



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

**ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS DE
ADENINA EM PLAQUETAS, AGREGAÇÃO
PLAQUETÁRIA E POLIMORFISMO DO GENE $\alpha 2$ DA
INTEGRINA $\alpha 2\beta 1$ EM PACIENTES COM A DOENÇA
DE VON WILLEBRAND**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KAREN FREITAS SANTOS

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS DE
ADENINA EM PLAQUETAS, AGREGAÇÃO
PLAQUETÁRIA E POLIMORFISMO DO GENE $\alpha 2$ DA
INTEGRINA $\alpha 2\beta 1$ EM PACIENTES COM A DOENÇA
DE VON WILLEBRAND**

por

Karen Freitas Santos

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

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2009

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

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

**ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM
PLAQUETAS, AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E POLIMORFISMO DO
GENE $\alpha 2$ DA INTEGRINA $\alpha 2\beta 1$ EM PACIENTES COM A DOENÇA DE
VON WILLEBRAND**

elaborada por
Karen Freitas Santos

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

Comissão examinadora:

Dra. Vera Maria Morsch
(Presidente/Orientador)

Dra. Vânia Lucia Loro (UFSM)

Dra. Paula Acosta Maldonado (UFSM)

Santa Maria, 08 de Abril de 2009.

“A diferença entre o vencedor e o perdedor não é a força nem o conhecimento, mas, sim, a vontade de vencer”

Vincent T. Lombard

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marino e Marlene e ao meu irmão Tiago, pelo amor, apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim. E, também ao meu irmão Paolo, hoje o meu anjo mais especial.

Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela Vida! Por todas as oportunidades que Ele me proporcionou.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, dedicação e por todo esforço que fizeram para que eu concluísse meus estudos.

Ao meu irmão Tiago, pelo apoio, carinho, amor, cumplicidade que sempre teve por mim. O amor que sinto por você é incondicional!

A minha orientadora, Vera Maria Morsch e a minha co-orientadora, Maria Rosa Chitolina Schetinger, pela oportunidade e votos de confiança que me deram. Não me conheciam e mesmo assim me acolheram com muito carinho! Muito obrigada pelo aprendizado, carinho, dedicação e atenção! Vou lembrar sempre dos ensinamentos de vocês! Obrigada de coração!

A minha “mãezona” Maria do Carmo Araújo, desde que nos conhecemos na Unifra, quando foi minha professora de Hematologia, me adotou só com o olhar! E desde então me tornei sua filha nº 4! É uma pessoa de um coração enorme, que me ajudou do início ao fim e que com certeza estará comigo pra sempre! Sem palavras para agradecer!

Um agradecimento muito especial para a Alice O. Brülê, uma grande amiga! Muito obrigada pela sua dedicação a este trabalho, pelo carinho, paciência e pela oportunidade de aprendizado! Sou muito grata a você!

Aos meus colegas e amigos do laboratório 2208! Vanessa, Maísa, Paula, Renata, Rosélia, Liési, Cíntia, Lara, Roberta, Cíntia, Jessié, Juci Maria, Carol, Margarete, Rosilene, Naiara, Thaís (minha IC, querida e muito dedicada), Ahmed, Gustavo....agradeço a todos pelo coleguismo, amizade e por todos os momentos vividos com esse grupo pra lá de especial.

O meu agradecimento “super” especial a Vanessa, minha grande amiga e “irmã” de todas as horas, em todos os momentos e pra vida inteira!

A Maísa, que se tornou além de colega, outra grande amiga! Que assim como a Vanessa, é daquelas que podemos contar a qualquer momento, para qualquer situação pro resto da vida!

À Angélica, nossa secretária do PPGBT, sempre com um sorriso no rosto e disposição para ajudar em tudo que fosse preciso! Muito obrigada por tudo Angélica!

À Isabel Roggia, por ser tão especial, prestativa e amiga! Agradeço muito a sua lealdade!

A toda equipe da Hemato-Onco do HUSM, por ter me ajudado com toda boa vontade para a realização deste trabalho.

Agradeço a Professora Vânia e a Paula por aceitarem fazer parte da banca examinadora da minha dissertação.

E, não posso deixar de agradecer, aos pacientes que fizeram parte deste estudo! Muito obrigada!

E, finalizado, agradeço todas as pessoas que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

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

ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM PLAQUETAS, AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E POLIMORFISMO DO GENE $\alpha 2$ DA INTEGRINA $\alpha 2\beta 1$ EM PACIENTES COM A DOENÇA DE VON WILLEBRAND

Autora: KAREN FREITAS SANTOS
Orientadora: VERA MARIA MORSCH
Co-Orientadora: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER
Data e local de Defesa: Santa Maria, 08 de Abril de 2009.

A doença de von Willebrand (DvW) é uma das mais comuns entre as doenças hemorrágicas, e é provocada por uma deficiência qualitativa ou quantitativa do fator de von Willebrand (FvW). O FvW é uma glicoproteína multimérica sintetizada por megacariócitos e células endoteliais e está presente no matriz subendotelial, no plasma sanguíneo, nas plaquetas e no endotélio. Esta glicoproteína desempenha um papel importante na formação do trombo plaquetário, iniciando a adesão plaquetária ao local do dano vascular, bem como, a agregação plaquetária. O objetivo deste estudo foi determinar a atividade das enzimas NTPDase (EC 3.6.1.5, CD39), 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) e Ectonucleotideo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) em plaquetas de pacientes com a DvW e em plaquetas de pacientes saudáveis, bem como agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA) e o polimorfismo do gene $\alpha 2$ da integrina $\alpha 2\beta 1$ da superfície de plaquetas. Os grupos foram divididos da seguinte forma: 14 pacientes diagnosticados com DvW e 14 pacientes saudáveis, para o grupo controle. Para a RIPA foram utilizados um Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e um Plasma Pobre em Plaquetas (PPP), utilizando-se uma concentração final de ristocetina de 1.25mg/mL. O polimorfismo do gene $\alpha 2$ foi analisado através da reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando para a digestão do produto da PCR a enzima de restrição Bgl II. Constatou-se que a atividade das enzimas NTPDase e E-NPP foram reduzidas em plaquetas de pacientes com DvW comparadas ao grupo controle. Por outro lado, a atividade da enzima 5'-nucleotidase não foi estatisticamente significativa. Os resultados para os RIPA foram significativamente reduzidos em pacientes com DvW comparado com o controle. A frequência alélica encontrada entre os pacientes com DvW foi de 78,57% para o alelo 807C e de 21,43% para o alelo 807T. Nossos resultados indicam que a redução da atividade da NTPDase e da E-NPP em plaquetas pode estar relacionada à baixa adesividade das plaquetas em pacientes com DvW. A frequência alélica 807C predominante sugere, de acordo com outros estudos, que este polimorfismo é fator característico das manifestações hemorrágicas em pacientes portadores da DvW.

Palavras-chave: Doença de von Willebrand (DvW); plaquetas; NTPDase; 5'-nucleotidase; E-NPP; agregação plaquetária; gene $\alpha 2$.

ABSTRACT

Master Dissertation

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

Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets Platelet Aggregation and Polymorphisms in the $\alpha 2$ Gene of integrin $\alpha 2\beta 1$ in patients with von Willebrand disease

Author: KAREN FREITAS SANTOS

Oriented by: VERA MARIA MORSCH

Co-oriented by: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Date and place of the defense: Santa Maria, April 8nd, 2009.

Von Willebrand disease (vWD) is one of the most common inherited bleeding diseases, caused by a qualitative or quantitative deficiency of the von Willebrand factor (vWF). vWF is a multimeric glycoprotein synthesized by megakaryocytes and endothelial cells and it is present in the subendothelial matrix, blood plasma, platelets and endothelium. This glycoprotein represents an important role in thrombus formation by initiating platelet adhesion to sites of injury as well as platelet aggregation. The objective of this study was determine the activities of NTPDase (CD39), 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) and Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) enzymes in platelets patients from von Willebrand disease and healthy patients, as well as ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and polymorphisms of the $\alpha 2$ gene of the $\alpha 2\beta 1$ integrin. The following groups were studied: 14 patients diagnosed with vWD and 14 healthy patients for control group. For ristocetin-induced platelet aggregation was used a Platelet Rich Plasma (PRP) and Platelet Poor Plasma (PPP), using a final concentration of ristocetin in 1.25mg/mL. The polymorphisms of the $\alpha 2$ gene was analyzed through the Polymerase chain reaction (PCR), used for digestion of the PCR product of the Bgl II restriction site. NTPDase and E-NPP were decreased in platelets of patients with vWD compared to the group control. Moreover, the activity of the enzyme 5'-nucleotidase was not statistically significant. The results of the RIPA were significantly reduced in patients with vWD compared with the control. The allelic frequencies among vWD patients were found to be 78.57% for 807C and 21.43% for 807T. Our results indicate an decreased NTPDase and E-NPP activities in platelets, may be related to the low adhesiveness of platelets in patients with vWD. The allelic frequency 807C predominant suggests, in agreement with other studies, this polymorphism and factor characteristic of hemorrhagic manifestations in patients with DvW.

Keywords: Von Willebrand disease (vWD); platelets; NTPDase; 5'-nucleotidase; E-NPP; platelet aggregation; $\alpha 2$ gene.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Representação de uma plaqueta.....	19
Figura 2 – Representação da hemostasia primária quando um vaso é lesado.....	21
Figura 3 – Representação esquemática do fator de Von Willebrand, com seus domínios funcionais.....	22
Figura 4 – Representação da formação do trombo plaquetário em indivíduos saudáveis e em portadores da DvW.....	23
Figura 5 – Distribuição dos pacientes com DvW por unidade federada, Brasil, 2007.....	24
Figura 6 – Membros da família das enzimas NTPDase.....	33
Figura 7 – Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana.....	35

MANUSCRITO

Figure 1 – Bgl II digest of the 581-bp PCR amplified from genomic DNA from fourteen patients with vWD (A) and thirteen individuals the control group (B). The MW is 100pb.....	61
Figure 2 – NTPDase activity in platelets using ATP (A), ADP (B) and AMP (C) as substrate, from von Willebrand disease patients and control group. The results are presented as means±standard deviation. (*) Indicates a significant difference at $P<0.05$	62
Figure 3 – E-NPP activity in the platelets of patients with von Willebrand disease, and control group. The results are presented as means±standard deviation. (*) Indicates a significant difference at $P<0.05$	64

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA:

Tabela 1 – Procedimentos laboratoriais para o diagnóstico da DvW.....	27
Tabela 2 – Doses recomendadas de concentrados de FVIII/FvW em pacientes não responsivos à desmopressina e/ou em casos de procedimentos cirúrgicos.....	30

MANUSCRITO I:

Table 1: Coagulation parameters.....	58
Table 2: Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA)	59
Table 3: Distribution of platelet membrane glycoprotein polymorphism genotypes in controls and von Willebrand disease patients.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina monofosfato

ATP: Adenosina trifosfato

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DvW: Doença de von Willebrand

E-NPP: Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

FVIII:C: Atividade do fator VIII

FvW: Fator de von Willebrand

FvW:Ag: Antígeno do fator de von Willebrand

FvW:CB: Capacidade de ligação do fator de von Willebrand ao colágeno

FvW:FVIIIIB: Capacidade de ligação do fator VIII

GPIa/IIa ($\alpha 2\beta 1$): Glicoproteína Ia/IIa

GPIb/IX: Glicoproteína Ib/IX

GPIIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$): Glicoproteína IIb/IIIa

LDH: Lactato desidrogenase

NTPDase: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

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

PPP: Plasma pobre em plaquetas

PRP: Plasma rico em plaquetas

RGD: Sequencia de Arginina-Glicina-Asparagina, responsável pela ligação do FvW à GPIIb/IIIa

RIPA: Agregação plaquetária induzida pela ristocetina

TP: Tempo de protrombina

TTPA: Tempo de tromboplastina parcial ativada

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
Anexo B – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética.....	82

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Plaquetas.....	19
2.1.1 Estrutura das plaquetas.....	19
2.1.2 Funções das plaquetas.....	20
2.2 Fator de von Willebrand.....	21
2.3 Doença de von Willebrand.....	22
2.3.1 Classificação.....	24
2.3.1.1 Tipo 1.....	24
2.3.1.2 Tipo 2.....	25
2.3.1.3 Tipo 3.....	26
2.3.2 Diagnóstico.....	26
2.4 Tratamento.....	29
2.4.1 Medidas locais.....	29
2.4.2 Desmopressina.....	30
2.4.3 Tratamento de reposição com concentrado de fator.....	30
2.4 Nucleotídeos de adenina.....	31
2.5 Enzimas que hidrolisam nucleotídeos de adenina.....	32
2.5.1 NTPDase.....	32
2.5.2 5'-nucleotidase.....	34
2.5.3 E-NPP.....	36
2.6 Integrina $\alpha 2\beta 1$	36
3. MANUSCRITO	38
3.1 Artigo 1: ENzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets and polymorphisms in the $\alpha 2$ gene of integrin $\alpha 2\beta 1$ em patients with von Willebrand disease.....	39
4. DISCUSSÃO	66
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
7. ANEXOS	80
7.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
7.2 Anexo B – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética.....	82

APRESENTAÇÃO

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

1. INTRODUÇÃO

A doença de von Willebrand (DvW) é uma doença hemorrágica hereditária causada por uma deficiência quantitativa ou qualitativa do fator de von Willebrand (FvW) (ZHANG et al., 1993; FAVALORO, 1999; GIANNINI et al., 2007). Foi descrita pela primeira vez em 1926 pelo médico finlandês Erik Adolf von Willebrand (ZHANG et al., 1993; SADLER et al., 2000). O FvW é sintetizado por células endoteliais e por megacariócitos. A produção desta proteína é comandada por um gene localizado no cromossomo 12 (ZHANG et al., 1993). É uma proteína de estrutura multimérica que circula no plasma complexada com o fator VIII, aumentando a meia vida plasmática deste fator VIII da coagulação (MILLER et al., 1983). Dentre as principais funções do FvW, destaca-se a mediação da adesão das plaquetas ao subendotélio lesado, funcionando como uma ponte entre receptores de plaqueta (glicoproteína Ib e glicoproteína IIb/IIIa) e o subendotélio lesado (ZHANG et al., 1993).

Dentre as doenças hemorrágicas de natureza hereditária, a DvW é a de maior prevalência, afetando em torno de 1 a 2% da população mundial (TOTONCHI et al., 2008). A DvW pode ser classificada em três tipos diferentes: DvW tipo 1 refere-se a uma deficiência quantitativa do FvW, DvW tipo 2 é classificada como uma anormalidade qualitativa da molécula do FvW a qual é subdividida em quatro variantes – 2A, 2B, 2M e 2N - baseada nas características fenotípicas, e a DvW tipo 3 que é caracterizada por uma deficiência total da molécula de FvW (SADLER et al., 2000; TRASI et al., 2005).

O contato inicial das plaquetas com o vaso injuriado (adesão plaquetária) envolve múltiplos processos complexos de adesão de substratos (FvW, colágeno) e receptores de superfície de plaquetas (glicoproteína Ib/V/IX, integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_2\beta_1$) (KULKARNI et al., 2000). Esta hiperatividade no endotélio faz com que as células endoteliais injuriadas expressem na sua superfície as enzimas NTPDase, (CD39) e 5'-nucleotidase (E.C.3.1.3.5, CD73), ecto enzimas com atividades ATPase e ADPase (KACZMAREK et al., 1996; MARCUS et al., 1991, 1997; DI VIRGILIO et al., 2001).

A NTPDase é uma enzima ligada a membrana plasmática que desempenha um importante papel na hidrólise de nucleotídeos extracelulares tri e difosfatos. Estes nucleotídeos estão presentes na circulação e são liberados de células

ativadas ou tecidos danificados sendo envolvidos na agregação plaquetária. Esta enzima inibe a agregação plaquetária pela hidrólise do ADP a AMP, agindo como um fator tromboregulatório, podendo, desta forma, modular os efeitos do ATP e ADP dentro dos vasos e nos sítios de inflamação (KOZIAK et al., 1999). A NTPDase endotelial converte o ADP pró-agregatório em adenosina anti-agregatória (ZIMMERMANN, 2001).

Posteriormente à hidrólise de ATP e ADP em adenosina monofosfato (AMP) pela NTPDase, tem-se a ação da 5'-nucleotidase, a qual, hidrolisa o AMP em adenosina sendo esta uma molécula moduladora do tônus vascular e inibidora da agregação plaquetária. Ambas, NTPDase e 5'-nucleotidase estão localizadas na membrana plaquetária e desempenham um importante papel na regulação do fluxo sanguíneo e na trombogênese (KAWASHINA et al., 2000).

Além das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase há também uma família de enzimas conhecidas como ectonucleotideo pirofosfatases/fosfodiesterase (E-NPPs) que foram identificadas há mais de 10 anos atrás, e hidrolisam as ligações 5'-fosfodiester em nucleotídeos e seus derivados, resultando na liberação de 5'-nucleotideo monofosfato (GODIN et al., 2003). A família das E-NPPs (EC 3.1.4.1) é composta por sete membros (NPP1-7), sendo apenas três (NPP1-3) responsáveis pela conversão do cAMP para AMP, ATP para AMP e ADP para AMP (CIMPEAM et al., 2004).

Em nosso laboratório já foram realizadas várias pesquisas com a finalidade de avaliar as atividades destas enzimas em diversas patologias, como: atividade da CD39 e CD73 no diabetes (LUNKES et al., 2003), no câncer de mama (ARAÚJO et al., 2005), na insuficiência renal crônica (SILVA et al., 2005) e no infarto do miocárdio (BAGATINI et al., 2008) onde as atividades destas enzimas se encontraram alteradas. Além disso, a atividade da E-NPP, estudada no câncer de útero, também apresentou alterações (MALDONADO et al., 2008).

Vários trabalhos relatam que a NTPDase é um agente anti-agregante e que juntamente com outros fatores participa na tromboregulação (GAYLE et al., 1998; MARCUS et al., 2001, 2003; ARAÚJO et al., 2004). Porém, pouco se conhece sobre a influência das enzimas que degradam nucleotídeos em doenças com caráter hemorrágico como a DvW.

Quando há uma lesão vascular, as plaquetas rapidamente aderem-se e agregam-se ao local da lesão para formar o tampão hemostático que será

estabilizado pela formação de fibrina (RAND et al., 2003). Os primeiros passos para a formação deste trombo plaquetário é a ligação da molécula do FvW a GPIIb/IIIa e a ligação do colágeno com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (na superfície das plaquetas) (DI PAOLA et al., 1999). Um polimorfismo na seqüência do DNA do gene α_2 da integrina $\alpha_2\beta_1$, pode estar relacionado com diferentes níveis de densidade deste receptor na superfície de plaquetas (KRITZIK et al., 1998). Essa variação de densidade pode ser considerada um fator que influencia nas tendências hemorrágicas de pacientes com a DvW tipo 1 (DI PAOLA et al., 1999). Três diferentes alelos podem ser definidos: alelo 1 (807T/837T/873A) está associado com altos níveis do receptor $\alpha_2\beta_1$, enquanto que o alelo 2 (807C/837T/873G) e o alelo 3 (807C/837C/873G) estão associados com baixos níveis deste receptor (KRITZIK et al., 1998; REINER et al., 2001; SANTOSO, 2001; KOMURCU et al., 2002).

As manifestações clínicas da doença variam de acordo com a sua classificação e vários fatores são determinantes para essas diferenças. Desta forma, levando-se em consideração o fato de que o ADP é um promotor da agregação plaquetária e a adenosina um inibidor deste processo, torna-se importante verificar a atividade de enzimas que hidrolisam os nucleotídeos de adenina em uma doença de caráter hemorrágico como a doença de Von Willebrand, bem como, analisar o perfil de cada paciente em resposta a agregação plaquetária e a variação dos níveis do receptor da superfície de plaqueta, a integrina $\alpha_2\beta_1$, ou seja, o polimorfismo desta integrina.

1.1 Objetivos

- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e E-NPP em plaquetas de pacientes com DvW e no grupo controle.
- Verificar o perfil de agregação plaquetária induzida pela ristocetina em pacientes com a DvW e no grupo controle.
- Verificar os níveis de expressão da integrina $\alpha 2\beta 1$ na superfície de plaquetas de pacientes portadores da DvW e no grupo controle através da seqüência de DNA do gene $\alpha 2$.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plaquetas

2.1.1 Estrutura das plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes no sangue e produzidos a partir de megacariócitos na medula óssea (CASTRO et al., 2006).

A membrana celular de uma plaqueta é lipoprotéica composta por fosfolipídios, entre os quais se encontram colesterol, glicolipídios e glicoproteínas. No citoplasma encontram-se organelas como mitocôndrias, lisossomos e grânulos denominados corpúsculos densos e grânulos- α (Figura 1). Os principais constituintes dos corpúsculos densos são: adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e cálcio. Os grânulos- α possuem diversos tipos de proteínas normalmente encontradas no plasma, e que não são necessariamente sintetizadas pelos megacariócitos. Estes grânulos secretam proteínas adesivas, como o fibrinogênio, FvW, fibronectina, vitronectina e trombospondina, que estão em alta concentração no local de lesão vascular, favorecendo a formação do trombo plaquetário (ZAGO et al., 2004).

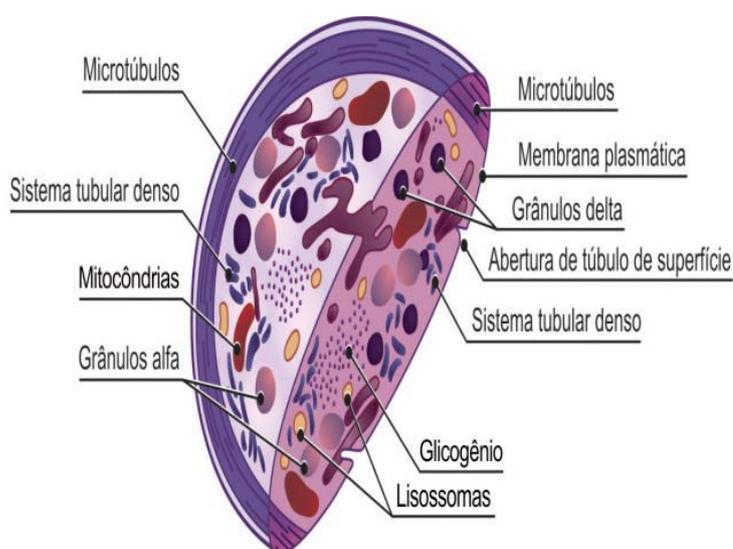


Figura 1 – Representação de uma plaqueta.

2.1.2 Funções das plaquetas

As plaquetas são fundamentais para a manutenção da integridade vascular e a prevenção de hemorragias. Sob condições fisiológicas normais, as plaquetas circulam em estreito contato com a mucosa das células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos e apenas quando há uma lesão vascular elas aderem ao local da lesão (SALLES et al., 2008).

Após a lesão vascular, as plaquetas encontram constituintes da matriz extracelular, especialmente o colágeno, e são ativadas. Ocorre uma interação entre o FvW e o colágeno e a seguir a GPIb/IX plaquetária liga-se ao FvW. Essa ligação caracteriza-se por rápida velocidade de associação, permitindo a adesão plaquetária em vasos onde o sangue circula em alta velocidade. Porém, a interação da GPIb/IX com o FvW apresenta uma alta taxa de dissociação e as plaquetas aderidas à parede vascular movem-se constantemente na direção do fluxo sanguíneo. Com a ativação plaquetária, a GPIIb/IIIa (α IIb β 3) torna-se capaz de se ligar ao FvW, propiciando uma adesão irreversível ao subendotélio (ZAGO et al., 2004). Para uma adesão estável, a matriz extracelular subendotelial requer uma ligação adicional do colágeno com a integrina α 2 β 1 (GPIa/IIa) (RAND et al., 2003).

A adesão plaquetária induz uma rápida transdução de sinal, desencadeando uma série de eventos como: ativação plaquetária, mudanças no citoesqueleto associadas à alteração na conformação, expansão de pseudópodos, contração e secreção dos conteúdos granulares e ativação de integrinas, que sustentarão a adesão plaquetária e a subsequente agregação plaquetária (CASTRO et al., 2006).

São secretados elementos como o ADP, pelas plaquetas, que favorece a agregação plaquetária e outros, como o cálcio, que tem papel fundamental na cascata da coagulação. A agregação plaquetária, conseqüente ao ADP e ao tromboxano A2 (sintetizado na ativação plaquetária) leva a formação do tampão hemostático primário. Com a ativação da cascata da coagulação, a trombina gerada liga-se a superfície plaquetária, resultando em mais agregação (ZAGO et al., 2004) (Figura 2).

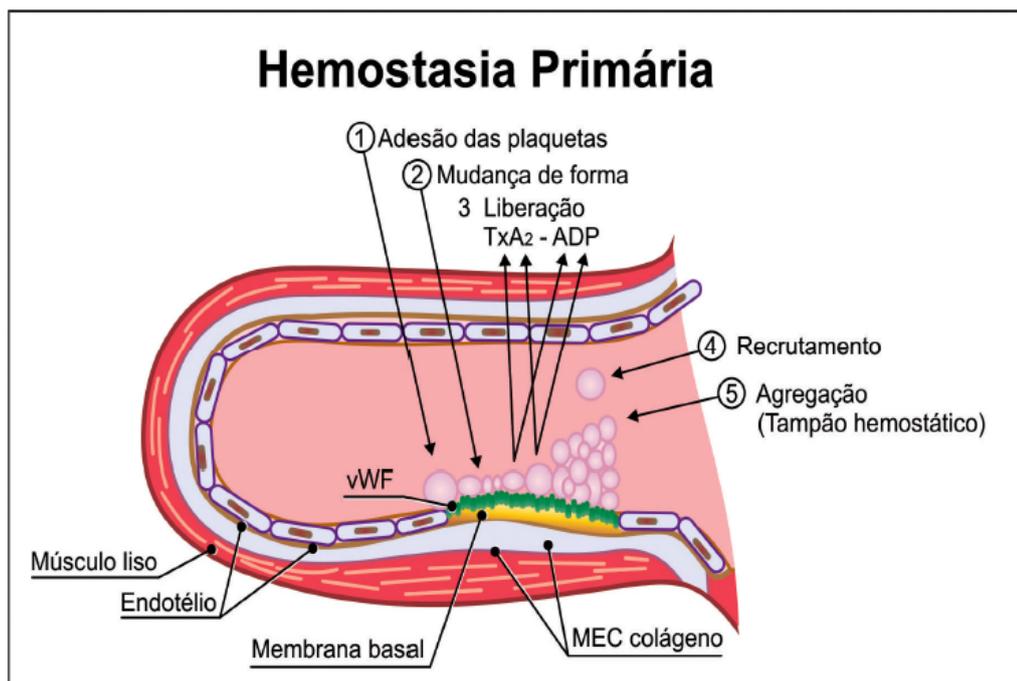


Figura 2 – Representação da hemostasia primária quando um vaso é lesado.

2.2 Fator de von Willebrand

O fator de von Willebrand é uma proteína plasmática de alto peso molecular, produzida por células endoteliais e megacariócitos que é parte do complexo fator VIII/fator von Willebrand. Está presente no plasma, nos grânulos- α , citosol e na matriz subendotelial, sendo constituído por uma série de oligômeros contendo um número variável de subunidades (REININGER, 2008). O gene que codifica o FvW está localizado no braço curto do cromossoma 12, tem 178kb e contém 52 exons. Nas células endoteliais as moléculas do FvW são secretadas ou armazenadas nos corpos de Weibel Palade. Já nas plaquetas, o FvW é armazenado dentro dos grânulos- α (SADLER et al., 2000; JOÃO, 2001).

A contribuição do FvW para a formação do trombo é direta por mediar a adesão entre as plaquetas e os componentes da matriz extracelular, e indireta, pela associação com o fator pró-coagulante VIII, protegendo este fator da degradação no plasma normal, permitindo desta forma a formação de trombina (RUGGERI, 2003).

A concentração plasmática do FvW normal é cerca de 10 mg/ml. Ao contrário da maioria dos fatores da coagulação, o FvW adquire total atividade funcional durante a vida fetal (JOÃO, 2001).

A estrutura molecular do FvW (Figura 3) permite que ele tenha diferentes funções, em geral associadas aos seus diferentes domínios: a GPIIb liga-se ao domínio A1; no domínio C1 encontra-se a seqüência RGD (Arg-Gly-Asp), responsável pela ligação do FvW à GPIIb/IIIa; o fator VIII liga-se no domínio D' e D3; os sítios de ligação do colágeno encontram-se nos domínios A1 e A3 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; LILLICRAP, 2007).

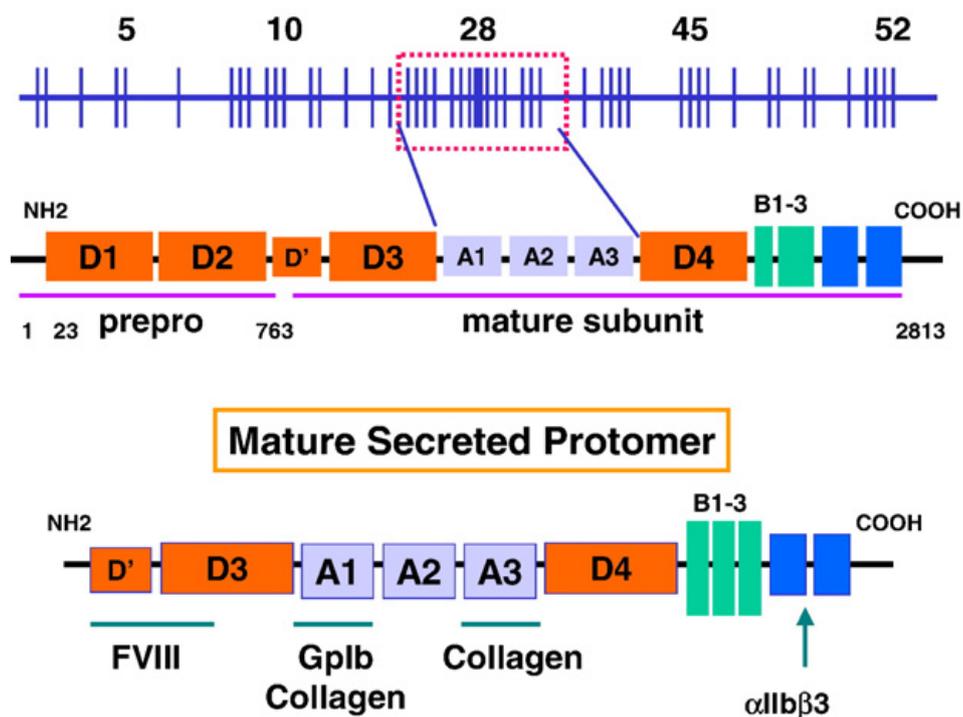


Figura 3 - Representação esquemática do fator de Von Willebrand, com seus diferentes domínios funcionais. (adaptada de LILLICRAP, 2007).

2.3 Doença de von Willebrand

Os pacientes com a DvW constituem um grupo heterogêneo, uma vez que podem ocorrer diferentes expressões clínicas da doença, com sinais e sintomas de intensidade variável. Visando diferenciar a DvW de outras patologias que têm manifestações semelhantes, desde 1993, a DvW é diagnosticada e classificada baseando-se no princípio de que ela é o resultado de uma mutação no gene do FvW (ZAGO, 2004).

A DvW pode ser adquirida, sendo esta forma rara, secundária a doenças malignas (principalmente doenças linfóides e mieloproliferativas) e doenças auto-imunes,

entre outras. Mais comumente, a DvW é uma doença genética congênita, transmitida como caráter autossômico, resultante de mutações no gene que codifica o FvW (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A Figura 4, mostra a formação de um trombo plaquetário em um portador da DvW (caracterizada pela deficiência quantitativa ou qualitativa do FvW) e um indivíduo saudável.

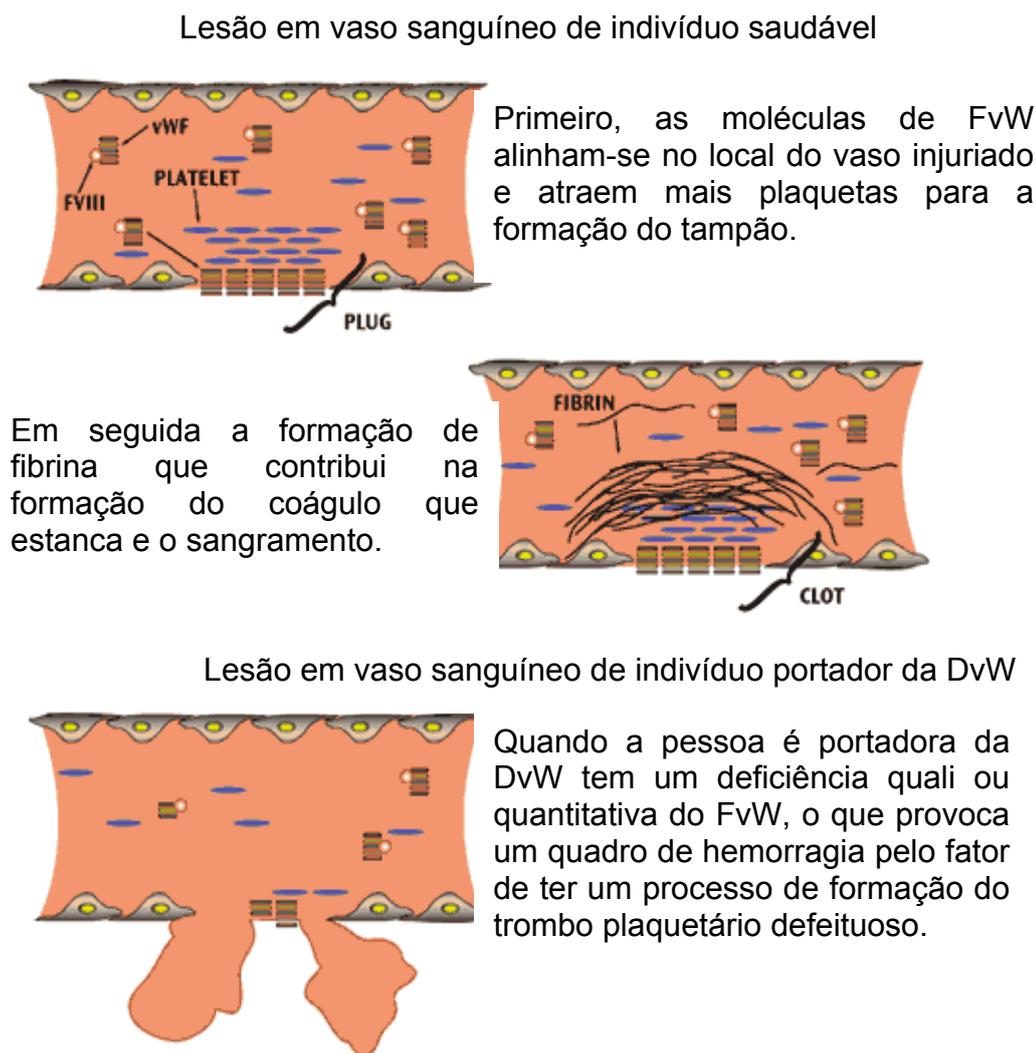


Figura 4 – Representação da formação do trombo plaquetário em indivíduos saudáveis e em portadores da DvW.

A DvW é considerada, entre as doenças hemorrágicas, a mais prevalente, chegando até a um caso para cada 100 habitantes. Não obstante, ainda é muito sub-diagnosticada em nosso meio, devido a vários fatores, tais como: desconhecimento da doença e das suas apresentações clínicas pelos profissionais de saúde, indisponibilidade de testes laboratoriais diagnósticos e dificuldades

técnicas para a realização destes testes (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No Brasil (Figura 5), de acordo com dados preliminares do Cadastro Nacional de Coagulopatias Hereditárias, até o final de 2007, foi verificado o cadastro de 2.333 pacientes diagnosticados com a DvW. Destes, 206 são do estado do Rio Grande do Sul, prevalecendo o número de casos entre o sexo feminino (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

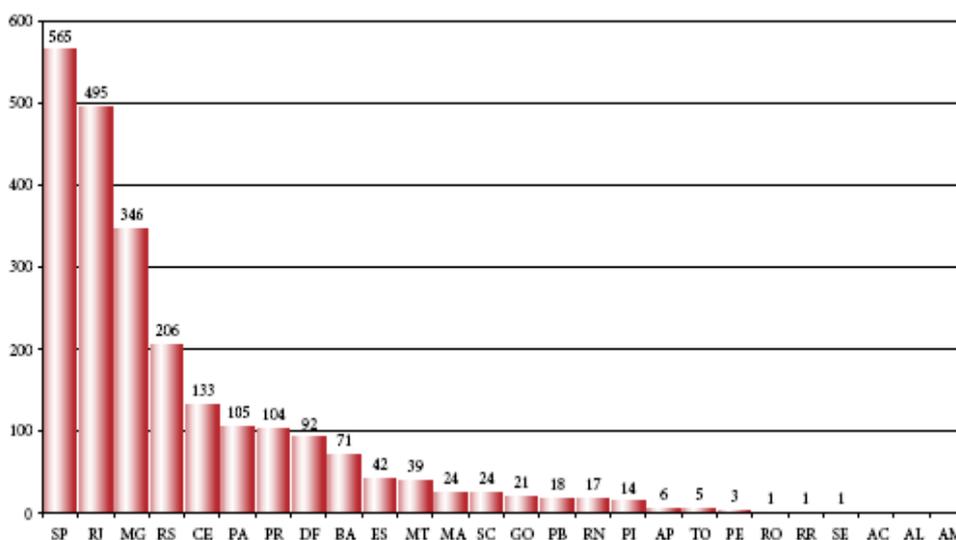


Figura 5 – Distribuição dos pacientes com a DvW por unidade federada, Brasil, 2007. (adaptado de BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

2.3.1 Classificação

A seguir, segue a descrição dos três tipos da doença de von Willebrand e seus subtipos

2.3.1.1 Tipo 1

A DvW tipo 1 deve-se a um defeito quantitativo do FvW. A distribuição dos multímeros do FvW é normal ou quase normal e o FvW residual no plasma tem função aparentemente normal. Este é o tipo mais comum da DvW, compreendendo entre 60 a 80% dos casos. O modo de transmissão é quase sempre dominante (SADLER et al., 2000; FEDERICI et al., 2002). Estes pacientes caracterizam-se por apresentarem sintomas hemorrágicos de intensidade leve a moderada. Os pacientes com a DvW tipo 1 constituem um grupo muito heterogêneo. Baseando-se no conteúdo do FvW intra-plaquetário, podem existir três subtipos: plaqueta “normal”

(com conteúdo funcional normal); plaqueta “baixa” (redução do conteúdo funcional); plaqueta “discordante” (quando o FvW apresenta-se disfuncionante). No tipo de plaqueta “baixa” os sintomas hemorrágicos são mais graves e o tempo de sangramento mais prolongado (ZAGO et al., 2004).

2.3.1.2 Tipo 2

A DvW tipo 2 é caracterizada por apresentar alterações na molécula do FvW, podendo ser subdividida em:

- Subtipo 2A: é a forma mais freqüente da doença tipo 2, de 10 a 15% dos casos. Tem um padrão de transmissão, principalmente, autossômico dominante, mas são descritos casos autossômicos recessivos. Os pacientes apresentam uma tendência hemorrágica leve à moderada. Este subtipo resulta da falta de dois grupos de multímeros no FvW: os de alto peso molecular (que são os que têm um papel importante na adesão da plaqueta ao colágeno) e os de peso molecular intermediário (mais sujeitos a uma proteólise no plasma). Essas faltas devem-se a um defeito intracelular e/ou a aumento da proteólise plasmática dos multímeros (SADLER et al., 2000; ZAGO et al., 2004; RAMASAMY, 2004; NICHOLS et al., 2008).
- Subtipo 2B: é uma variante pouco comum da DvW, menos de 5% dos casos. O padrão de herança é, predominantemente, autossômico dominante, contudo, são descritos alguns casos autossômicos recessivos. O padrão multimérico mostra uma ausência do multímeros de alto peso molecular. A maioria das mutações, neste subtipo da doença, está localizada no domínio A1, resultando em maior afinidade do FvW pelo seu receptor plaquetário GPIb/IX/V, de modo a apresentarem ligações espontâneas. A depuração rápida desses complexos (plaquetas – FvW) resulta em plaquetopenia e na redução dos multímeros de alto peso molecular (SADLER et al., 2000; ZAGO et al., 2004; RAMASAMY, 2004; NICHOLS et al., 2008).
- Subtipo 2M: é raro, com padrão de transmissão autossômico dominante e com manifestações hemorrágicas de intensidade variável. As alterações moleculares neste subtipo estão localizadas no domínio A1 (SADLER et al., 2000; ZAGO et al., 2004; RAMASAMY, 2004; NICHOLS et al., 2008).

- Subtipo 2N: também é raro, é causada pela diminuição acentuada da afinidade do FvW pelo FVIII. É caracterizado por uma herança de transmissão recessiva, associa-se a mutações nos domínios D' a D3. As manifestações clínicas apresentam intensidade variável (SADLER et al., 2000; ZAGO et al., 2004; RAMASAMY, 2004; BRASIL, 2006; NICHOLS et al., 2008).

2.3.1.3 Tipo 3

Neste tipo da DvW, a molécula do FvW é estruturalmente normal, mas a queda da concentração deste fator é muito acentuada. O quadro clínico se traduz por associação de dois tipos de sintomas hemorrágicos: uns semelhantes aos da hemofilia; outros, semelhantes aos dos defeitos plaquetários – estes caracterizados por sangramentos cutaneomucosos. A sua transmissão é autossômica recessiva e a sua prevalência corresponde de 1 a 5% (SADLER et al., 2000; ZAGO et al., 2004; RAMASAMY, 2004; BRASIL, 2006; NICHOLS et al., 2008).

2.3.2 Diagnóstico

O quadro clínico do paciente com DvW, de forma leve, é inexistente ou dominado por hemorragias ligeira cutâneas e/ou mucosas. Já, nas formas mais severas, em que a quantidade plasmática de FVIII é baixa podem existir hemartroses e hematomas intramusculares dissecantes graves. A ocorrência de petéquias é rara, mais comum são as epistaxis (em cerca de 60% dos doentes), hemorragias gastrointestinais (em cerca de 10% dos doentes), menorragias (em cerca de 35 a 65% das mulheres afetadas), equimoses faciais e hematomas (em cerca de 40% dos doentes) e gengivorragias (em cerca de 35% dos doentes) (JOÃO, 2001).

Devido à sua complexidade, o diagnóstico da DvW freqüentemente é difícil e trabalhoso. Dependendo do sítio funcional que se apresentar alterado, somente alguns testes podem estar anormais, fazendo com que a investigação laboratorial exija um conjunto de determinações que avaliem quantitativa e funcionalmente o FvW e o FVIII. Os exames com maior utilidade para o diagnóstico da DvW são: o estudo funcional do FvW por meio da sua atividade de co-fator de ristocetina (FvW:RCo), o teste imunológico para o FvW (FvW:Ag) e o teste que avalia a função do FVIII (FVIII:C). As análises laboratoriais podem ser subdivididas em testes de

triagem, testes confirmatórios e testes especiais como podem ser visto na tabela 1 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Tabela 1 – Procedimentos laboratoriais para o diagnóstico da DvW.

Testes de triagem
Tempo de sangramento (TS)
Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)
Contagem plaquetária
Testes confirmatórios
Atividade do fator VIII (FVIII:C)
Antígeno do FvW (FvW:Ag)
Atividade de cofator de ristocetina (FvW:RCo)
Capacidade de ligação do FvW ao colágeno (FvW:CB)
Testes especiais
Agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA)
Padrão multimérico do FvW
FvW intraplaquetário
Capacidade de ligação ao FVIII (FvW:FVIII B)

O tempo de sangramento tradicionalmente é visto como o melhor indicador da hemostasia primária, sendo sensível à quantidade e qualidade do FvW plasmático e, principalmente intra-plaquetário. Usualmente apresenta-se prolongado na DvW, porém pode ser normal nos pacientes que têm formas leves e naqueles com FvW intra-plaquetário normal. A contagem plaquetária é, em geral, normal, mas pode haver plaquetopenia leve nos pacientes com tipo 2B. Quanto ao tempo de tromboplastina parcial ativada, por refletir nos níveis plasmáticos do fator VIII coagulante, poderá ser normal ou poderá ter prolongamento de intensidade variável (ZAGO et al., 2004).

O FvW desempenha um papel importante na síntese, secreção e meia-vida do fator VIII. Dessa forma, a avaliação da atividade do fator VIII (FVIII:C) mede a habilidade do FvW ligar-se e manter os níveis do FVIII na circulação (ZAGO et al., 2004; NICHOLS et al., 2008). Os níveis plasmáticos do FVIII coagulante,

geralmente, apresentam um paralelismo aos níveis do FvW. Nos portadores da doença dos tipos 1 ou 2, o FVIII coagulante pode ser normal ou discretamente reduzido já na doença do tipo 3, este fator é muito reduzido (ZAGO et al., 2004).

A quantificação do antígeno do FvW (FvW:Ag) avalia a quantidade de FvW presente na circulação, podendo ser realizado através de teste imunoeletroforético, imunoradiométrico ou ensaio imunoenzimático (ELISA) (ZAGO et al., 2004; NICHOLS et al., 2008). Os níveis de FvW:Ag serão baixos nos tipos de DvW quantitativos (tipos 1 e 3) e normais ou limítrofes no tipo quantitativo de DvW (tipo 2) (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A atividade de co-fator de ristocetina (FvW:RCo) é realizado utilizando a ristocetina, um antibiótico que promove a interação entre o FvW e o complexo GPIB/IX/V, esta propriedade é decorrente da quantidade de oligômeros de alto peso molecular. Através desta análise laboratorial verifica-se a atividade funcional do FvW do paciente aglutinar as plaquetas de um doador normal, em presença de ristocetina como agente indutor. O FvW:RCo é baixo em todos os tipos de DvW. (FAVALORO, 1999; ZAGO et al., 2004; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; NICHOLS et al., 2008).

O teste de capacidade de ligação do FvW ao colágeno (FvW:CB), é considerado tanto como um ensaio quantitativo quanto qualitativo. É preferencialmente realizado pelo método imunoenzimático (ELISA). Foi desenvolvido tendo-se como base a capacidade do FvW, preferencialmente os multímeros de alto peso molecular, de se ligar ao colágeno (FAVALORO, 1999; ZAGO et al., 2004). Em princípio, o FvW:CB é reduzido em todos os tipos de DvW (defeitos quantitativos e qualitativos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA) avalia a capacidade de crescentes concentrações de ristocetina agregarem plaquetas, na presença de FvW. Tipicamente utiliza-se três concentrações entre uma faixa de 0.5 a 1.5 mg/mL. Em pacientes com a DvW tipo 3 a RIPA estará ausente, em qualquer concentração de ristocetina (pois, é necessária a presença de FvW para esta agregação ocorrer e o FvW está ausente nestes pacientes). O perfil de RIPA em pacientes com DvW tipo 1 (deficiência quantitativa do FvW, FvW qualitativamente normal) vai depender do nível de FvW presentes no plasma. Embora o teste RIPA seja pouco sensível para leves deficiências quantitativas do FvW, os pacientes com DvW tipo 1, mais graves, ou seja, < 15% FvW, poderão ter uma ausência de agregação com ristocetina na

concentração final de 1.0 mg/mL ou uma leve agregação com ristocetina na concentração final de 1.5 mg/mL. Pacientes com tipo 2 da doença, mais grave, apresentarão um padrão semelhante ao descrito anteriormente, ausência de RIPA com ristocetina 1.0 mg/mL e leve agregação com níveis de ristocetina a 1.5 mg/mL. Em contrapartida, pacientes com tipo 2B da DvW apresentarão uma maior resposta a agregação com 0.5 mg/mL de ristocetina (FAVAROLO, 1999).

A análise do padrão multimérico do FvW é realizada por eletroforese onde então os multímeros do FvW, com tamanhos variados, são separados em gel de agarose, permitindo visualizar a presença de todos os multímeros (ZAGO et al., 2004). No tipo 1, todos os multímeros estão presentes, porém em quantidades reduzidas; no tipo 2, os grandes multímeros encontram-se ausentes, exceto no tipo 2M, que apresenta padrão multimérico semelhante ao tipo 1; o tipo 3 apresenta redução importante ou ausência dos multímeros do FvW (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O teste laboratorial para avaliar o FvW intraplaquetário permite subclassificar a DvW em tipo 1, avaliando juntamente com outros testes. E, a capacidade de ligação ao FVIII (FvW:FVIII), permite fazer o diagnóstico do subtipo 2N da DvW, distinguindo-a da hemofilia A leve ou moderada (ZAGO et al., 2004).

2.4 Tratamento

O tratamento dos pacientes com a DvW tem o objetivo elevar as concentrações plasmáticas da proteína deficiente quando da ocorrência de manifestações hemorrágicas ou antes da realização de procedimentos invasivos. Com isso, procura-se corrigir as duas anormalidades hemostáticas: (1) a adesão e a agregação plaquetárias, que necessitam dos multímeros de peso molecular mais elevado, e (2) os baixos níveis do FVIII, que requerem o FvW como proteína transportadora (ZAGO et al., 2004; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As opções terapêuticas para o tratamento da DvW incluem o uso de medidas locais, a desmopressina (DDAVP), o emprego de concentrados comerciais que contenham FVIII/FvW e as medidas auxiliares:

2.4.1 Medidas locais: Na DVW, assim como em qualquer doença hemorrágica, a compressão local prolongada (5-10 minutos) de lesões menores pode ser útil e ter

poder hemostático. A cauterização não é recomendada. O selante de fibrina pode ser utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente na cavidade oral. Bochechos com agentes antifibrinolíticos podem ser também utilizados em procedimentos odontológicos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.4.2 Desmopressina: A desmopressina (1-deamino-8-D-arginina vasopressina ou DDAVP) é um análogo sintético da vasopressina (hormônio antidiurético), que produz aumento das concentrações plasmáticas do FVIII e FVW autólogos, geralmente sem provocar importantes efeitos colaterais quando empregada em indivíduos normais ou pacientes com DVW. A desmopressina pode ser administrada por vias subcutânea, intravenosa ou intranasal. A dose recomendada para uso intravenoso, em infusão lenta de 30 minutos, é de 0,3µg/kg, diluída em 50-100mL de solução salina. A dose recomendada para uso subcutâneo é a mesma (0,3µg/kg), porém empregando-se a apresentação da desmopressina de alta concentração (15-20mcg/ampola). Para aplicação intranasal, a dose recomendada é de 300µg para adultos e de 150µg para crianças (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.4.3 Tratamento de reposição com concentrado de fator: A terapia de reposição está indicada aos pacientes que não respondem à desmopressina ou quando as concentrações alcançadas após o uso dessa droga são inadequadas para a situação em questão (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A Tabela 2 apresenta as doses de concentrados comerciais de FVIII/FVW recomendadas para o tratamento de episódios hemorrágicos.

Tabela 2 – Doses recomendadas de concentrados de FVIII/FvW em pacientes não responsivos à desmopressina e/ou em caso de procedimentos cirúrgicos:

Tipo de sangramento	Dose (UI/Kg)	Frequência	Objetivos
Cirurgia de grande porte*	40-50	Diária	Pico de FVIII:C de 100% , com níveis mínimos de >50%, por 5-10 dias de acordo com o tipo e a gravidade de cada caso.

Cirurgia de pequeno porte**	30	Diárias ou em dias alternados	Pico de FVIII:C de 60%, com níveis mínimos de >30%, por 2-4 dias.
Exodontia	20	Dose única	Pico de FVIII:C de 40%
Sangramento espontâneo	25	Diária	Pico de FVIII:C >50%, até cessar o sangramento (2-4 dias)
Parto e puerpério	40	Diária	Pico de FVIII:C >80%, com níveis mínimos de >30%, por 3-4 dias.

*Cirurgias abdominais, torácicas, neurológicas ou ortopédicas que necessitem anestesia geral por mais de 30 minutos.

**Cirurgias envolvendo órgãos não-vitais, com dissecação limitada, de curta duração.

(Adaptado de: MANNUCCI, 2001).

2.5 Nucleotídeos de adenina

Os nucleotídeos extracelulares de adenina ATP, ADP e AMP, e o nucleosídeo adenosina estão envolvidos em uma variedade de processos fisiopatológicos em diferentes células. O metabolismo extracelular destes nucleotídeos gerando nucleosídeos tem uma importante função regulatória no controle da homeostase, principalmente por regularem a agregação plaquetária, via receptores purinérgicos P2 (ZIMMERMANN, 1999; ATKINSON et al., 2006). Estes nucleotídeos regulam a homeostase através da ativação e cooperação de três receptores purinérgicos plaquetários do tipo P2, chamados P2Y, P2X e ainda P2T (DI VIRGILIO et al., 2001). A concentração desses nucleotídeos depende da quantidade liberada, do efeito da diluição no espaço extracelular e da atividade de enzimas de hidrólise, tais como as ectonucleotidases (GORDON, 1986).

O ADP é o principal promotor da agregação plaquetária, enquanto que a adenosina é um potente inibidor. Altas concentrações de ATP também têm mostrado uma inibição no processo de indução plaquetária pelo ADP in vitro (BIRK et al., 2002). O ATP é considerado um antagonista competitivo do ADP pelo receptor de plaqueta P2Y (ROBSON, 2000). O ATP quando secretado para o meio extracelular de plaquetas é capaz de mediar a reatividade plaquetária (BIRK et al., 2002). A

hidrólise subsequente de ATP e ADP até AMP e adenosina inibem a agregação plaquetária (MARCUS et al., 2005).

A hidrólise do ADP até adenosina, através das ectonucleotidases, estimula o processo de inibição da agregação plaquetária (ROBSON et al., 2006). Portanto, há uma consequente inibição da agregação plaquetária através dos receptores de adenosina (KAHNER et al., 2006).

A adenosina extracelular e os derivados da adenina são moduladores do tônus vascular e da função plaquetária (COADE et al., 1989).

2.6 Enzimas que hidrolisam nucleotídeos de adenina

2.6.1 NTPDase

As ações induzidas pela sinalização purinérgica são reguladas pelas ectonucleotidases, que incluem membros da família das ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPDase) e E-NPPs, e ecto-5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 2001).

Há várias enzimas que hidrolisam ATP e ADP separadamente (BATTASTINI, 1990). A NTPDase é uma enzima capaz de degradar tanto o ADP quanto o ATP (ROBSON et al., 2006). Outra enzima, a 5'-Nucleotidase, catalisa a hidrólise de AMP até adenosina. Assim, estas enzimas agem na regulação da formação do tampão primário (ZIMMERMANN, 2001).

NTPDase é o termo genérico para designar uma família de enzimas presentes na membrana plasmática de diversos tecidos. As NTPDases catalisam a hidrólise de nucleotídeos difosfatados (NDP) e trifosfatados (NTP), com diferentes graus de preferência por um tipo individual. Entre as enzimas classificadas como NTPDases, quatro delas são enzimas localizadas na membrana celular com um sítio catalítico na face extracelular, são elas: NTPDase 1, 2, 3 e 8; e as outras quatro enzimas – NTPDase 4, 5, 6 e a 7 – exibem uma localização intracelular (ROBSON et al., 2006) (Figura 6).

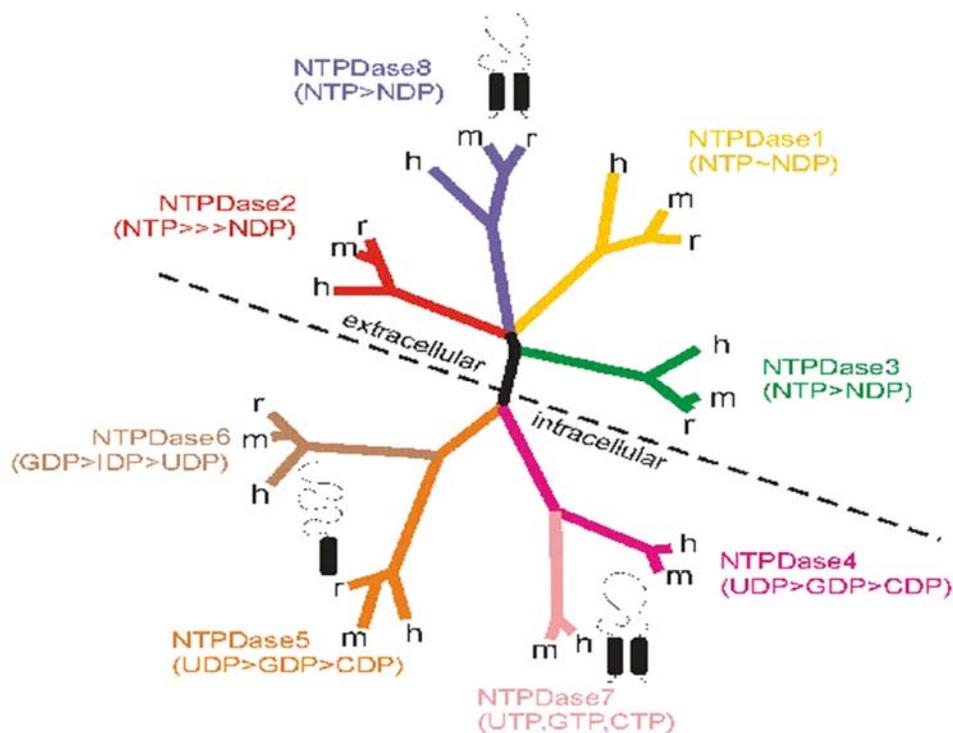


Figura 6 – Membros da família das enzimas NTPDase. (Adaptado de ROBSON et al., 2006).

Todos os membros desta família apresentam em sua estrutura no mínimo cinco domínios chamados regiões conservadas de apyrase (ACR), que é o local que apresenta grande similaridade na seqüência de aminoácidos. Tais domínios estão diretamente envolvidos na atividade catalítica da enzima e/ou na integridade estrutural das E-NTPDases (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). Estas enzimas estão amplamente distribuídas nos tecidos animais e representam as principais ectonucleotidases expressas pelo endotélio e células musculares lisas do sistema circulatório (ZIMMERMANN et al., 1999; SCHETINGER et al., 2001).

A NTPDase-1 (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD 39) foi a primeira enzima da família NTPDase a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001), esta enzima na superfície de plaquetas intactas de humanos pode estar envolvida na regulação da concentração dos nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular. Alguns estudos indicam que o uso de CD39 solúvel se constitui num potencial agente terapêutico para inibição de processos trombóticos mediados por plaquetas. A solução purificada de CD39 bloqueou *in vitro* a agregação plaquetária

induzida por ADP e inibiu a reatividade plaquetária induzida pelo colágeno (GAYLE et al., 1998; ENJYOJI, 1999).

As NTPDase1 e NTPDase2 estão presentes em uma grande variedade de tecidos, incluindo coração, placenta, pulmão, fígado, musculatura esquelética, timo, rim, pâncreas, testículos, ovários, próstata, colón, cérebro (ZIMMERMANN, 1999) e plaquetas (PILLA et al., 1996). As NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão fortemente ligadas a membrana via dois domínios transmembrana, que no caso da NTPDase 1 são importantes para a manutenção da especificidade da atividade catalítica e do substrato. Os dois domínios também podem sofrer movimentos coordenados durante o processo de ligação e hidrólise dos nucleotídeos (GRINTHAL et al., 2006). A NTPDase2 tem uma elevada preferência por nucleotídeo trifosfatado (ZIMMERMANN, 2001).

A NTPDase3 (CD39L3, HB6) é um intermediário funcional que hidrolisa ATP/ADP em uma taxa molecular de aproximadamente 1:0,3 (SMITH et al., 1998). A enzima NTPDase4 possui uma função de UDPase, age hidrolisando UDP e outros nucleosídeos di e tri fosfatados, porém não é capaz de hidrolisar os nucleotídeos ATP e ADP (ZIMMERMANN, 2000).

Quando expressa em células COS-7, a NTPDase5 (CD39L4) é secretada e possui uma alta preferência por nucleosídeos 5'-difosfatados, especialmente UDP (MULERO et al., 1999). A NTPDase 6 hidrolisa preferencialmente nucleosídeos 5'-difosfatos. A análise imunohistoquímica sugere que a NTPDase 6 é associada ao Complexo de Golgi e a pequenas extensões da membrana plasmática (ZIMMERMANN, 2001).

A NTPDase7 (LALP1) foi clonada e caracterizada em humanos e ratos e possui localização intracelular, sendo classificada como uma endo-apirase, com preferência pelos substratos UTP, GTP e CTP (SHI et al., 2001). Já a NTPDase8 foi caracterizada em ratos por Bigonnesse et al., 2004, e parece regular os níveis de nucleotídeos extracelulares de maneira distinta de outras ectonucleotidases.

2.6.2 5'-nucleotidase

Existem sete tipos de 5'-nucleotidases humanas isoladas e caracterizadas. Estas enzimas variam de acordo com a sua localização celular, onde cinco destas enzimas estão localizadas no citosol, uma na matriz mitocondrial e uma ancorada no

exterior da membrana plasmática. Estas enzimas têm em comum sua habilidade de catalisar a hidrólise de uma variedade de nucleotídeos monofosfatados como o AMP até o seu nucleosídeo, no caso a adenosina. As 5'-nucleotidases têm também a função de regular os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos celulares (HUNSUCKER et al., 2005).

A enzima 5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5), catalisa especificamente a hidrólise de NMP a adenosina (SARKIS et al., 1995). A 5'-nucleotidase (Figura 7) é uma glicoproteína intrínseca da membrana plasmática encontrada em diferentes tipos celulares, incluindo plaquetas, e também em diferentes tecidos, como o nervoso, renal e hepático (ZIMMERMANN et al., 1993). A enzima hidrolisa nucleosídeos 5'-monofosfatados ao seu respectivo nucleosídeo e PI, sendo o principal responsável pela formação de adenosina extracelular a partir de nucleotídeos da adenina, a qual interage com receptores de adenosina (P1) (ZIMMERMANN, 2000).

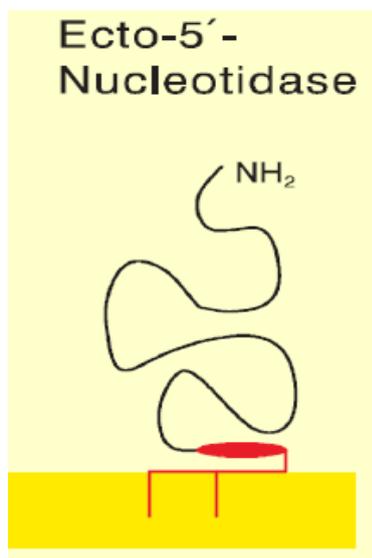


Figura 7 - Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana (Adaptado de: ZIMMERMANN, 2001).

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

enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase têm importante função na regulação da agregação plaquetária (ENJYOJI et al., 1999).

2.6.3 E-NPP

A família das NPPs (nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase) inclui 7 membros (NPP1-7) envolvidos numa grande variedade de atividades biológicas, que incluem: a formação dos ossos, a motilidade celular, as metástases tumorais e a resistência à insulina em diabetes do tipo II (GODING et al., 2003; STEFAN et al., 2006). A E-NPP foi caracterizada em plaquetas de ratos e apresentou atividade catalítica adaptada para o meio extracelular (FÜRSTENAU et al., 2006). As NPPs1-3 estão envolvidas na hidrólise de nucleotídeos e as NPPs 6-7 hidrolisam ligações fosfodiéster em fosfolípidos e fosfoésteres de colina (STEFAN et al., 2006).

Estas enzimas apresentam atividade de fosfodiesterase alcalina bem como atividade nucleotídeo pirofosfatase, hidrolisando uma grande quantidade de substratos, como as purinas e as pirimidinas. O p-nitrofenil-5'-timidina-monofosfatos (p-nitrophenyl-TMP) é usado como substrato artificial específico para NPPs (SAKURA et al., 1998).

Todas as NPPs têm, voltado para o meio extracelular, um domínio catalítico com 60% de identidade de aminoácidos entre as diferentes isoformas da enzima (STEFAN et al., 2005; STEFAN et al., 2006). Esse domínio catalítico é fixado à membrana por uma "haste" que consiste de porções ricas em cisteína. Devido ao fato de seu sítio catalítico ser voltado para o meio extracelular essa família de enzimas denominada ecto-NPP (E-NPP) e funcionam, *in vitro*, em pH alcalino entre 8.5-8.9 (GODING, 2000).

2.7 Integrina $\alpha 2\beta 1$

As integrinas são receptores transmembrana celular e conseguem exercer atividades variadas dentro e fora da célula, proporcionando comunicação efetiva entre as células e o meio que as envolve, de modo bidirecional; envolvidas em diversos processos biológicos como embriogênese, inflamação e agregação plaquetária. Pelo menos 24 integrinas têm sido encontradas em diferentes

superfícies celulares. Todas as integrinas contêm uma subunidade α e uma β e não há uma seqüência homogênea e semelhanças em suas estruturas (HYNES, 2004).

A integrina $\alpha 2\beta 1$ é um dos receptores de plaqueta para o colágeno. A expressão de $\alpha 2\beta 1$ na superfície de plaquetas difere acentuadamente entre indivíduos normais (<1000-3000 moléculas/plaqueta) e depende da herança do polimorfismo alélico do gene $\alpha 2$ (SANTOSO, 2001). Os três diferentes alelos do gene $\alpha 2$ são associados com os níveis de expressão da integrina $\alpha 2\beta 1$ na superfície das plaquetas. O alelo 1 (807T/837T/873A) expressa altos níveis de $\alpha 2\beta 1$ enquanto que indivíduos caracterizados pelos alelos 2 (807C/837T/873G) e 3 (807C/837C/873G) exibem uma baixa expressão desta integrina na superfície das plaquetas (DI PAOLA et al., 1999; KOMURCU et al., 2002).

Desta forma, $\alpha 2\beta 1$, tem um potencial de contribuir significativamente para a função plaquetária *in vivo*. Pacientes com anormalidades quantitativas de $\alpha 2$ de plaquetas apresentam tempo de sangramento prolongado, sangramento crônico nas mucosas, defeitos na adesão plaquetária com o colágeno *in vitro* e ausência *in vitro* da agregação induzida pelo colágeno (KUNICKI et al., 1997). Indivíduos com receptor de baixa densidade são homozigotos para o alelo 807C/873G, enquanto indivíduos homozigotos para a alelo 807T/873A tem receptores de alta densidade (KUNICKI et al., 1997; KRITZIK et al., 1998). Este polimorfismo poderia, portanto, apresentar uma predisposição genética para o desenvolvimento de doença trombótica ou hemorrágica (KOMURCU et al., 2002).

3. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito.

Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets and polymorphisms in the $\alpha 2$ gene of integrin $\alpha 2\beta 1$ in patients with von Willebrand disease

Karen Freitas Santos^a, Vanessa Battisti^a, Maísa de Carvalho Corrêa^a, Thaís Rapachi Mann^a, Renata da Silva Pereira^b, Maria do Carmo Araújo^c, Alice Odete Brülê^c, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a, Vera Maria Morsch^{a*}

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

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

^c *Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

* *Corresponding author:*

Dra. Vera Maria Morsch

Departamento de Química

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900

E-mail: veramorsch@gmail.com

Fax: +55 -55-3220-8978

Abstract

Objectives: To determine the activities of NTPDase (CD39), 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) and Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) enzymes in platelets from von Willebrand disease and healthy patients, as well as ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and polymorphisms of the $\alpha 2$ gene of the $\alpha 2\beta 1$ integrin.

Design and methods: The following groups were studied: 14 patients diagnosed with vWD and 14 healthy patients (control group). Was determined the activities of NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPP in platelets patients from vWD. For ristocetin-induced platelet aggregation was used a Platelet Rich Plasma (PRP) and Platelet Poor Plasma (PPP), using a final concentration of ristocetin at 1.25mg/mL. The polymorphisms of the $\alpha 2$ gene was analyzed through the chain reaction of polymerase (PCR), used for digestion of the PCR product of the Bgl II restriction site.

Results: NTPDase and E-NPP were decreased in platelets of patients with vWD compared to the group control. The 5'-nucleotidase activity was not statistically significant. The results for the RIPA were significantly reduced in patients with vWD (77.09%±16.49) compared to the control group (92.54%±6.00). The allelic frequencies among vWD patients were found to be 78.57% for 807C and 21.43% for 807T.

Conclusion: Our results indicates a reduced NTPDase and E-NPP activities in platelets that may be related to the low adhesiveness of platelets and the increased 5'-nucleotidase activity, not statistically significant, probably by the enhanced release adenosine that is a powerful inhibitor of platelet aggregation. The predominant allelic frequency 807C suggests that this polymorphism contribute to the characteristic bleeding of the vWD.

Keywords: von Willebrand disease (vWD); platelets; NTPDase; 5'-nucleotidase; E-NPP; platelet aggregation; $\alpha 2$ gene.

1. Introduction

Von Willebrand disease (vWD) is one of the most common inherited bleeding diseases [Sadler et al., 2000; Trasi et al., 2005]. This disease is caused by a qualitative or quantitative deficiency of the von Willebrand factor (vWF) [Trasi et al., 2005]. vWF is a multimeric glycoprotein synthesized by megakaryocytes and endothelial cells and is present in the subendothelial matrix, blood plasma, platelets and endothelium. This glycoprotein plays an important role in thrombus formation by initiating platelet adhesion to sites of injury as well as platelet-platelet aggregation [Reininger, 2008]. There are three primary types of vWD: partial quantitative deficiency (type 1), qualitative deficiency (type 2) and total deficiency (type 3). Type 2 vWD is divided further into four variants (2A, 2B, 2M and 2N) in relation to the phenotype [Totonchi et al., 2008; Nichols et al., 2008].

Platelets are one of the most important blood components that participate and regulate thrombus formation by releasing active substances, such as ADP [Marcus et al., 2003; Vischer et al., 1998] ATP, thromboxane A₂, serotonin and other biologically active substances. Micromolar concentrations of ADP are sufficient to induce human platelet aggregation, whereas adenosine inhibits platelet aggregation. ADP-induced platelet aggregation results from concomitant signaling via two types of G-protein coupled nucleotide receptors (P2Y₁ and P2T_{AC}). Endothelial cells represent additional targets of nucleotides. They express the P2Y1 receptor, which is activated by binding to ADP, the P2Y2 receptor, which responds to ATP and UTP. The main effect of these nucleotides on the endothelium is the stimulation of synthesis and release of nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂), two substances with dual physiological effects. As they relax the vascular smooth muscle and are potent inhibitors of platelet activation, these mediators increase blood flow by inducing vasodilation as well as by inhibiting excess local ADP effects on platelet activation [Zimmermann, 1999].

Platelets control bleeding when there is an injury to the blood vessel wall and the endothelial cell layer is disrupted exposing the underlying extracellular matrix. Two adhesion receptors, found on the surface of platelets, glycoprotein (GP) Ib-IX-V and GPVI, that bind vWF and collagen, respectively, are primarily responsible for regulating this initial platelet adhesion and activation in flowing blood [Andrews et al., 2004].

Congenital or acquired deficiencies of glycoprotein Ia/IIa have been described in several patients with clinical bleeding diatheses and defective *in vitro* platelet response to collagen. The gene for the integrin $\alpha 2$ (glycoprotein Ia) subunit of the integrin $\alpha 2\beta 1$ (GPIIa) receptor is located on chromosome 5q23-31 [Reiner et al., 2001]. Studies have shown that DNA sequence polymorphisms in the $\alpha 2$ gene are linked to expression levels of $\alpha 2\beta 1$ on platelets [Kritzik et al., 1998; Komurcu et al., 2002]. Three alleles can be defined: allele 1 (807T/837T/873A) is associated with increased levels of $\alpha 2\beta 1$, while allele 2 (807C/837T/873G) and allele 3 (807C/837C/873G) are associated with decreased levels of this receptor [Kritzik et al., 1998; Reiner et al., 2001; Santoso, 2001; Konurcu et al., 2002].

The variation in the integrin $\alpha 2\beta 1$ density on the platelet surface might be a major factor that influences bleeding in patients with type I vWD [Di Paola et al., 1999]. Indeed, with study by Di Paola et al., 1999, the frequency of the 807C allele, associated with type I vWD when compared to the normal.

NTPDase (CD39) is a glycosylated, membrane-bound enzyme that hydrolases ATP and ADP to AMP, which is subsequently converted to adenosine by 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) [Pilla et al., 1996]. Both enzymes are present in the platelet membrane and play an important role in the maintenance of normal hemostasis and in prevention of excessive platelet aggregation [Pilla et al., 1996; Araújo et al., 2005].

In addition to the enzymes NTPDase and 5'-nucleotidase there is also a family of enzymes known as ecto-nucleotide pyrophosphatases/ phosphodiesterase (E-NPPs) that has been identified over the last 10 years, which hydrolyzes 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives, resulting in the release of 5'-nucleotide monophosphates [Goding et al., 2003]. The E-NPPs (EC 3.1.4.1) comprehends seven members (NPP1-7), and of these, only three are responsible for the conversion of cyclic AMP to AMP, ATP to AMP and ADP to AMP [Cimpeam et al., 2004].

Platelet adhesion and subsequent aggregation at the site of vascular injury are important mechanisms required to stop bleeding, the other being mediated by the coagulation system, which generates polymerized fibrin [Bouchard et al., 2002]. Stable adhesion is then mediated by several platelet integrin receptors and their ligands. These include the interaction of the $\alpha 2\beta 1$ integrin (GPIIa) with collagen and the $\alpha 11\beta 3$ integrin (GPIIb/IIIa) interaction with fibrinogen and vWF [Ruggeri, 1997].

Studies have shown that platelet levels of $\alpha 2\beta 1$ vary significantly among normal individuals whereas the levels of other integrins do not [Kritzik et al., 1998].

Recently, altered nucleotide hydrolysis in platelets was also observed in studies carried out in our laboratory with diabetic, hypertensive, diabetic/hypertensive [Lunkes et al., 2003], breast cancer [Araújo et al., 2005], hemodialysis patients [Silva et al., 2005], patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes [Duarte et al., 2007] and patients with acute myocardial infarction [Bagatini et al., 2008]. Considering that ADP is the most important promoter of platelet aggregation and adenosine is a powerful inhibitor of this process, in this study it was verified the influence of the von Willebrand disease on platelets NTPDase, 5'-nucleotidase and E-NPPs activities. And, analyze the profile of each patient in response to platelet aggregation and variation in levels of the receptor surface of platelets, the integrin $\alpha 2\beta 1$.

2. Methods

2.1 Patients

Fourteen vWD patients from the Federal University of Santa Maria Hospital were selected for this study. The control group consisted of 14 individual's volunteers with ages similar to those of the patients. Also, the controls used in this study did not present any disease and had not been submitted to any pharmacological therapy during the collection period. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria, protocol number 21/07, Brazil. Samples were collected in tubes with EDTA for the isolation of DNA and in tubes with citrate for the separation of platelets, platelet aggregation and enzyme determinations. The patients consisted of individuals aged 24.5 ± 15.36 years and the control group of individuals aged $27,5 \pm 10,12$ years, 2 individuals are male and 12 female, in both groups. Patients including in this study were diagnosed by the following findings: determination of bleeding times (Ivy's modified template method), vWF antigen (vWF:Ag) and vWF levels.

2.2 Hematological determinations

Quantitative determinations of platelets obtained by venipuncture were performed using a Coulter-STKS analyzer (Miami, USA). PT and APTT were determined with a Coag-a-mate-MTX apparatus (Organ Teknika, Durham, NC, USA).

2.3 Platelet Rich Plasma (PRP) and Platelet Poor Plasma (PPP) for platelet aggregation and Platelet aggregation by ristocetin

To prepare the PRP is centrifuged the sample at approximately 100g for 15 minutes. Take off the PRP with a polypropylene transfer pipette and put it into polypropylene plastic tube. The PPP was obtained is centrifuged sample at approximately 2400g for 20 minutes. Take off the PPP with a polypropylene transfer pipette and put it into polypropylene plastic tube.

The platelet aggregation by ristocetin was evaluated with an optical aggregometer (Chrono-Log, Model 490), 500 μ L of PRP containing around 250.000 platelets/ μ L was placed in a cuvette containing a metal stir bar. In the aggregometer, the stir bar was rotated magnetically at 1100 rpm. PPP was used as a blank for 100% aggregation reference. The aggregation was measured at 37°C after addition of the ristocetin (5 μ L) for a concentration of 1.25 mg/mL. The ristocetin-induced platelet aggregation was evaluated by aggregometer optical (Chronolog) in control group and vWD patients group.

2.4 Isolation and amplification of patient genomic DNA

Genomic DNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells using Ficoll Hypaque density gradient as described by Bell et al. (1981) and Gross-Bellard et al. (1973). The desired segment of the α 2 gene (581kb) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the Eppendorf thermal cycler and Taq polymerase (Invitrogen) by the method of Di Paola et al. (1999). The primers used in the PCR reaction were: (1) 5'- GATTTAACTTTCCCGACTGCCTTC-3' and (2) 5'- CATAGGTTTTTGGGGAACAGGTGG-3'. The PCR cycling conditions were: 94°C x 10 min, 72°C x 1 min, where the annealing temperature was 69°C for two cycles, 67°C for two cycles, and 65°C for 35 cycles. The PCR product is a 581-bp segment located within the intron separating two exons that encode the allelic polymorphisms at 807bp and 873pb. Genomic DNA from individuals homozygous for 807C or 807T served as positive controls.

2.5 Detection and typing of 807T and 807C polymorphism using Bgl II restriction site

Digestion of the PCR product was performed with the restriction enzyme Bgl II based on the method of Di Paola et al., 1999. Briefly, for each 25 μ L PCR reaction, aliquots of 15 μ L were used for digestion reaction, to which was added 5 μ L of 10x restriction buffer, and 1 μ L of Bgl II enzyme (x 2U/mL). The PCR product was digested at 37°C for at least 2 hours and analyzed on a 2.0% agarose gel in 1X tris acetate EDTA (TAE) buffer. The gel was stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet (UV) light.

2.6 Platelet isolation

Platelets were prepared from human donors by the method of Pilla et al. (1996) modified by Lunkes et al. (2003). Briefly, blood was collected into 0.129 M citrate and centrifuged at 160x g for 10 min. The platelet-rich plasma (PRP) was centrifuged at 1400x g for 15 min and washed twice with 3.5 mM HEPES isomolar buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl, and 5.5 mM glucose. The washed platelet was resuspended in HEPES isomolar buffer and protein was adjusted to 0.4 – 0.6 mg/mL.

2.7 LDH measurement

LDH enzyme activities were measured using the kinetic method of the Labquest apparatus (diagnosis Gold Analyser).

2.8 Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method using serum albumin as standard [Bradford, 1976].

2.9 NTPDase and 5'-nucleotidase determinations

Twenty microliters of the PRP preparation (10–15 μ g protein) was added to the reaction mixture of NTPDase or 5'-nucleotidase and preincubated for 10 min at 37°C, to a final volume of 200 μ L. NTPDase activity was determined by the method of Pilla et al. (1996) in a reaction medium containing 5.0 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 60 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1.0 mM. 5'-nucleotidase was determined by the method of Pilla et al. (1996) modified by

Lunkes et al. (2003) in a reaction medium containing 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. NTPDase and 5'-nucleotidase reactions were stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The inorganic phosphate (Pi) released by ATP, ADP and AMP hydrolysis was measured by the method of Chan et al., 1986 using KH₂PO₄ as standard. Controls were prepared to correct for nonenzymatic hydrolysis by adding PRP after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme activities are reported as nmol Pi released/min/mg protein.

2.10 Ecto-NPP activity determination-measurement of p-Nph-5'-TMP hydrolysis in platelets

The ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity from platelets was assessed using p-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (p-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Fürstenau et al. (2006). The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM CaCl₂, pH 8.9, was preincubated with approximately 2 mg per tube of platelet protein for 10 min at 37°C in a final volume of 200 µL. The enzyme reaction was started by the addition of p-Nph-5'-TMP to a final concentration of 0.5 mM. After 80 min of incubation, 200 µL NaOH 0.2 N was added to the medium to stop the reaction. The amount of p-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of $18.8 \times 10^{-3}/M/cm$.

2.11 Statistical analysis

Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Duncan test. Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$

3. Results

Among the findings in this study, the coagulation parameters, PT, APTT and the platelet count were not significantly when compared to the control group, as can be seen in Table 1.

The results for ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA), were reduced in some patients and normal in others, in patients with vWD the average aggregation

was 77.09% (50%-102%), while in the control group the average was 92.54% (81%-101%), this reduction was statistically significant compared to the control group, as shown in Table 2.

The amplified product of the PCR from the 807T allele and spanning the Bgl II site can be digested with Bgl II to generate two fragments. Bgl II digestion of the 581 bp PCR product amplified from genomic DNA of an individual heterozygous for these alleles yields three fragment (Fig. 1). Genomic DNA from 14 individuals with vWD were analyzed, and these results compared with the control group (n=13). Among the 14 vWD patients, genotypic frequencies are 42.86% (n=6) for 807CT and 57.14% (n=8) 807CC when compared with the frequencies between the control group was found 69.23% (n=9) for 807CT and 30.77% (n=4) 807CC, as seen in Table 3. The frequencies among the vWD patients are 78.57% for allele 807C and 21.43% for 807T, and for the control group, it was observed allelic frequencies of 65.38% for 807C and 34.62% for 807T.

The activity of lactate dehydrogenase (LHD) was used as a marker for measuring cell integrity. The measurements of LDH activity showed that most cells (approximately 90%) were intact after the isolation procedure (data not shown).

NTPDase and 5' nucleotidase activities in platelets are shown in Fig. 2. ATP hydrolysis was significantly decreased in vWD patient group when compared with the control group (Fig. 2A) ($P < 0.05$). Similar results were observed for ADP hydrolysis (Fig. 2B) ($P < 0.05$). ATP hydrolysis of was 43.49% lower in patients with vWD compared to the control group, and the hydrolysis of ADP was 32.61% lower compared to the control group. AMP hydrolysis was not significantly altered by vWD, showing a small increase in relation to control group (Fig 2C) ($P < 0.05$).

E-NPP activity from platelet was significantly decreased in vWD patient group when compared with the control group ($P < 0.05$), as can be seen in Fig. 3. The reduction of enzyme activity of E-NPP was 24.5% lower in patients with von Willebrand's disease when compared with the control group.

4. Discussion

VWD is the most frequent bleeding disorder, with an estimated prevalence in general population around 1% [Tosetto et al., 2007]. The distribution of vWD types is

60-80% type I, 7-30% type II and 5-10% type III [Tosetto et al., 2007; Ramasamy, 2004]. According to the Ministry of Health, 2006, based on studies of population screening, the prevalence of vWD in Brazil varies between 0.8% e 2%. The bleeding symptoms vary with the type of the disease. Defects in vWF can cause bleeding by impairing platelet adhesion or by reducing the concentration of FVIII. Many of these bleeding symptoms are exacerbated by defects in vWF, but the magnitude of these effects are still unknown [Nichols et al., 2008].

In vWD patients the Ristocetin-induced platelet aggregation a test is discriminatory used with other tests to classify among the subtypes of the disease. This analysis is not part of routine of Federal University of Santa Maria Hospital, it was included in our study, but the results are not sufficient to classify patients according to subtypes of the disease. RIPA is a test in which differences of ristocetin concentrations (from to 0.2 to 1.5mg/ml) is added to the PRP of the patient to evaluate the affinity of vWF for platelet [Trasi et al., 2005; Nichols et al., 2008]. Ristocetin-induced platelet aggregation and multimeric analysis are confirmatory tests [Giannini et al., 2007]. In our study, ristocetin was used in a final concentration of 1.25 mg/mL, according to the methodology described, the percentage values were reduced when compared with controls, as can be seen in Table 3.

Under study by the Italian Working Group 1977, the RIPA can vary with the concentration of ristocetin and with the type of the disease. This test is undetectable with any ristocetin concentrations in vWD type 3, but may be normal in patients with vWD type 1. RIPA usually is very low or absent in vWD type 2A and type 2M. In vWD type 2B, platelet aggregation occurs at low concentrations of ristocetin (<0.6mg/mL) that may have no effect on normal Platelet Rich Plasma.

Patients with type1, 2A and 2M vWD had significantly reduced RIPA to autologous platelets as compared to that occurring in samples from control subjects, in contrast, patients with type 2B vWD showed increased binding of vWF to platelets [Giannini et al., 2007].

Patients with vWD may have a mild, moderate, or severe bleeding tendency since early childhood, usually proportional to the degree of the vWF defect [Saldler et al., 2000; Nichols et al., 2008]. Platelet adhesion and subsequent aggregation at the site of vascular injury are one of two keys mechanisms required to stop bleeding, the other being mediated by the coagulation system, which generates polymerized fibrin [Ni et al., 2003]. The stable adhesion is then mediated by several platelet integrin

receptors and their ligands, these include the interaction of the $\alpha 2\beta 1$ (GPIIa) with collagen. This receptor is a variation of density that is associated with differential inheritance of three alleles of the human $\alpha 2$ gene [Kritzik et al., 1998].

In the present study, we analyze the $\alpha 2$ gene of the $\alpha 2\beta 1$ integrin and find out predominance the gene frequencies of the 807CC and 807CT alleles in the vWD patients and control group, respectively (Fig. 1). Hereditary variation in platelet levels of $\alpha 2\beta 1$, defined by the existence of multiple alleles of the gene that are associated with variable $\alpha 2\beta 1$ expression levels, could therefore have a significant impact on platelet function, contributing to an increased risk of thrombosis or bleeding in relevant disease states [Kritzik et al., 1998]. Individuals with low receptor densities are homozygous for the 807C allele, whereas individuals homozygous for the 807T allele have high receptor densities [Kunick et al., 1997]. This polymorphism could therefore present a genetic predisposition for the development of thrombotic disease and homeostasis [Konurcu et al., 2002].

According to studies by Reiner et al., 1998 and Dinauer et al. (1999), it has been reported the 807T allele frequency is the range of 35% among Caucasians, is slightly less common among African Americans and more common among native Americans. The glycoprotein Ia 807T variant has been evaluated as a risk factor for other clinical outcomes related to coronary thrombosis as well other thrombotic disorders, already the frequency 807CT allele is not related to risk of venous thrombotic disease.

Di Paola et al. (1999), found an increased prevalence of the C allele (low platelet $\alpha 2\beta 1$ density) in type 1 vWD patients, suggesting that this polymorphism contributed to disease severity. Our study showed that the C allele was predominant but the group of patients with vWD who participated in the study is not classified according to the subtype of the disease.

When a vascular injury is present, the glycoprotein GPIb/V/IX complex binds to vWF, allowing the adhesion of other platelets. This binding induces the secretion of ADP [Canobbio et al., 2004; Farndale et al., 2004; Gibbins, 2004; Kasirer-Friede et al., 2004], ATP, Ca^{2+} and serotonin [Robson et al., 2000]. This hyperactivity in the endothelium is one of the damaged endothelial cells express the surface nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1, EC 3.6.1.5, CD39) and 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) [Marcus et al., 1991; Kaczmarek et al., 1996; Marcus et al., 1997; Di Virgilio et al., 2001].

In the present study, the results showed a reduction in ATP and ADP hydrolysis in patients with vWD when compared with the control group while the AMP hydrolysis had a tendency to increase.

Platelets represent an important source of nucleotide ATP and ADP that act in platelet aggregation. These nucleotides regulate the homeostasis through the activation and cooperation of three purinergic receptors of platelet, denominate of P2X and P2Y [Di Virgilio et al., 2001]. The concentration of these nucleotides depends on the quantity that is released, the dilution in extracellular space and the activity of ectonucleotidases [Gordon, 1986].

The present results showed an decreased in ATP and ADP hydrolysis in platelets of patients with vWD when compared with the control group, however the AMP hydrolysis was not statistically significant (Fig 2). Probably, the reduction in the hydrolysis of ATP and ADP is due to decreased platelet adhesion in patients with vWD due to deficiency of quantity or quality of vWF molecule. As the molecule is responsible for platelet adherence the platelet aggregation is reduced. But the mild increase in hydrolysis of AMP, run to greater production of adenosine which in turn promotes the inhibition of platelet aggregation.

The ATP and ADP show to regulate homeostasis through the activation of platelet P2 receptors; ADP is a major platelet recruiting factor originating from platelet dense granules during activation, whereas ATP derived from the same sourced has been considered a competitive antagonist of ADP for platelet P2Y1 receptor [Robson et al., 2000].

In our laboratory, the activities of these enzymes (NTPDase and 5'-nucleotidase) have been studied in several diseases such as: diabetes [Lunkes et al., 2003], chronic renal failure [Silva et al., 2005], breast cancer [Araújo et al., 2005], myocardial infarction [Bagatini et al., 2008] and hypercholesterolemia [Duarte et al., 2007].

In the present study, E-NPP activity decreased slightly compared with control group (Fig. 3). E-NPPs are frequently altered by pathological situations where their activity may become, together with other biological and clinical examinations, a useful tool for evaluating the disease progression [Kunick et al., 1997]. In previous study, our laboratory demonstrated that cervical cancer patients presented altered E-NPP activity in platelet [Maldonado et al., 2007]. Whereas ectonucleotidase as well as the E-NPP are enzymes that hydrolyze extracellular nucleotides to their respective

nucleosides, it has been suggested that E-NPP reduction in platelet is related to reduce activity of NTPDase.

In conclusion, our study demonstrated that the hydrolysis of adenine nucleotides is modified in platelets from patients with von Willebrand disease. The deficiency quantity or qualitative of the von Willebrand factor, defects in vWF may assume different clinical expressions. Signs and symptoms vary intensity, producing different disease sub-types. These results allow us to suggest that this deficiency interferes in hemostasis, thus proving that ATP, ADP and AMP hydrolysis has an important role in the thromboregulation process. And the $\alpha 2$ gene polymorphism determines the predisposition to bleeding disorders or thrombotic processes.

5. Acknowledgement

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

6. References

Andrews RK, Berndt M. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Research* 2004;114:447-453.

Araújo MC, Rocha JB, Morsch A, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005,1740:421-426.

Bagatini MD, Martins CC, Battisti V, et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. *Clinical Biochemistry* 2008;41:1181-1185.

Bell GI, Karam JH, Rutter WJ. Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981;78:5759-63.

Bouchard BA, Butenas S, Mann KG, et al. Interactions between platelets and the coagulation system. *Platelets* 2002;48:229-253.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:218-54.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de diagnóstico e tratamento da doença de Von Willebrand. 2006;1-44.

Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cellular Signalling* 2004;16:1329-34.

Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986;157:375-80.

Cimpean A, Stefan C, Gijsbers R, et al. Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. *The Biochemical Journal* 2004;381:71-77.

Di Paola J, Federici AB, Mannucci PM, et al. Low platelet $\alpha 2\beta 1$ levels in type I von Willebrand disease correlate with impaired platelet function in a high shear stress system. *Blood* 1999;93:3578-82.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001;97: 587–600.

Dinauer DM, Friedman KD, Hessner MJ. Allelic distribution of the glycoprotein Ia (α 2 integrin) C807T/G873A dimorphisms among Caucasian venous thrombosis patients and six racial groups. *British Journal of Haematology* 1999;107:563-565.

Duarte MMF, Loro VL, Rocha JBT, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory process. *FEBS Journal* 2007;274:2707-2714.

Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, et al. The role of collagen in thrombosis and haemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis* 2004;2:561-73.

Fürstenau CR, Trentin DS, Barreto-chaves MLM, et al. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as a part of multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 2006;17:84-91.

Giannini S, Mezzasoma AM, Leone M et al. Laboratory diagnosis and monitoring of desmopressin treatment of von Willebrand's disease by flow cytometry. *The Hematology Journal* 2007;92:1647-1654.

Gibbins JM. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. *Journal of Cells Science* 2004;117:3415-25.

Goding JW, Grobbs B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1638:1-19.

Gordon J. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochemical Journal* 1986;233:309-319.

Gross-Bellar M, Oudet P, Chambon P. Isolation of High-Molecular-Weight DNA from mammalian cells. *European Journal Biochemistry* 1973;36:32-38.

Italian Working Group. Spectrum of von Willebrand disease: a study of 100 cases. *British Journal of Haematology* 1977;35:101-112.

Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny, J. et al. Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *Journal Biological Chemistry* 1996;271: 33116–33122.

Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, et al. Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. *Blood* 2004;103:3403-11.

Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 2000;6:2157-2162.

Konurcu E, Erginel-Unaltuna N. Platelet glycoprotein Ia 807C/T (Phe224) and 873G/A (Thr246) dimorphisms in Turkey. *American Journal of Hematology* 2002;69:83-84.

Kritzik M, Savage B, Nugent DJ, et al. Nucleotide polymorphisms in the $\alpha 2$ gene define multiple alleles that are associated with differences in platelets $\alpha 2\beta 1$ density. *Blood* 1998;7:2382-88.

Kunick TJ, Kritzik M, Annis DS, et al. Hereditary variation in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ density is associated with two silent polymorphisms in the $\alpha 2$ gene coding sequence. *Blood* 1997;89:1939-1943.

Lunkes G, Lunkes D, Morsch VM, et al. NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan-induced diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2004;65:1-6.

Lunkes GL, Lunkes D, Stefanello F, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research* 2003;109:189-94.

Maldonado PA, Corrêa MC, Becker LV, et al. Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. *Clinical Biochemistry* 2008;41:400-406.

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH et al. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99:1351-1360.

Marcus AJ, Broekmann MJ, Drosopoulos JFH, et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase 1). *Journal of thrombosis and haemostasis* 2003;1:2497-2509.

Marcus AJ, Safir LB, Hajjar KA. Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase: thromboregulation by endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 1991;88:1690-1696.

Ni H, Freedmann J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfusion and Apheresis Science* 2003;28:257-264.

Nichols WL, Hultin MB, James AH, et al. Von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008;14:171-232.

Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996;7:225-30.

Ramasamy I. Inherited bleeding disorders: disorders of platelet adhesion and aggregation. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2004;49:1-35.

Reiner AP, Aramaki KM, Teramura G et al. Analysis of platelet glycoprotein Ia ($\alpha 2$ integrin) allele frequencies in three North American populations reveals genetic association between nucleotide 807C/T and amino acid 505 Glu/Lys (HPA-5) dimorphisms. *Thrombosis and Haemostasis* 1998;80:449-56.

Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Platelet glycoprotein gene polymorphisms and risk of thrombosis: facts and fancies. *Reviews in clinical and experimental hematology* 2001;53:262-287.

Reininger AJ. VWF attributes – impact on thrombus formation. *Thrombosis Research* 2008;4:S9-S13.

Robson SC, Sévigny J, Imai M, et al. Thromboregulatory potential of endothelial CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase: modulation of purinergic signaling in platelets. *Cardiovascular & Renal* 2000;2:1-17.

Rücker B, Almeida ME, Liberman TA, et al. Biochemical characterization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP, E.C. 3.1.4.1) from rat heart left ventricle. *Molecular and cellular biochemistry* 2007;306:247-254.

Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Trombosis Haemostasis* 1997;78:611-616.

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, et al. Impact, Diagnosis and Treatment of Von Willebrand disease. *Thrombosis Haemostasis* 2000;84:160-74.

Santoso S. Platelet polymorphisms in thrombotic disorders. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine* 2001;8:261-266.

Silva AC, Morsch A, Zanin R, et al. Enzymes that hydrolysis adenine nucleotides in chronic renal failure: relationship between defects and renal failure severity. *Biochimica Biophysica Acta* 2005;1741:282-288.

Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score. *Blood* 2007;21:89-97.

Totonchi A, Eshraghi Y, Beck D, et al. Von Willebrand Disease: screening, Diagnosis, and Management. *Aesthetic Surgery Journal* 2008;2:189-194.

Trasi S, Shetty S, Ghosh K, et al. Prevalence & spectrum of von Willebrand disease from western India. *The Indian Journal of Medical Research* 2005;121:653-658.

Vischer UM, Wollheim CB. Purine nucleotides induce regulated secretion of von Willebrand factor: Involvement of cytosolic Ca^{2+} and cyclic adenosine monophosphate-dependent signaling in endothelial exocytosis. *Blood* 1998;1:118-127.

Zimmermann H. Nucleotides and CD39: Principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. *Nature America Inc* 1999;9:987-988.

Table 1: Coagulation parameters

<i>Coagulation parameters</i>	<i>vWD (n=14)</i>
PT (Prothrombin time)	17,02 ± 8,47
APTT (Activated Partial Thromboplastin time)	42,00 ± 14,96
Platelets count	274,58 ± 57,77

The results are expressed as mean ± standard deviation

PT: Standard value was considered as 100% activity (seconds)

APTT: Standard value was 28s (seconds).

PT and APTT reference values are used as parameters, for healthy people, at the Federal University of Santa Maria Hospital.

Platelets count: 200-400 10^3mm^3 (reference values).

Ratio for APTT of controls: < 1,2

Ratio mean APTT of vWD patients: 2,04

Table 2: Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA)

<i>Groups</i>	<i>Platelet aggregation induced by ristocetin (%)</i>
Controls	92,54 ± 6,00
vWD	77,09 ± 16,49*

The results are expressed in percentage

The results are expressed as mean ± standard deviation ($P < 0.05$)

(*) Indicates a significant difference at $P < 0.05$.

Table 3: Distribution of platelet membrane glycoprotein polymorphism genotypes in controls and von Willebrand disease patients

<i>Genotype</i>		<i>Controls % (n)</i>	<i>vWD % (n)</i>
C807T	CC	30,77 (4)	57,14 (8)
	CT	69,23 (9)	42,86 (6)
	TT	0	0

CC: homozygous

CT: heterozygous

TT: homozygous

Fig 1.

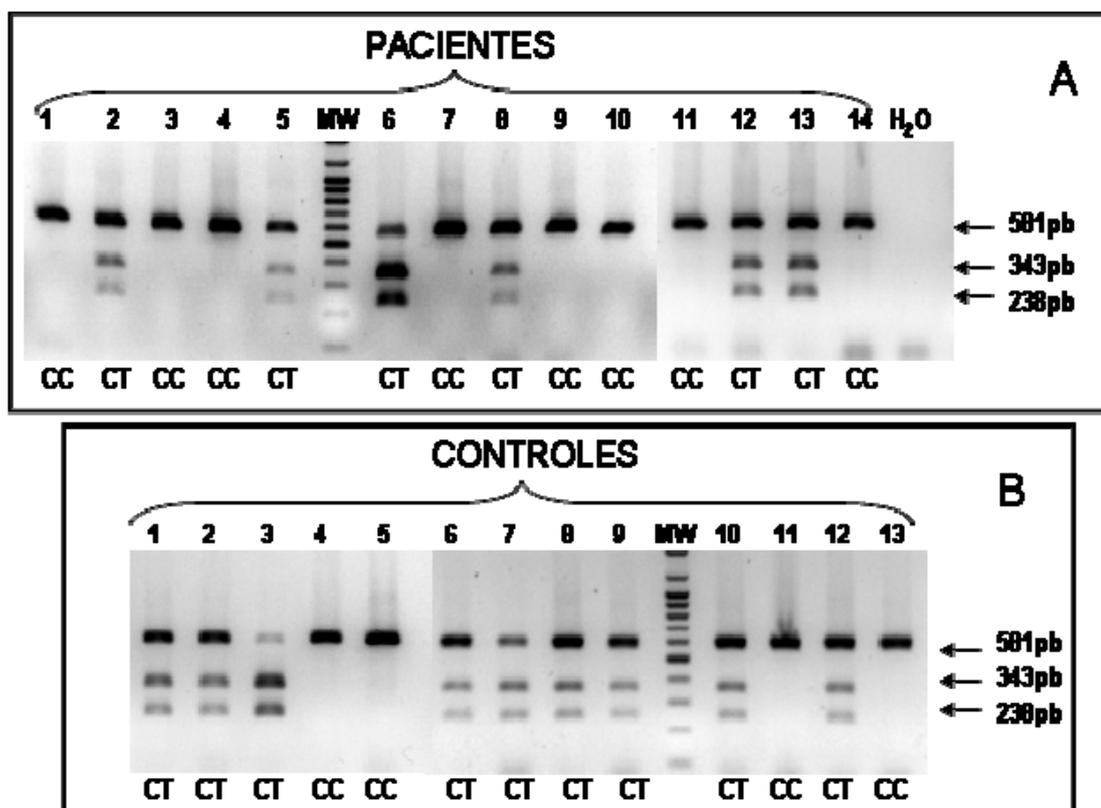
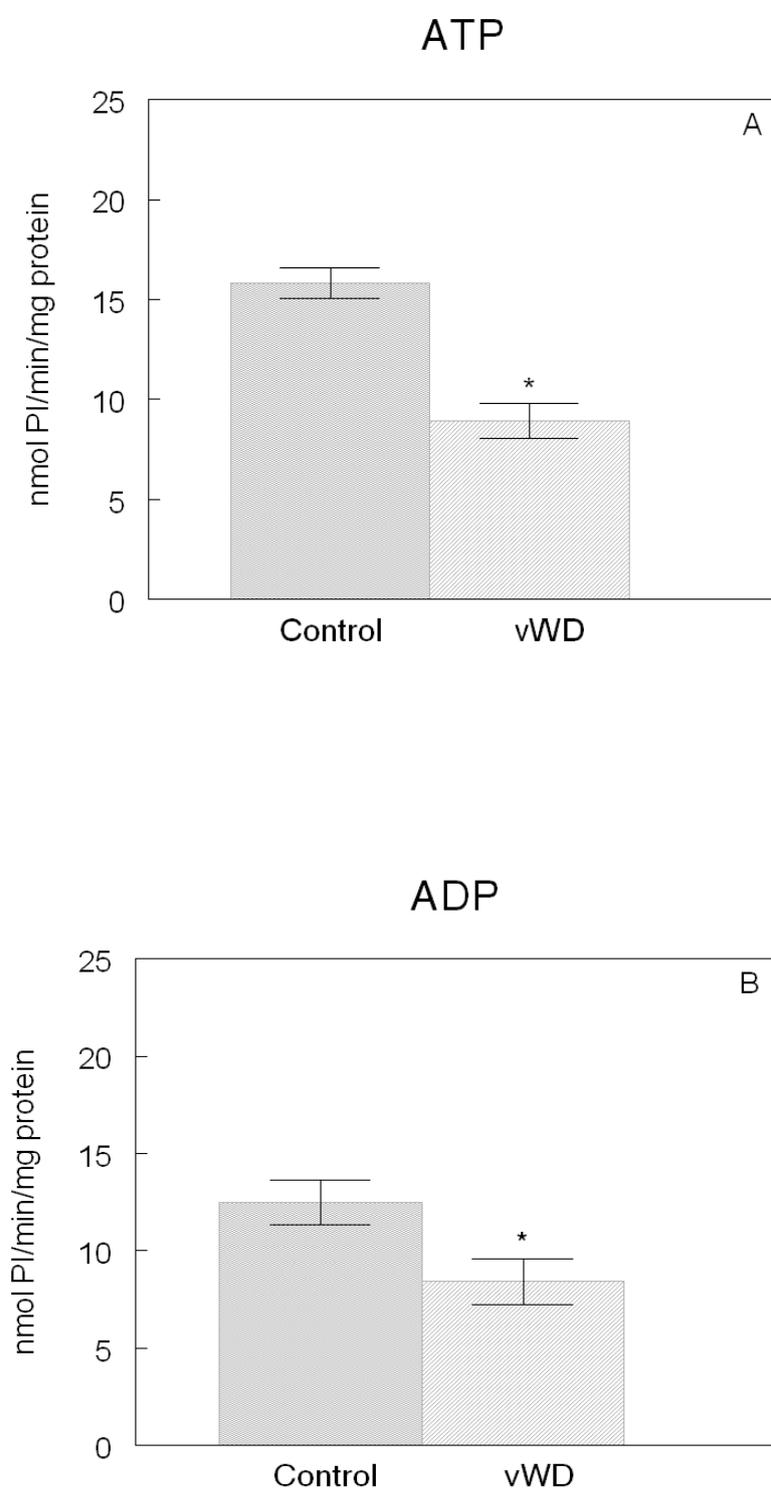


Fig 2.



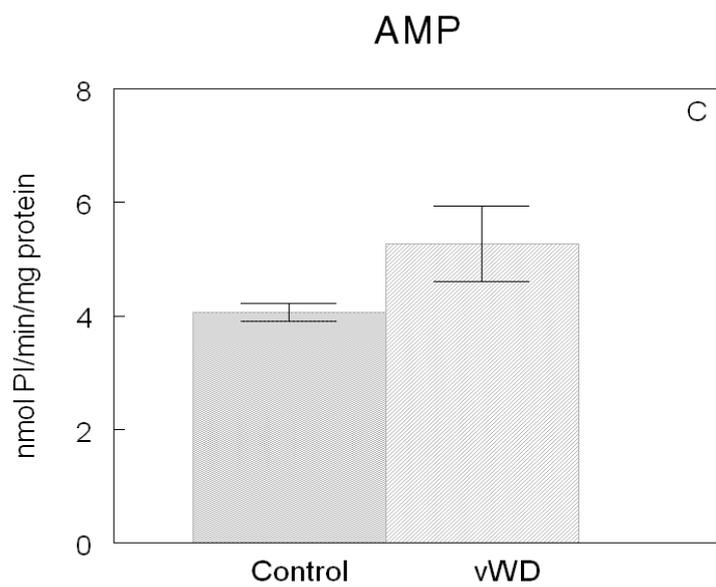


Fig 3.

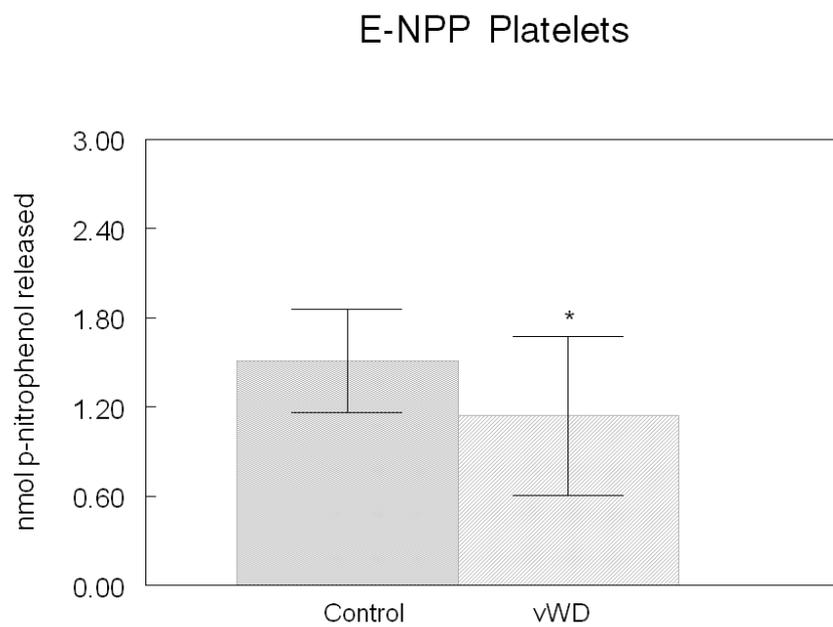


Fig 1. Bgl II digest of the 581-bp PCR amplified from genomic DNA from fourteen patients with vWD (A) and thirteen individuals the control group (B). The MW is 100pb.

Fig 2. NTPDase activity in platelets using ATP (A), ADP (B) as substrate and 5'-nucleotidase activity in platelets using AMP (C) as substrate, from von Willebrand disease patients and control group. The results are presented as mean±standard deviation. (*) Indicates a significant difference at $P<0.05$.

Fig 3. E-NPP activity in the platelets of patients with von Willebrand disease, and control group. The results are presented as mean±standard deviation. (*) Indicates a significant difference at $P<0.05$.

4. DISCUSSÃO

A doença de Von Willebrand é o transtorno hemorrágico mais freqüente, com uma prevalência estimada em torno de 1% na população geral (TOSETTO et al., 2007). No Brasil, de acordo com dados do Registro Nacional de Pacientes com Coagulopatias Hereditárias, até o final do ano de 2007 havia 2.333 casos de DvW diagnosticados, sendo destes 206 casos no Rio Grande do Sul (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2008). Esses dados justificam o pequeno número de pacientes que fizeram parte desse estudo, já que as coletas foram realizadas apenas no município da região central do Estado, Santa Maria. Outro dado encontrado em nosso estudo foi a prevalência de mulheres no grupo, correspondendo a 85,71% dos sujeitos do estudo, correspondendo aos dados do Ministério da Saúde, onde dos 206 casos registrados no Rio Grande do Sul, 126 são do sexo feminino.

Os sintomas hemorrágicos desta doença variam de acordo com o tipo da doença. Os defeitos na molécula do FvW podem ser responsáveis pelos sangramentos devido a adesão plaquetária prejudicada ou pela redução da concentração do FVIII (NICHOLS et al., 2008). O grupo estudado era apenas diagnosticado como portador da DvW, nenhum paciente teve o seu tipo e subtipo da doença caracterizado. Dos 206 casos do Estado, nenhum deles foi informado o tipo ou subtipo da doença (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2008).

Em pacientes com a DvW o teste de agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA) é discriminatório, utilizado com outros testes para classificar a doença entre os tipos e subtipos. Como esta análise não faz parte da rotina de exames do Hospital da Universidade Federal de Santa Maria, optou-se pela inclusão da mesma em nosso estudo. No entanto, os resultados encontrados não são suficientes para classificar os pacientes de acordo com os subtipos da doença. A RIPA é um teste em que diversas concentrações de ristocetina (a partir de 0,2 a 1.5mg/ml) são adicionadas ao PRP do paciente para avaliar a afinidade do FvW pelas plaquetas (TRASI et al., 2005, NICHOLS et al., 2008). A agregação plaquetária induzida pela ristocetina e a análise multimérica são testes confirmatórios do diagnóstico da DvW (GIANNINI et al., 2007). Em nosso estudo, a ristocetina foi utilizada na concentração final de 1,25 mg/mL, de acordo com a metodologia

descrita, os valores percentuais encontraram-se reduzidos quando comparados com os controles, como pode ser visto na Tabela 2.

De acordo com estudo realizado pelo Grupo de Trabalho Italiano (1977), a RIPA pode variar com a concentração de ristocetina e com o tipo da doença. Este teste é indetectável com qualquer concentração de ristocetina em pacientes com DvW tipo 3, mas pode ser normal em pacientes com DvW tipo 1. A RIPA é geralmente muito baixa ou ausente em pacientes com DvW tipo 2A e tipo 2M. Em pacientes com DvW tipo 2B, a agregação plaquetária ocorre em baixas concentrações de ristocetina (<0.6mg/mL) que pode ter qualquer efeito sobre PRP normal. Em relação aos dados encontrados em nosso estudo, o perfil de agregação dos pacientes portadores da DvW foram reduzidos quando comparados com o grupo controle, com perfis de agregação entre valores normais e levemente reduzidos, o que pode-se sugerir que a maioria do grupo estudado seja portador da DvW tipo 1, a com maior prevalência entre os tipos desta patologia.

Os pacientes com DvW podem ter uma leve, moderada ou severa tendência hemorrágica desde a infância, geralmente proporcional ao grau do defeito do FvW (SALDLER et al., 2000, NICHOLS et al., 2008). A adesão plaquetária e subsequente agregação plaquetária no local da lesão vascular é um dos dois mecanismos chaves necessários para parar a hemorragia, sendo o outro mediado pelo sistema de coagulação, que gera fibras de fibrina polimerizadas (NI et al., 2003). A adesão plaquetária estável é mediada por diversos receptores na superfície de plaquetas, as integrinas e seus ligantes, estes incluem a interação da integrina $\alpha 2\beta 1$ (GPIIb/IIIa) com o colágeno. Este receptor possui variação de densidade que é associada com a herança de três alelos diferentes do gene humano $\alpha 2$ (KRITZIK et al., 1998). No presente estudo, analisamos o gene $\alpha 2$ da integrina $\alpha 2\beta 1$ e verificamos o predomínio das freqüências genotípicas 807CC e 807CT nos pacientes com DvW e grupo controle, respectivamente (Fig. 1). Variações hereditárias nos níveis de $\alpha 2\beta 1$ em plaquetas são definidas pela existência de múltiplos alelos do gene que estão associados com níveis variáveis de expressão de $\alpha 2\beta 1$. Portanto, poderia ter um impacto significativo sobre a função plaquetária, contribuindo para um aumento do risco de trombose ou hemorragia em estados patológicos relevante (KRITZIK et al., 1998). Indivíduos com baixas densidades receptores são homozigotas para o alelo 807C, enquanto que indivíduos homozigotos para o alelo 807T receptores têm alta densidade (KUNICK et al., 1997). Este polimorfismo poderia, portanto, apresentar

uma predisposição genética para o desenvolvimento de doenças trombóticas e hemorrágicas (KOMURCU et al., 2002).

De acordo com estudos realizados por Reiner et al., 1998 e Dinauer et al., 1999, foi relatado que a frequência do alelo 807T é o estimado em 35% entre os brancos, é um pouco menos comum entre os Africanos e mais comum entre os Americanos nativos. A glicoproteína Ia, variante 807T tem sido avaliada como um fator de risco para outros desfechos clínicos relacionados com a trombose coronariana, assim como de outros distúrbios trombóticos, já a frequência alélica 807CT não é relacionado ao risco de doença venosa trombótica.

Di Paola et al., 1999, encontrou um aumento da prevalência do alelo C (baixa densidade plaquetária $\alpha 2\beta 1$) em pacientes com DvW tipo 1, sugerindo que este polimorfismo contribuiu para severidade das manifestações clínicas. Em nosso estudo constatou-se que o alelo C foi predominante, porém o grupo de pacientes com DvW participantes do estudo não foi classificado de acordo com o subtipo da doença.

Quando ocorre uma lesão vascular, há um recrutamento de plaquetas e a ligação dos seus devidos receptores as proteínas circulantes, essa ligação induz a liberação de ADP (CANOBBIO et al., 2004; FARNDALÉ et al., 2004; GIBBINS, 2004; KASIRER-FRIEDE et al., 2004), ATP, Ca^{2+} e serotonina (ROBSON et al., 2000). Com a liberação destes componentes há uma hiperatividade no endotélio que faz com que as células endoteliais injuriadas expressem na sua superfície nucleosídeo trifosfato diphosphohidrolase (NTPDase 1, CD39) e 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) (MARCUS et al., 1991; KACZMAREK et al., 1996, MARCUS et al., 1997; DI VIRGILIO et al., 2001).

As plaquetas representam uma importante fonte dos nucleotídeos ATP e ADP, que atuam na agregação plaquetária. Estes nucleotídeos regulam a homeostase através da ativação e da cooperação entre três receptores de plaquetas purinérgicos, denominados de P2X e P2Y (DI VIRGILIO et al., 2001). A concentração destes nucleotídeos depende da quantidade em que são liberados, da diluição no espaço extracelular e da atividade das ectonucleotidasas (GORDON, 1986).

Os resultados mostram que a hidrólise de ATP e ADP são correspondentes, ambas diminuíram enquanto que a hidrólise do AMP aumentou (de forma não significativa), em plaquetas de pacientes com DvW quando comparadas grupo

controle (Fig. 2). Provavelmente, a redução da hidrólise de ATP e ADP deve-se à adesão plaquetária reduzida em pacientes com DvW devido a deficiências quantitativas ou qualitativas da molécula do FvW. Como esta molécula é responsável pela adesão plaquetária, a agregação plaquetária é reduzida. Mas, sugere-se que o ligeiro aumento na hidrólise do AMP relacione-se com uma maior produção de adenosina, que, por sua vez, promove a inibição da agregação plaquetária.

Em nosso grupo de pesquisa, as atividades das enzimas, NTPDase e 5'-nucleotidase, foram estudadas em várias doenças como: diabetes (LUNKES et al., 2003), insuficiência renal crônica (SILVA et al., 2005), câncer de mama (ARAÚJO et al., 2005), infarto do miocárdio (BAGATINI et al., 2008) e hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2007), porém ainda não havia sido realizado nenhum estudo que relacionasse a atividade destas enzimas com uma doença de caráter hemorrágico como a DvW.

No presente estudo, a atividade da E-NPP diminuiu ligeiramente em comparação com o grupo controle (Fig. 3). As E-NPPs são freqüentemente alteradas por situações patológicas onde a sua atividade pode tornar-se, juntamente com outros exames clínicos e biológicos, uma ferramenta útil para avaliar a progressão da doença (KUNICK et al., 1997). Em estudo realizado em nosso laboratório demonstrou-se que pacientes com câncer cervical apresentam atividade de E-NPP alterada em plaquetas (MALDONADO et al., 2007). Considerando que as ectonucleotidases, bem como a E-NPP, são enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares aos seus respectivos nucleosídeos, sugere-se que a inibição da E-NPP em plaquetas esteja relacionada à redução da atividade da NTPDase.

Em conclusão, nosso estudo mostrou que a hidrólise de nucleotídeos da adenina esta alterada em plaquetas de pacientes com doença de von Willebrand. A deficiência qualitativa ou quantitativa do fator de von Willebrand pode assumir diferentes expressões clínicas e os sintomas podem variar de intensidade, caracterizando diferentes subtipos de doença. Estes resultados nos permitem sugerir que deficiências qualitativa ou quantitativas do FvW interferem na hemostasia, provando assim que a hidrólise de ATP, ADP e AMP possuem um papel importante no processo de tromborregulação. Além disso, cabe ressaltar que o polimorfismo do gene $\alpha 2$ determina a predisposição para doenças hemorrágicas ou processos trombóticos, porém mais estudos se fazem necessários.

5. CONCLUSÕES

- Ocorreu uma redução da atividade das enzimas NTPDase e E-NPP e um aumento não significativo estatisticamente da atividade da 5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com DvW, quando comparados ao grupo controle. As mudanças nas atividades destas enzimas podem estar relacionadas com o fato destes pacientes terem um processo de adesão plaquetária deficiente devido à deficiência quantitativa ou qualitativa da molécula do fator de von Willebrand.
- Observou-se que o perfil de agregação plaquetária induzida pela ristocetina em pacientes com DvW foi reduzida, de forma geral, em comparação com o grupo controle. O perfil de agregação nos pacientes portadores da DvW varia de acordo com o tipo e subtipo da doença.
- Houve um predomínio da frequência alélica 807CC no grupo de pacientes com a DvW. Acredita-se que esta prevalência deva-se ao caráter hemorrágico da doença. De acordo com estudos há uma relação entre o predomínio do alelo C e pacientes com a DvW tipo 1.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2007. **Brasília: Editora do Ministério da Saúde**, v. 1, p. 1-56, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de diagnóstico e Tratamento da doença de Von Willebrand. **Brasília: Editora do Ministério da Saúde**, v. 1, p. 1-44, 2006.

CANOBBIO, I.; BALDUINI, C.; TORTI, M. Signaling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. **Cellular Signalling**, v. 16, p. 1329-1334, 2004.

CASTRO, H.C.; FERREIRA, B.L.A.; NAGASHIMA, T.; SCHUELER, A.; RUEFF. C.; CAMISASCA, D.; MOREIRA, G.; SCOVINO, G.; BORGES, L.; LEAL, M.; FIGUEIRA, M.; PASCHOAL, P.; BERNARDO, V.; BOURGUINHON, S.; RODRIGUES, C.R.;

SANTOS, D.O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 321-332, 2006.

CIMPEAN, A.; STEFAN, C.; GIJSBERS, R.; STALMANS, W.; BOLLEN, M. Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. **The Biochemical Journal**, v. 381, p. 71-77, 2004.

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

DI PAOLA, J.; FEDERICI, A. B.; MANNUCCI P. M.; CANCIANI, M.T.; KRITZIK, M.; KUNICKI, T.J.; NUGENT, D. Low platelet $\alpha 2\beta 1$ levels in type 1 von Willebrand disease correlate with Impaired platelet function in a High Shear Stress System. **Blood**, v. 93, p. 3578-3582, 1999.

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

DINAUER, D.M.; FRIEDMAN, K.D.; HESSNER, M.J. Allelic distribution of the glycoprotein Ia ($\alpha 2$ -integrin) C807T/G873A dimorphisms among Caucasian venous thrombosis patients and six racial groups. **British Journal of Haematology**, v. 107, p. 563-565, 2001.

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

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

FARNDAL, R.W.; SIXMA, J.J.; BARNES, M.J.; DE GROOT, P.G. The role of collagen in thrombosis and haemostasis. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 2, p. 561-573, 2004.

FAVALORO E.J. Laboratory assessment as a critical component of the appropriate diagnosis and sub-classification of Von Willebrand's disease. **Blood Reviews**, v. 13, p. 185-204, 1999.

FEDERICI, A.B.; MANNUCCIO, P.M. Advances in the genetics and treatment of von Willebrand disease. **Hematology and oncology**, v. 14, p. 23-33, 2002.

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

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

GIANNINI S., MEZZASOMA A.M., LEONE M.; GRESELE, P. Laboratory diagnosis and monitoring of desmopressin treatment of von Willebrand's disease by flow cytometry. **The Hematology Journal**, v. 92, p. 1647-1654, 2007.

GIBBINS, J.M. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 3415-3425, 2004.

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

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

GORDON, J. Extracellular ATP: effects, sources and fate. **Biochemical Journal**, v. 233, p. 309-319, 1986.

GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 391-398, 2006.

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

HYNES, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v.110, p. 673-687, 2002.

ITALIAN WORKING GROUP. Spectrum of von Willebrand disease: a study of 100 cases. **British Journal of Haematology**, v. 35, p. 101-112, 1977.

JOAO, C. Doença de Von Willebrand. **Medicina Interna**, v. 8, p. 28-36, 2001.

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

KAHNER, B.N.; SHANKAR, H.; MURUGAPPAN, S.; PRASAD, G.L.; KUNAPULI, S.P. Nucleotide receptor signaling in platelets. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 4, p. 2317-2326, 2006.

KASIRER-FRIED, A.; COZZI, M.R.; MAZZUCATO, M.; DE MARCO, L.; RUGGERI, Z.M.; SHATTIL, S. Signaling through GP Ib-IX-V activates $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ independently of other receptors. **Hemostasis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 103, p. 3403-3411, 2004.

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

KOMURCU E., ERGINEL-UNALTUNA N. Platelet glycoprotein Ia 807C/T (Phe224) and 873G/A (Thr246) dimorphisms in Turkey. **American Journal of Hematology**, v. 69, p. 83-84, 2002.

KOZIAK, K.; SEVIGNY, J.; ROBSON, S.C.; SIEGEL, J.B.; KACSMAREK, E. Analysis of CD39/ATP Diphosphohydrolase (ATPDase) expression in the endothelial cells, platelets and leucocytes. **Thrombosis Haemostasis**, v.82, p. 1538-1544, 1999.

KRITZIK, M.; SAVAGE, B.; NUGENTS, D. J.; SANTOSO, S.; RUGGERI, Z.M.; KUNICKI, T.J. Nucleotide polymorphisms in the α2 gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ density. **Blood**, v. 92, p. 2382-2388, 1998.

KULKARNI, S.; DOPHEIDE, S.M.; YAP, C.L.; RAVANAT, C.; FREUND, M.; MANGIN, P.; HEEL, K.A.; STREET, A.; HARPER, I.S.; LANZA, F.; JACKSON, S. A

revised model of platelet aggregation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 783-791, 2000.

KUNICK, T.J.; KRITZIK, M.; ANNIS, D.S.; NUGENT, D.J. Hereditary variation in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ density is associated with two silent polymorphisms in the $\alpha 2$ gene coding sequence. **Blood**, v. 89, p. 1939-1943, 1997.

LILLICRAP, D. Von Willebrand disease – Phenotype versus genotype: Deficiency versus disease. **Thrombosis Research**, v. 120, p. 11-16, 2007.

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

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

MANNUCCI, P.M. How I treat von Willebrand disease. **Blood**, v. 97, p. 1915-1919, 2001.

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.; ISLAM, N.; ALYONYCHEVA, T.N.; SAFIER, L.B.; HAJJAR, K.A. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 1351–1360, 1997.

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

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.; OLSON, K.E.; ISLAM, N.; PINSKY, D.J.; LEVI, R. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 31, p. 234-246, 2005.

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.F.; PINSKY, D.J.; ISLAM, N.; GAYLE III, R.B.; MALISZEWSKI, C.R. Thromboregulation by endothelial

cells : significance for occlusive vascular diseases. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 178–182, 2001.

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

MILLER, J.L.; KUPINSKI, J.M.; CASTELLA, A. Von Willebrand factor binds to platelet and induces aggregation in platelet-type but not type IIB von Willebrand disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 72, p. 1532-1542, 1983.

NI, H.; FREEDMANN, J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 28, p. 257-264, 2003.

NICHOLS, W.L.; HULTIN, M.B.; JAMES, A.H.; MANCO-JOHNSON, M.J.; MONTGOMERY, R.R.; ORTEL, T.L.; RICK, M.E.; SADLER, J.E.; WEINSTEIN, M.; YAWN, B. Von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). **Haemophilia**, v. 14, p. 171-232, 2008.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; 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.

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

RAND, M.L.; LEUNG, R.; PACKHAM, M.A. Platelet function assays. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 28, p. 307-317, 2003.

REINER, A.P.; ARAMAKI, K.M.; TERAMURA, G.; GAUR, L. Analysis of Platelet Glycoprotein Ia (α₂ Integrin) Allele Frequencies in Three North American Populations
REINER, A.P.; SISCOVICK, D.S.; ROSENDAAL, F.R. Platelet glycoprotein gene polymorphisms and risk of thrombosis: facts and fancies. **Reviews in clinical and experimental hematology**, v. 53, p. 262-287, 2001.

REININGER, A.J. VWF attributes – impact on thrombus formation. **Thrombosis Research**, v. 4, p. S9-S13, 2008.

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

ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; IMAI, M.; GUCKELBERGER, O.; ENJYOJI, K. Thromboregulatory potential of endothelial CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase: modulation of purinergic signaling in platelets. **Emerging Therapeutic Targets**, v. 2, p. 1-17, 2000.

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

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

RÜCKER, B.; ALMEIDA, M.E.; LIBERMAN, T.A.; ZERBINI, L.F.; WINK, M.R.; SARKIS, J.J.F. Biochemical characterization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP, E.C. 3.1.4.1) from rat heart left ventricle. **Moll Cell Biochem**, v. 306, p. 247-254, 2007.

RUGGERI, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, p. 1335-1342, 2003.

SADLER, J. E.; MANNUCCI, P. M.; BERNTORP, E.; BOULYJENKOV, V.; GINSBURG, D.; MEYER, D.; PEAKE, I.; RODEGHIERO, F.; SRIVASTAVA, A. Impact, Diagnosis and Treatment of von Willebrand Disease. **Trombosis Haemostology**, v. 84, p. 160-174, 2000.

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

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

SANTOSO, S. Platelet polymorphisms in thrombotic disorders. **Transfusion clinique et biologique: journal de la Société française de transfusion sanguine**, v. 8, p. 261-266, 2001.

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

SCHETINGER, M.R.C.; VIEIRA, V.L.P.; MORSCH, V.M.; BALZ, D. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 128. p. 731-741, 2001.

SILVA, A.C.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; CORRÊA, M.C.; ARANTES, L.C.; ARAÚJO, M.C.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolysis adenine nucleotides in chronic renal failure: relationship between defects and renal failure severity. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1741, p. 282-288, 2005.

SMITH, T.M.; KIRELEY, T.L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1386, p.65-78, 1998.

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

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

TOSETTO, A.; CASTAMAN, G.; RODEGHIERO, F. Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score. **Blood**, v. 21, p.89-97, 2007.

TOTONCHI, A.; ESHRAGHI, Y.; BECK, D.; MCCRAE, K.; GUYURON, B. Von Willebrand Disease: screening, Diagnosis, and Management. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 2, p. 189-194, 2008.

TRASI, S.; SHETTY, S.; GHOSH, K.; MOHANTY, D. Prevalence & Spectrum of von Willebrand disease from western Índia. **India Journal Medical Residence**, v. 121, p. 653-658, 2005.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. 1ª ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2004.

ZHANG, Z.P.; BLOMBACK, M.; NYMAN, D.; ANVRET, M. Mutations of von Willebrand factor gene in families with von Willebrand disease in the Alands Islands.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, p. 7937-7940, 1993.

ZIMMERMANN, H.; VOGEL, M.; LAUBE, U. Hippocampal localization of 5'-nucleotidase as revealed by immunocytochemistry. **Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 105-112, 1993

ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: Principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. **Nature America Inc**, v. 9, p. 987-988, 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 a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44-56, 2001.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo o projeto de pesquisa **“Relação entre níveis de enzimas que degradam nucleotídeos de adenina, agregação plaquetária e polimorfismo do gene α_2 da integrina $\alpha_2\beta_1$ em pacientes com a doença de von Willebrand”** através da mestrandia Karen Freitas Santos, orientada pela prof^a Dr^a Vera Maria Morsch. Este projeto tem como objetivo avaliar a atividade de componentes do sangue em pacientes com Doença de von Willebrand e em indivíduos controles, livres de qualquer doença (patologia), com a finalidade de colaborar para um melhor entendimento desta doença, além de proporcionar mais informações aos pacientes, já que estes terão acesso aos resultados da pesquisa.

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

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

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

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

relacionados com a pesquisa, e da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízo de qualquer ordem.

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

Santa Maria, ___ de _____ 200_.

Nome Paciente

Identidade

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

Identidade

Assinatura do pesquisador

Em caso de dúvidas, entrar em contato com Profª Drª orientadora Vera Maria Morsch, (55)3220-8665, ou com Karen Freitas Santos (pesquisadora), (55)3307-0460.

Comitê de Ética em Pesquisa - UFSM

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

Cidade Universitária - Bairro Camobi

97105-900 - Santa Maria - RS

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

7.2 Anexo B – CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

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

CARTA DE APROVAÇÃO

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

Título: Relação entre níveis de enzimas que degradam nucleotídeos de adenina, agregação plaquetária e polimorfismo do gene +- 2 da integrina +-2²¹ em pacientes com doença de Von Willerbrand

Número do processo: 23081.011015/2007-21

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0120.0.243.000-07

Pesquisador Responsável: Vera Maria Morsch

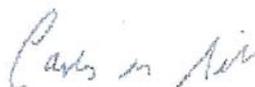
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.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

Dez/2008 Relatório final

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

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 14/08/2007

Santa Maria, 14 de agosto de.2007



Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM
Registro CONEP N. 243.