOMPSON, L.F.; ELTZSCHIG, H.K.; IBLA, J.C.; VAN DE WIELE, C.J.; RESTA, R.; MOROTE-GARCIA, J.C.; COLGAN, S.P. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 200, p. 1395-1405, 2004.

UNAIDS/WHO Epidemiological Fact Sheets on HIV and AIDS, 2008 Update. www.unaids.org (acesso em 23 de janeiro de 2013).

VASSORT G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium. *Physiol. Rev.*, 81 (2001), pp. 767–806.

WARNER C. GREENE, ZEGER DEBYSER, YASUHIRO IKEDA, ERIC O. FREED, EDWARD STEPHENS, WES YONEMOTO, ROBERT W.

BUCKHEIT, JOSÉ A. ESTÉ, TOMAS CIHLAR. Novel targets for HIV therapy. **Antiviral Research**, v. 80, p. 251–265, 2008.

WEKSLER, B. B. Platelets. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, **Raven Press**, p. 727–746, 1992.

VIRABEN R, AQUILINA C. Indinavir-associated lipodystrophy. *AIDS* 1998, 12:F37–F39.

VON HENTIG, N.; FÖRSTER, A.; KUCZKA, K. et al. Platelet-leucocyte adhesion markers before and after the initiation of antiretroviral therapy with HIV protease inhibitors. *J Antimicrob Chemother*, v. 62, p. 1118-1121, 2008.

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

ZAULI, G., RE, M. C., DAVIS, B., SEN, L., VISANI, G., GUGLIOTTA, L., FURLINI, G., AND LA PLACE, M. (1992) Impaired in vitro growth of purified (CD34/) hematopoietic progenitors in human immunodeficiency virus-1 seropositivethrombocytopenic individuals. **Blood**, v. 79, p.2680–2689, 1992.

ZHANG, Z.; SCHULER, T.; ZUPANCIC, M.; WIETGREFE, S.; *et al.* Sexual transmission and propagation of SIV HIV in resting and activated CD4+ T cells. **Science**, v. 286, p. 1353 – 57, 1999.

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

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

ZIMMERMANN, H, ZEBISCH M, STRÄTER N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal**, 2012 Sep;8(3):437-502. 2012

ZUCKER-FRANKLIN, D., SEREMETIS, S., AND ZHENG, Z. Y. Internalization of human immunodeficiency virus type 1 and other retroviruses by megakaryocytes and platelets. **Blood**, v.75, p. 120–123, 1990.

6. APÊNDICES

6.1. Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título do projeto:

“Perfil de agregação plaquetária e atividade de ectoenzimas do sistema purinérgico em plaquetas de pacientes HIV positivos”

Pesquisadora responsável: **Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal**

Instituição/Departamento : **Departamento de Microbiologia e Parasitologia–
UFSM**

Telefone para contato: (55) 3220-9581 ou (55) 9105-4701

Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Roraima,1000- Prédio da Reitoria-2º andar-
sala Comitê de Ética -Campus Universitário- Bairro Camobi- 97105-900-
UFSM-Santa Maria-RS

Tel: 0-xx-55 3220 9362

Local de coleta de dados: _____

Nome da paciente: _____ Idade: _____ anos

Responsável legal: _____

Objetivo do estudo/Riscos/Procedimentos/Benefícios/Sigilo:

O senhor está sendo convidado a participar de uma pesquisa, onde será colhido 15ml de sangue por punção venosa, a coleta será realizada no consultório de infectologia do HUSM, no momento da consulta. As amostras de sangue serão processadas e analisadas no laboratório do Departamento de Microbiologia e Parasitologia pelo próprio pesquisador. O senhor, também, está sendo convidado a responder um questionário, de forma voluntária, tendo o direito de desistir a qualquer momento.

Objetivo: a pesquisa avaliará a atividade de algumas substâncias que compõem o sangue de pacientes com HIV, para melhor entendermos sobre o HIV e gerarmos informações capazes de futuramente auxiliar no controle e novos tratamentos.

Procedimento e riscos: Na coleta de sangue haverá o risco de um pequeno desconforto devido à picada da agulha, e do local da coleta ficar dolorido ou arroxado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde. Ao responder ao questionário pode haver cansaço.

Benefícios: os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante. Com esse estudo, poderemos aprimorar nossos conhecimentos sobre a evolução e tratamento da doença. Ao participar desta pesquisa o senhor não terá gasto ou lucro financeiro. Não será feito pagamento pela sua participação na pesquisa.

Confidencialidade: as informações fornecidas no questionário serão de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Em nenhum momento será revelado ou utilizado seu nome. Os dados serão arquivados por um período de 5 anos, e depois destruídos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos deste estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, assim como a garantia de que minhas informações serão preservadas. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Santa Maria, dede

Assinatura do sujeito de pesquisa/representante legal /marca datiloscópica
N. identidade (para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Santa Maria, de de

Assinatura do responsável pelo estudo

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com os pesquisadores:

Daniela Bitencourt Rosa Leal: 55-3220-9581 –

João Felipe Peres Rezer: 55-8435-6438

6.2. Apêndice B

COLETA DE DADOS

Título do projeto: **“Perfil lipídico, agregação plaquetária e atividade de ectoenzimas do sistema purinérgico em plaquetas de pacientes HIV positivos”**

Pesquisadora responsável: Prof^a Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM.

Telefone para contato: (55) 3220-9581 ou (55) 9105-4701

Identificação número:.....

Data da coleta:.....

Responsável pela coleta:.....

1. Grupo em que pertence a paciente:

() com HIV diagnosticado.

() sem HIV diagnosticada.

2. Paciente com HIV faz uso de medicação?

() Não Miligramas:.....

() Sim. Quais? () Abacavir () Zidovudina () Lamivudina

() Efavirenz () Nevirapina () Lopinavir () Atazanavir

() Enfuvirtida () Didanosina () Combivir () Trizivir

() Estavudina () Nelfinavir () Delavirdina () Raltegravir

Quantas vezes ao dia?.....

Outros.....

.....

3. Paciente sem HIV faz uso de alguma medicação?

() Não.

() Sim. Qual?.....

4. Paciente é fumante? () Sim () Não

5. Paciente apresenta colesterol elevado? () Sim () Não

6. Possui uma das seguintes doenças? Quais?

() Hipertensão () Diabetes () Artrite reumatóide

() Outras.....

7. Onde mora? (rua, cidade, etc.).....

.....

8. Como e há quanto tempo descobriu estar infectado?

.....

.....

9. Quando iniciou a terapia.....

Outras informações relevantes:

.....

.....

.....

.....

6.3 Apêndice C

Termo de Compromisso para Utilização de Dados

(TERMO DE CONFIDENCIALIDADE)

Título do projeto:

“Perfil lipídico, agregação plaquetária e atividade de ectoenzimas do sistema purinérgico em plaquetas de pacientes HIV positivos”

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal - UFSM

Instituição/Departamento: Departamento de Microbiologia e Parasitologia

Telefone para contato: (55) 3220 - 9581

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade das pacientes cujos dados serão coletados do registro da paciente no arquivo do HUSM. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas na sala 4102 do prédio 20 do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (UFSM) por um período de dois anos, sob a responsabilidade da Pesquisadora responsável. Após este período, os dados serão destruídos.

Santa Maria, Agosto de 2012.

.....

Prof^a Dr^a **Daniela Bitencourt Rosa Leal**

(Nome e assinatura do pesquisador responsável)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ECTO- ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE PACIENTES HIV POSITIVOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA IN VITRO FRENTE À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

Pesquisador: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 08163912.6.0000.5348

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 145.528

Data da Relatoria: 13/11/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal que visa avaliar a atividade das ecto-enzimas como E-NTPDase, E-5 α -nucleotidase, E-NPP e E-ADA em plaquetas de indivíduos infectados pelo HIV e controles soro-negativos. Este estudo visa ainda verificar o perfil de agregação plaquetária e o efeito in vitro das diferentes terapias antirretrovirais em plaquetas

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Verificar a atividade das ecto-enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em pacientes HIV- positivos sob terapia antirretroviral ou não.

Objetivos específicos

Em indivíduos HIV positivos e HIV negativos verificar:

- A atividade da E-NTPDase e da E-5 α -nucleotidase em plaquetas;
- A atividade da E-ADA e E-NPP em plaquetas e soro;
- Quantificar os nucleotídeos ATP, ADP, AMP e a adenosina no soro;
- Avaliar o perfil da agregação plaquetária, utilizando ADP como agonista;
- Avaliar tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), Dosagem de fibrinogênio e tempo de trombina (TT).
- Avaliar a atividade das ecto-enzimas em pacientes durante a terapia antirretroviral (AIDS) e pacientes que nunca fizeram o tratamento antirretroviral (HIV).

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 7º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

UF: RS **Município:** SANTA MARIA

Telefone: 5532-2093

Fax: 5532-2080

E-mail: com/leeticapesquisa@mail.ufsm.br

