

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE
ECTONUCLEOTIDASES NO CÓRTEX CEREBRAL E
PLAQUETAS DE RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE
CIGARRO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gustavo Roberto Thomé

Santa Maria - 2009

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES
NO CÓRTEX CEREBRAL E PLAQUETAS DE RATOS
EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO**

por

Gustavo Roberto Thomé

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: Cinthia Melazzo Mazzanti
Co-orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, Rio Grande do Sul, 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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES NO
CÓRTEX CEREBRAL E PLAQUETAS DE RATOS EXPOSTOS À
FUMAÇA DE CIGARRO**

elaborado por
Gustavo Roberto Thomé

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

Comissão examinadora:

**Cynthia Melazzo Andrade Mazzanti, Dra.
(Presidente/Orientador)**

**Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra.
(Co-orientadora)**

Maribel Antonelo Rubin, Dra. (UFSM)

Maria Beatriz Moretto, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 31 de março de 2009.

**"A velocidade ensinou-me a ter calma,
o silêncio a tranquilidade!"**

Gustavo Roberto Thomé

DEDICATÓRIA

Essa dissertação é dedicada aos meus pais
Vante e Leni Thomé
pelo apoio, incentivo
e trabalho incondicional.

AGRADECIMENTOS

Em janeiro de 1991 foi decidido pelos meus pais que eu iria estudar no Instituto Educacional (IE) em Passo Fundo-RS, desde essa época comecei minha batalha no estudo em busca para ser um bom profissional e ter um bom trabalho.

Agradeço primeiramente ao meu irmão Fernando Adílio Thomé (*in memorium*) pelo apoio e direcionamento nos estudos, foi você “Nando” que iniciou toda essa conquista.

Agradeço a meu irmão César Augusto Thomé, o qual sempre incentivou, incentiva e certamente incentivará as “nossas” conquistas.

Grandiosamente agradeço aos meus pais Euclides Fioravante Thomé (*in memorium*) e Leni de Lourdes Thomé, os quais trabalharam “arduamente” para recebermos esse título. Por favor, meus pais, recebam do fundo do meu coração, um super e enorme obrigado, mas grande mesmo! Por tudo que fizeram por mim.

Agradeço em especial minha namorada Maríndia, a qual me apoiou, incentivou e venceu distâncias!

Agradeço a minha verdadeira família que são: Mãe, Pai, César, Tânia, Vanessa, Hector, avó Eva e Maríndia.

Não posso deixar de citar o apoio de todos os meus colegas do Laboratório de Enzimologia Toxicológica, professores e amigos da UFSM, em especial as orientadoras Prof. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger e Prof. Dra. Cinthia Melazzo Mazzanti.

Obrigado Deus!

RESUMO

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

Autor: GUSTAVO ROBERTO THOMÉ
Orientadora: CINTHIA MELAZZO MAZZANTI
Co-Orientadora: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER
Data e local de Defesa: Santa Maria, 31 de março de 2009.

Os processos patofisiológicos inflamatórios e degenerativos no sistema nervoso central (SNC) e plaquetas são importantes causas de doenças humanas promovidas pela fumaça de cigarro. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeos em sinaptossomas de córtex cerebral e plaquetas de ratos expostos à fumaça envelhecida e diluída inalada por via secundária de cigarros comerciais. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos (10 ratos por grupo): controle (não exposto a fumaça de cigarro) e fumo (exposto a fumaça de cigarro). O grupo fumo foi exposto à fumaça de cigarro 15 minutos por dia no interior de uma câmara de exposição durante 3 semanas. Em relação ao sinaptossoma de córtex cerebral os resultados demonstraram que a atividade da E-NTPDase (ATP e ADP como substrato) aumentou significativamente no grupo exposto à fumaça de cigarro ($p < 0.05$) e a atividade da 5'-nucleotidase (AMP como substrato) diminuiu neste grupo ($p < 0.05$), comparado ao grupo controle. Nas plaquetas foi demonstrado um aumento na atividade das enzimas E-NPP e E-NTPDase (ATP como substrato) e 5'-nucleotidase (AMP como substrato) no grupo exposto à fumaça de cigarro ($p < 0.05$) quando comparado ao grupo controle. Já a E-NTPDase (ADP como substrato) demonstrou uma diminuição de sua atividade no grupo exposto à fumaça de cigarro ($p < 0.05$). Pode-se sugerir que a provável diminuição da adenosina, uma molécula neuroprotetora, pode levar ao dano no tecido do encéfalo. Entretanto, em plaquetas, houve um aumento da adenosina, a qual pode refletir mudanças adaptativas. As alterações na atividade das ectonucleotidases em animais submetidos à exposição de fumaça de cigarro podem contribuir na elucidação de seus efeitos patológicos em sistemas biológicos.

Palavras chave: E-NTPDase; 5'-nucleotidase; E-NPP; Plaquetas; Sinaptossomas; Fumaça de Cigarro.

ABSTRACT

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

Author: GUSTAVO ROBERTO THOMÉ
Adviser: CINTHIA MELAZZO MAZZANTI
Co-adviser: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER
Date and place of the defense: Santa Maria, 31 of march, 2009.

Inflammatory and degenerative pathophysiological processes within the central nervous system (CNS) and platelets are important causes of human disease promoted by cigarette smoke. The objective of the present study was to evaluate activity of the enzymes that hydrolyze nucleotides and nucleosides in synaptosomes of cerebral cortex and platelets from rats exposed to aged and sidestream diluted smoke of commercial cigarettes. The animals were randomly divided into two groups (ten rats in each group): control (not exposed to cigarette smoke) and smoke (exposed to cigarette smoke). The smoke group was exposed via inhalation through the nose only 15 minutes per day inside a cigarette smoke exposure chamber during 3 weeks. The results demonstrated that E-NTPDase (with ATP and ADP as substrate) activity was significantly higher in the smoke group ($p < 0.05$), while the 5'-nucleotidase with AMP as substrate demonstrated decreased activity in the smoke group ($p < 0.05$). However, in platelets activities demonstrated that E-NPP and E-NTPDase with ATP as substrate and 5'-nucleotidase with AMP as substrate were significantly higher in the smoke group ($p < 0.05$) as compared to the control group, while E-NTPDase with ADP as substrate demonstrated decreased activity in the smoke group ($p < 0.05$). A decrease of adenosine, a neuroprotective nucleoside, was observed in brain, which could lead to damage of the brain tissue. However, in platelets, there was an increase of adenosine, which may reflect adaptative changes. These alterations caused by cigarette smoke on ectonucleotidase activities may assist in verifying pathophysiological effects in biological systems.

Keywords: E-NTPDase; 5'-Nucleotidase; E-NPP; Platelets; Synaptosomes; Cigarette Smoke.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 – Planta <i>Nicotiana tabacum</i>	19
FIGURA 2 – Estrutura do cigarro de papel	21
FIGURA 3 – Origem das plaquetas	25
FIGURA 4 – Plaquetas emitindo pseudópodos	26
FIGURA 5 – Adesão e agregação plaquetária	27
FIGURA 6 – Família das enzimas NTPDases	32
FIGURA 7 – Estrutura das enzimas da família NTPDase	33
FIGURA 8 – Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI	35
FIGURA 9 – Imagem ilustrativa da topografia de ectonucleotidases E-NPPs de membrana	37
FIGURA 10 - Cascata enzimática de hidrólise de nucleotídeos ATP, ADP e AMP na membrana de plaqueta	37

MANUSCRITO I

FIGURE 1 - E-NTPDase activity in synaptosomes of rats using ATP (A) and ADP (B) as substrate and 5'-nucleotidase activity in platelets of rats using AMP as substrate (C) after three weeks exposure to cigarette smoke	69
FIGURE 2 - E-NPP activity in platelets of rats after three weeks exposure to cigarette smoke	70
FIGURE 3 - E-NTPDase activity in platelets of rats using ATP (A) and ADP (B) as substrate, 5'-nucleotidase activity in platelets of rats using AMP as substrate (C) after three weeks exposure to cigarette smoke	71

FIGURE 4 - Aggregation of platelets in rats after three weeks exposure to cigarette smoke 72

FIGURE 5 - Normal histological aspect of rat lung tissue (A). The image of rat lung tissue exposed to cigarette smoke with presence of chronic inflammatory infiltrate on the wall of the bronchiole and peribronchiolar with extension to the alveolar septa of mild to moderate intensity (B). Rat lung tissue exposed to aged and diluted sidestream smoke with bumpy alveolar walls, featuring sparse areas of pulmonary emphysema (C) 73

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABELA 1 – Measure of gas and pH in arterial blood of rats after three weeks of exposure to cigarette smoke 68

LISTA DE ABREVIações

ADP - adenosina difosfato

AMP - adenosina monofosfato

ATP - adenosina trifosfato

ACRs – regiões conservadas da apirase

Ca²⁺ - cálcio

CaCl₂ - cloreto de cálcio

CO - monóxido de carbono

CO₂ - dióxido de carbono

ERN - espécie reativa de nitrogênio

EROS - espécie reativa de oxigênio

AFT - ambiente com fumaça de tabaco

HbCo - hemoglobina

HEPES - ácido N-2-hidroxietilpiperazina

HCO₃⁻ - íon bicarbonato

KCl - cloreto de potássio

NaCl - cloreto de sódio

pH - potencial hidrogeniônico, indica estado de equilíbrio ácido-básico

pCO₂ - pressão parcial de dióxido de carbono

pO₂ - pressão parcial de oxigênio

PRP - plasma rico em plaquetas

RL - radical livre

SNC - sistema nervoso central

sO₂ - saturação de oxigênio

TCA - ácido tricloroacético

tCO₂ - pressão total de dióxido de carbono

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIÇÕES	11
SUMÁRIO	12
APRESENTAÇÃO	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Objetivos	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Cigarro	18
2.1.1. Histórico	18
2.1.2. Fumaça de Cigarro	19
2.1.3. Etiologia	21
2.1.4. Fisiopatologia	22
2.1.5. Epidemiologia	23
2.2. Plaquetas	24
2.2.1. Estrutura	24
2.2.2. Agregação plaquetária	26
2.2.3. Hemostasia	27
2.2.4. Plaquetas e cigarro	28
2.2.5. Plaquetas e doenças neurológicas	28
2.3. Cigarro e SNC.....	29
3. SISTEMA PURINÉRGICO	29
3.1. Nucleotídeos	29
3.2. Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina	31
3.2.1. E-NTPDase	31
3.2.2. 5'-nucleotidase	34
3.2.3. E-NPP	35
4. MANUSCRITO	38

4.1. Cigarette smoke alter the ectonucleotidases activities in the cerebral cortex and platelets of rats	39
1. Abstract	40
2. Introduction	42
3. Materials and Methods	44
4. Results	52
5. Discussion	53
6. Conclusion	57
7. Acknowledgements	58
8. References	59
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÕES	78
6.1. Figura A - câmara de exposição à fumaça de cigarro em ratos.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representa a íntegra deste estudo.

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

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

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para a qual foi submetido:

Manuscrito - *Life Sciences: Molecular, Cellular and Functional Basis of Therapy*.

INTRODUÇÃO

O cigarro é atualmente o maior problema de saúde pública mundial segundo a Organização Mundial da Saúde. O fumante passivo é o indivíduo que não fuma, mas está exposto à fumaça de cigarro exalada de outras pessoas. As pessoas passam 80% de seu tempo em locais fechados como no trabalho, nas residências ou em locais de lazer, onde há grande risco de exposição excessiva a esta fumaça (FFFCMPA, 2009). A toxicidade da fumaça de cigarro é determinada por um grupo complexo de produtos característicos, incluindo a marca do tabaco e aditivos (HAMMOND et al., 2006).

Na queima dos cigarros são liberadas centenas de substâncias com propriedades irritativas e várias são carcinogênicas em humanos e animais. As principais manifestações clínicas em fumantes passivos adultos são sintomas respiratórios em pacientes saudáveis, exacerbação de efeitos irritativos em pacientes alérgicos, aumento da taxa de mortalidade por cardiopatias, câncer de boca, de laringe, de esôfago e de cérebro (FFFCMPA, 2009). As principais causas que levam a morte em fumantes são as doenças cardiovasculares, a doença pulmonar obstrutiva crônica e o câncer de pulmão (BERLIN, 2008; FFFCMPA, 2009).

A exposição da nicotina em humanos, lançadas por fumantes de cigarro ou em ambientes com fumaça de tabaco, é promotora de alterações fisiológicas, principalmente exposição da nicotina no pré-natal e na adolescência (SLOTKIN, 2004). Estudos epidemiológicos revelaram uma associação entre filhos de fumantes de cigarro na gravidez e distúrbios comportamentais em humanos como déficit de atenção, hiper-ativação e retardo na leitura e escrita (NAEYE, 1992; BELL and LAU, 1995).

A exposição aguda à fumaça de cigarro aumenta a epinefrina do plasma e induz a reação de plaquetas incluindo a liberação de nucleotídeos, os quais têm função importante na ativação das plaquetas, na trombogênese, na angiogênese e na remodelação vascular em resposta ao estresse (RAHMAN et al., 1996; GENBACEV-KRTOLICA, 2005; ROBSON et al., 2006). As enzimas E-NTPDase e 5'-nucleotidase estão presentes na membrana das plaquetas (PILLA et al., 1996; KAWASHIMA et al., 2000) e tem um importante papel na manutenção da

hemostasia normal e na prevenção da excessiva agregação plaquetária (PILLA et al., 1996; MARCUS et al., 2003; LUNKES et al., 2004) pela hidrólise do ADP. Atualmente, a NTPDase é aceita como um potente agente antitrombótico (ENJYOJI et al., 1999; SÉVIGNY et al., 2002; MARCUS et al., 2003). E-NTPDase é uma enzima ligada a membrana que hidrolisa ATP e ADP até AMP, o qual é subsequentemente convertido em adenosina pela ação da enzima 5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006).

Por outro lado, alguns efeitos danosos, no sistema nervoso central (SNC), são causados por fumantes ativos e também persistem por meio da exposição passiva a fumaça de cigarro, promovendo alteração na atividade sináptica colinérgica (ABREU-VILLAÇA et al., 2003a, 2003b; SLOTKIN, 2004). A análise do cérebro, exposto ao ambiente com a fumaça de cigarro por meio da inalação, mostra regulação alterada de genes associados com a função sináptica, neurotransmissão e suporte neurotrófico, tanto quanto na resposta inflamatória e ativação glial devido ao dano no tecido cerebral (MANNA et al., 2006).

O ATP é um importante neurotransmissor excitatório no SNC, que além de atuar como neuromodulador pré-sináptico, também possui papel essencial no desenvolvimento e na plasticidade neuronal (EHRlich and KORNECKI, 1999; CUNHA and RIBEIRO, 2000). O produto de quebra do ATP, a adenosina, atua como agente modulatório na atividade neuronal e tem ação neuroprotetora no SNC em condições patológicas (LATINI and PEDALA, 2001).

A sinalização induzida por estas moléculas (ATP e adenosina) correlaciona-se diretamente à atividade das enzimas E-NTPDase (Ecto/CD 39) e 5'-nucleotidase (CD73) (ZIMMERMANN et al., 1998, 2001). Estas enzimas estão envolvidas no controle dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos na fenda sináptica e atuam no controle da neuromodulação e da neurotransmissão purinérgica. A enzima E-NTPDase hidrolisa ATP e ADP produzindo AMP, sendo este posteriormente hidrolisado pela 5'-nucleotidase gerando adenosina (ZIGNASHIN, et al., 1994; ZIMMERMANN, 1996). Thomé et al (2009) demonstrou uma alteração na atividade da E-NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de ratos expostos durante 4 semanas à fumaça de cigarro, porém não tem sido encontrado na literatura estudos relacionados com a atividade destas enzimas na neurotransmissão purinérgica.

Neste contexto, considerando a importância das ectonucleotidases no controle da transmissão sináptica e na manutenção da homeostasia normal das plaquetas, este estudo foi conduzido com o objetivo de correlacionar a atividade dessas enzimas nestes sistemas em ratos submetidos ao modelo de exposição à fumaça de cigarro.

1.1. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de enzimas ectonucleotidases em sinaptossomas de córtex cerebral e plaquetas de ratos expostos à fumaça de cigarro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, *ex vivo*, a atividade das enzimas E-NTPDase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos após três semanas de exposição à fumaça de cigarro.
- Investigar, *ex vivo*, a atividade das enzimas E-NPP, E-NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de ratos após três semanas de exposição à fumaça de cigarro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cigarro

2.1.1. Histórico

A história do fumo no Brasil começa muito cedo, bem antes da chegada dos europeus. A planta, a qual teve origem o fumo, nasceu provavelmente nos vales orientais dos Andes bolivianos e se difundiu no atual território brasileiro através das migrações indígenas, sobretudo Tupi-Guarani. Havia vários tipos de fumo, mas apenas duas plantas eram usadas e cultivadas: a *Nicotiana tabacum* e a *Nicotiana rústica*. O fumo, para os índios brasileiros, tinha caráter sagrado semelhante a mandioca, o milho e muitas outras plantas de origem mística. O fumo era geralmente limitado aos ritos mágico-religiosos e como planta medicinal, reservado unicamente aos pajés (HOUSTON, 2002; MUSK, 2002; ROSEMBERG, 2002; HECKERLING, 2009).

Por outro lado, em 16 de setembro de 1586, Felipe II ordenou, mediante documento real, que a folha de tabaco fosse publicamente queimada como erva prejudicial e danosa. Desde essa época já se percebia os efeitos maléficos do tabaco (*Nicotiana tabacum*) planta da qual se deriva o cigarro (Figura 1) (PORTAL DE CHARUTOS DO BRASIL, 2009). No final do século XIX iniciou-se a sua industrialização sob a forma de cigarro. O uso do tabaco espalhou-se de forma epidêmica por todo o mundo (BOUISSON, 1859; MONACO, 2009). No fim da década de 70 vários autores começaram a relacionar o tabagismo com aspectos negativos da afetividade como a ansiedade, a irritabilidade e sintomas depressivos (WAAL-MANNING AND HAMEL, 1978; BOYLE et al., 1995). Atualmente, o tabagismo é uma das principais causas que levam a morbidade e mortalidade nos Estados Unidos, sendo que a maior taxa de prevalência está entre as mulheres universitárias com idade compreendida entre 18-25 anos. (WESCHLER et al., 1998; CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2005; ROCKVILLE, 2005; LANTZ, 2003).

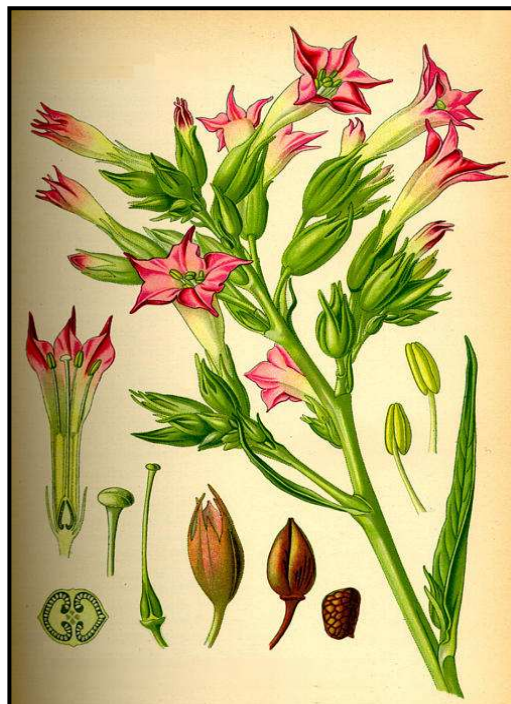


Figura 1: Planta *Nicotiana tabacum*.
Adaptado de Österreich (2009).

2.1.2. Fumaça de Cigarro

A toxicidade da fumaça de cigarro é determinada por um conjunto complexo das características do produto, incluindo a mistura do tabaco, aditivos e a característica do design, tal como a ventilação do filtro e a porosidade do papel, sendo as principais partes do cigarro de papel demonstrado na figura 2 (KOZLOWSKI et al., 2001). Os estudos realizados em máquinas, para mimetizar a exposição à fumaça de cigarro em humanos, nem sempre reflete os reais valores de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono. Pois, a absorção real desses compostos depende do comportamento humano em fumar, tal como a intensidade em puxar a fumaça do cigarro e o tempo da tragada (HAMMOND et al., 2006).

A fumaça que sai do cigarro via boca do tabagista durante a tragada (puffing) é chamada “via principal da fumaça de cigarro”, no inglês é denominada “cigarette

mainstream smoke”. Nesta via, a fumaça sai diretamente do cigarro e é inalada para o sistema respiratório. Já a “via secundária da fumaça de cigarro”, denominada “sidestream smoke” no inglês é, sobretudo, a fumaça emergente do ambiente a partir do cigarro aceso e inalada através do nariz. A fumaça exalada da via principal e a fumaça da via secundária difusa para a atmosfera torna-se diluídas pelo ambiente do ar e, após várias alterações físicas e químicas, incluindo reações com substâncias químicas não geradas pelo tabaco, tornam-se AFT (Ambiente com Fumaça de Tabaco), no inglês é denominada “Environmental Tobacco Smoke”. Antes de ser exalada do trato respiratório a fumaça da via principal é filtrada, a qual contribui entre 15% a 43% das partículas do AFT e entre 1% a 13% da fase de vapor, sendo o restante proveniente da fumaça da via secundária (BAKER AND ROBINSON, 1990; EATOUGH et al., 1990; GUERIN AND JENKINS, 1992a, 1992b; BORGERDING AND KLUS, 2005).

Essa fumaça inalada por fumantes possui um grupo complexo de compostos: na forma de aerossol suspensos no interior de uma mistura de gases de combustão (CO, CO₂, NO_x, etc.); e de compostos semi-voláteis (SMITH et al., 2006). As gotículas líquidas ou partículas representam a fase alcatrão; enquanto os gases de combustão e gases semi-voláteis compõem a fase de vapor. A fase particulada é mutagênica e citotóxica, promove a formação tumoral nos modelos animais. Na fase de vapor contém um número de compostos citotóxicos que inclui carbonílicos e aldeídos reativos, os quais são capazes de danificar as células e induzir a inflamação pulmonar (SMITH et al., 2006). Algumas evidências sugerem que a inflamação pulmonar induzida pela fumaça de cigarro pode desempenhar um papel importante no aumento de risco do câncer de pulmão em fumantes (SMITH et al., 2006). Uma relação entre a inflamação pulmonar e câncer de pulmão, mecanicamente é plausível, porque as células inflamatórias secretam espécies reativas de oxigênio, mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas, as quais, tanto pode danificar DNA quanto aumentar as taxas de proliferação de reparo celular (SMITH et al., 2006).

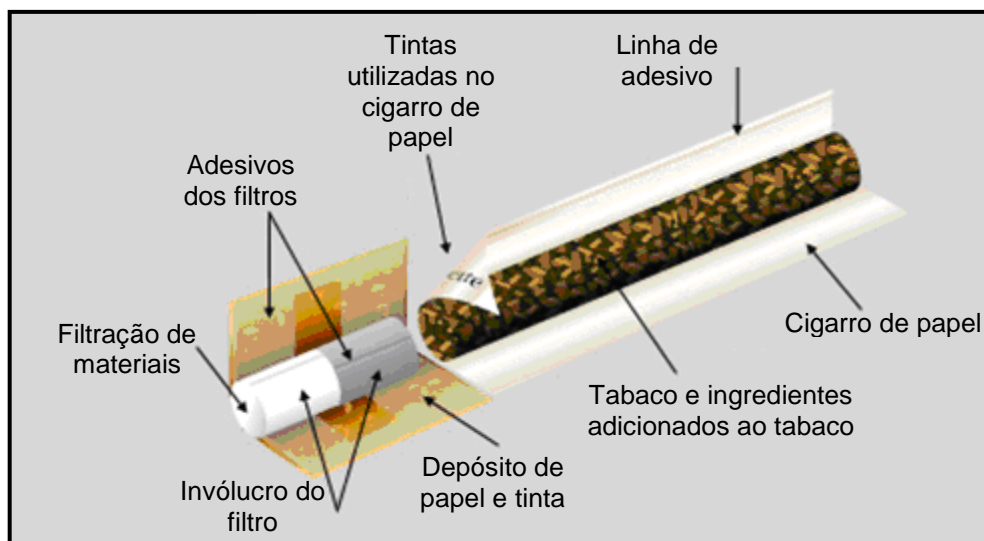


Figura 2. Estrutura do cigarro de papel. Adaptado de Philip Morris International (2009).

2.1.3. Etiologia

Em 1949 Robert Schrek e colaboradores publicaram artigo com fortes evidências circunstanciais de que a fumaça de cigarro é um fator etiológico para doenças como o câncer no trato respiratório (SCHREK et al., 1950). Nessa época, não havia conhecimento suficiente para suportar tal afirmação, porém em anos posteriores, com a melhoria do conhecimento da relação tabagismo-câncer do pulmão e aprimoramento da metodologia utilizada na realização de estudos epidemiológicos retrospectivos (ZAMBONI, 2002), iniciaram as confirmações de doenças decorrentes da fumaça de cigarro e a identificação de seus constituintes. Atualmente há estudos cujo que demonstram que a fumaça de cigarro contém carcinógenos que incluem hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas e N-nitrosaminas (HOFFMANN AND HOFFMANN, 1997; HOOKER et al., 2007). Essa fumaça é uma complexa mistura de mais de 4000 substâncias já identificadas incluindo a nicotina, aldeídos reativos, cádmio, além de compostos que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL), os quais são capazes de iniciar

ou promover dano oxidativo (RAHMAN et al., 1996; PANDA et al., 1999; GENBACEV-KRTOLICA, 2005; LUCHESE et al., 2007). A nicotina contida na fumaça de cigarro pode interagir com receptores colinérgicos presentes no sistema nervoso central e periférico. Possivelmente, aumenta os níveis de dopamina, o qual pode dar origem à dependência do cigarro. A nicotina também aumenta a liberação de norepinefrina, epinefrina e serotonina e esses aumentos modulam alguns dos efeitos de estímulo agradável da nicotina (CLARKE AND REUBEN, 1996; OLAUSSON et al., 2002).

2.1.4. Fisiopatologia

Os compostos presentes na fumaça de cigarro tais como a nicotina, a nitrosamina e as aminas aromáticas são carcinógenos e podem mediar o início e a promoção de tumor, juntamente com danos promovidos pelo estresse oxidativo, o qual aumenta a probabilidade de doenças cardíacas (SMITH et al., 2006; YANBAEVA et al., 2007).

Alguns dos efeitos nocivos do tabagismo incluem o aumento da pressão arterial e da resistência vascular coronariana, a redução do fornecimento de oxigênio, o aumento da agregação plaquetária, o aumento do fibrinogênio e a diminuição do colesterol HDL (RIGOTTI AND PASTERNAK, 1996). Estudos demonstram que fumantes aumentam a agregação de plaquetas e monócitos, o que contribui potencialmente para formação trombose arterial (BENOWITZ, 1991; HARDING et al., 2004), pois pode ocorrer disfunção das propriedades fisiológicas de células endoteliais como a perda da propriedade de não-aderência na circulação de células efetoras imunes como os monócitos, macrófagos, linfócitos-T e plaquetas (YANBAEVA et al., 2007). Fusegawa e colaboradores (1999) demonstraram que fumantes podem estar com os níveis de epinefrina ou ADP alterados, o que pode levar a indução na agregação de plaquetas através do complexo glicoprotéico IIb/IIIa. Os nucleotídeos de adenina extracelular (ATP, ADP e AMP) e seu derivado, nucleosídeo adenosina, são importantes sinalizadores moleculares que podem mediar diversos processos biológicos e patológicos (RATHONE et al., 1999;

RIBEIRO et al., 2003). Por outro lado, as conseqüências da exposição à fumaça de cigarro, no sistema nervoso central, pode levar a um decréscimo na expressão de genes associados à função sináptica, neurotransmissão e suporte neurotrófico, tanto quanto na resposta inflamatória e glial devido ao dano no tecido do cérebro (MANNA et al., 2006).

2.1.5. Epidemiologia

Segundo os dados dos inquéritos epidemiológicos em 16 capitais brasileiras, realizado pelo Ministério da Saúde em 2004, as prevalências de tabagismo são maiores nas capitais brasileiras de regiões mais industrializadas, para ambos os sexos. No entanto, elas ainda são menores do que as observadas em países industrializados, como por exemplo, nos Estados Unidos. Os homens ainda apresentam maiores prevalências de tabagismo do que as mulheres nas cidades pesquisadas. A razão de prevalências por sexo (homem/mulher), entretanto, é menor nas regiões sudeste e sul, possivelmente apontando para um aumento de consumo de tabaco no grupo feminino em regiões mais desenvolvidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Ao redor do mundo, cerca de três milhões de pessoas morrem a cada ano devido ao tabagismo, a metade deles antes dos 70 anos de idade (PETO et al., 1994). Não é usual a aceitabilidade política e social desse hábito letal. A indústria do tabaco é responsável por mais doenças e mortes prematuras do que qualquer outra organização comercial, superando o impacto destrutivo de armas e drogas ilícitas. Os detalhes estatísticos de mortalidade e morbidade sobre o tabagismo tendem a ocultar o impacto global do hábito sobre a saúde (WALD AND HACKSHAW, 1996). O fumo pode ter impacto substancial na causa de câncer em locais distintos, como: câncer de pulmão, do trato respiratório superior, da bexiga, do pâncreas, do esôfago, do estômago, próstata, rim e leucemia (WALD AND HACKSHAW, 1996; GIOVANNUCCI et al., 1999). Outras doenças potencialmente fatais podem ter origem devido ao tabagismo: doença cardíaca respiratória, doença pulmonar obstrutiva crônica, acidente vascular cerebral, pneumonia, aneurisma de aorta e a

doença isquêmica cardíaca, a causa mais comum de morte em países economicamente desenvolvidos (DOLL et al., 1994; HACKSHA et al., 1997). Na gestação, o tabagismo aumenta o risco de aborto espontâneo, de gravidez ectópica e de baixo peso ao nascer (ONAL et al., 2004). Embora existam algumas doenças para as quais o tabagismo demonstra algum efeito protetor, como alívio da ansiedade, esses “efeitos benéficos” são insignificantes em relação a essas doenças e a mortalidade prematura causada pelo tabagismo. Cerca de 20% de todas as mortes em países desenvolvidos são de origem do tabagismo, um enorme custo humano que pode ser totalmente evitado (WALD AND HACKSHAW, 1996).

2.2. Plaquetas

2.2.1. Estrutura

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariócitos, envolvidos por membranas e destituídas de núcleo (Figura 3).

Nas plaquetas se reconhecem três zonas: (1) zona externa ou periférica que condiciona a propriedade de adesão. Nessa porção encontram-se antígenos, glicoproteínas e vários tipos de enzimas. Mais internamente existe a membrana plaquetária, onde estão localizadas glicoproteínas que são receptores específicos para determinados fatores de coagulação. (2) Uma zona sol-gel ou citosol com proteínas actinmiosina e tubulina, formando microtúbulos e microfilamentos, responsáveis pelo esqueleto da plaqueta. (3) Uma zona de organelas contendo corpúsculos densos (Ca^{2+} , ADP, ATP, Serotonina, Pirofosfato), grânulos alfa (fatores de crescimento, fatores de coagulação e proteínas de adesão) e um sistema de membrana, local de síntese de prostaglandinas e tromboxano A2 (LORENZI et al., 2003).

As plaquetas em média circulam no sangue de 9-10 dias. Durante esse tempo de sobrevivência, o seu metabolismo se baseia na liberação de energia, representada pela transformação do ATP em ADP, a partir da glicólise e do mecanismo oxidativo

das mitocôndrias. Essa energia é utilizada para as funções básicas das plaquetas, que são a adesão, a agregação e a secreção de substâncias contidas nos grânulos citoplasmáticos (LORENZI et al., 2003).

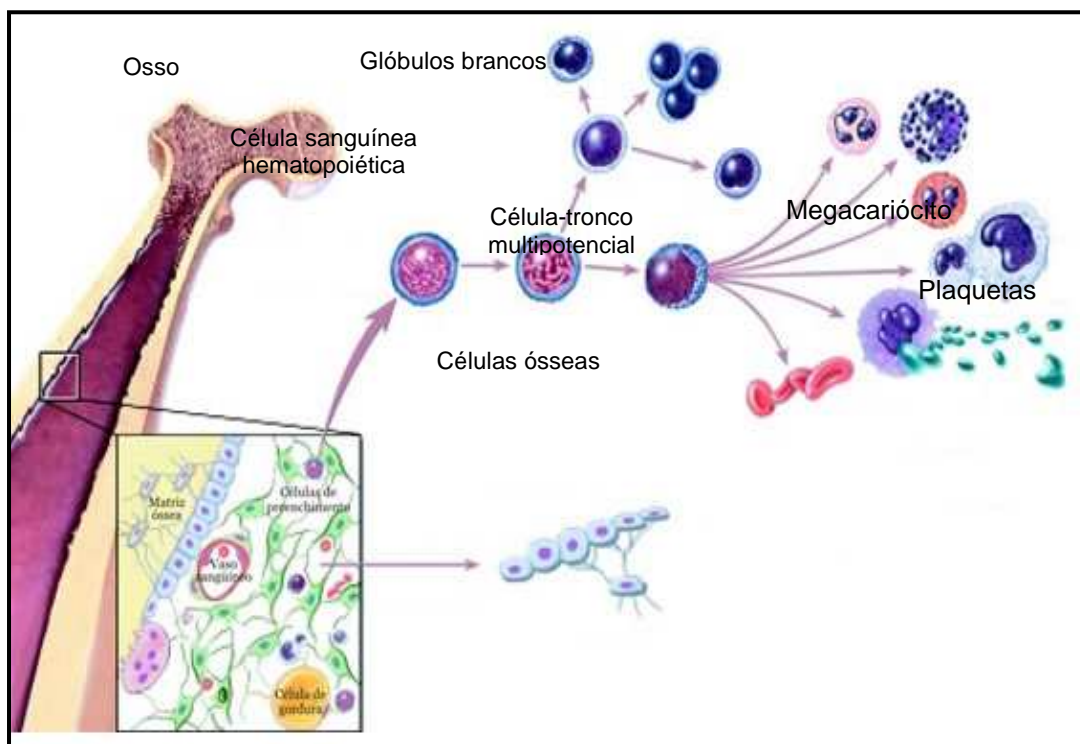


Figura 3: Origem das plaquetas. Adaptado de Espinosa (2009).

Quando um vaso sanguíneo é lesado, ocorre exposição da plaqueta ao colágeno. Nesse momento ocorre a ativação plaquetária, iniciando-se uma série de fenômenos que tem por finalidade evitar a hemorragia. Após a adesão das plaquetas ao subendotélio, novas plaquetas são ativadas e acabam aderindo a essas plaquetas. Durante esta ativação, as plaquetas mudam sua forma passando de discóide a irregular, emitindo pseudópodes a partir da membrana e se agregam (Figura 4). Os grânulos plaquetários são liberados. O primeiro sinal de ativação plaquetária é sentido na membrana externa, onde os fatores capazes de promover esta ativação como a trombina, a adrenalina, o colágeno e o ADP se ligam aos seus

receptores específicos. A seguir, ocorre a ligação das plaquetas aos receptores das glicoproteínas e ativação das moléculas de integrinas plaquetárias levando ao processo de agregação plaquetária (LEE et al., 1998; LORENZI et al., 2003).

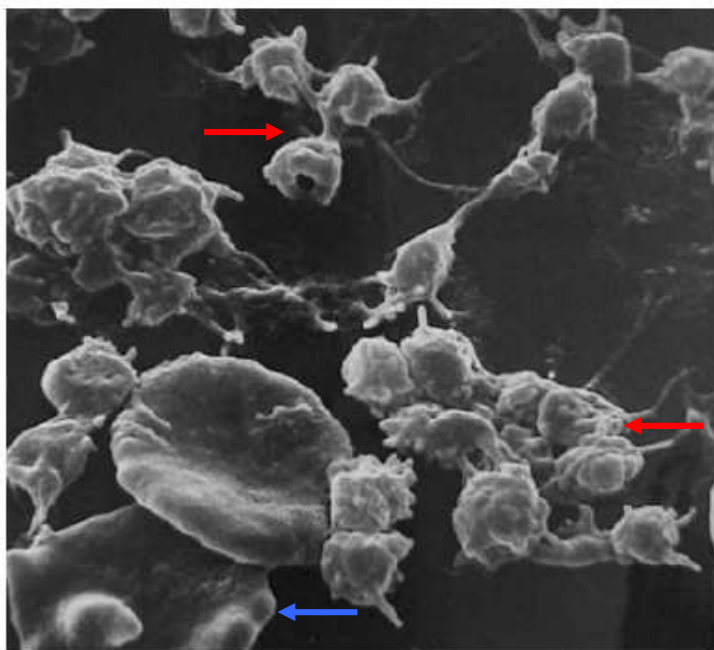


Figura 4. Plaquetas emitindo pseudópodes a partir da membrana (seta vermelha). Seta azul mostra dois eritrócitos. Microscópio eletrônico com aumento de 5000x. Adaptado de Breddin (2005).

2.2.2. Agregação plaquetária

A agregação plaquetária ocorre devido à formação de pontes de fibrinogênio, pois este se liga ao receptor na membrana plaquetária, GP IIb/IIIa, que na presença do Ca^{2+} forma um complexo estável na superfície das plaquetas ativadas. Essa também ocorre devido ao metabolismo do ácido araquidônico, sendo o mesmo liberado a partir da membrana fosfolipídica das plaquetas pela ativação da enzima fosfolipase A2 e, subsequentemente, a enzima cicloxigenase (COX-1) converte o ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos. Esses são então convertidos pela

tromboxano sintetase em tromboxano A₂ (TXA₂), funcionando como um potente agonista que induz a agregação (LEE et al., 1998; ANDREWS et al., 1999; BECKER, 1999; GAETANO, 2001). A amplificação e propagação contínua da agregação plaquetária é ativada pela formação de agregados plaquetários e a expulsão de ADP e de outras substâncias ativas das organelas plaquetárias (LEE et al., 1998).

2.2.3. Hemostasia

A principal função das plaquetas é a hemostasia, na qual elas desempenham atividade mecânica e bioquímica. As plaquetas aderem-se as estruturas subendoteliais expostas e tornam-se ativadas; ocorrendo a adesão plaquetária (Figura 5). Posteriormente, ocorre uma intensa atividade metabólica, havendo a síntese de mensageiros intracelulares e formação de agonistas plaquetários. Na seqüência as plaquetas sofrem transformações morfológicas, iniciando a formação de agregados plaquetários também denominados de rolhas, que vão constituir a barreira plaquetária inicial. A liberação de ADP e outras substâncias ativas amplificam o processo de ativação plaquetária. Segue-se a ativação com a liberação do fator 3 plaquetário e tem início o processo de coagulação sangüínea, promovendo à consolidação da rolha plaquetária pela fibrina e a conseqüente retração do coágulo (LEE et al., 1998; LORENZI et al., 2003; RAMASAMY, 2004; DAVÍ AND PATRONO, 2007).

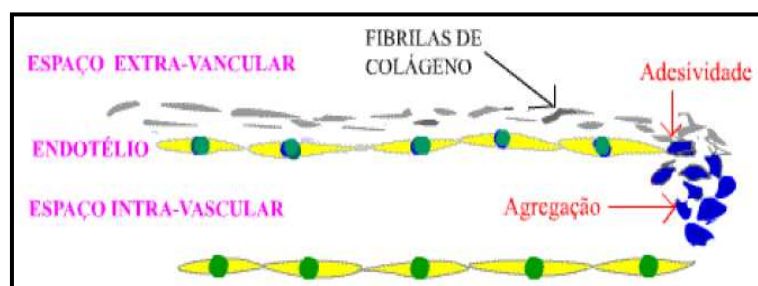


Figura 5. Adesão e agregação plaquetária. Adaptado de Famadas (2009).

2.2.4. Plaquetas e cigarro

Em fumantes, a agregabilidade das plaquetas aumenta fortemente, e numa exposição de longo tempo à fumaça de cigarro pode aumentar a sensibilidade das plaquetas pela epinefrina ou ADP (FUSEGAWA AND HANDA, 2000). Devido a esse fato, inúmeros estudos indicam que a fumaça de cigarro é um dos fatores de risco que leva à doenças ateroscleróticas, particularmente em pacientes com hipertensão, hiperlipidemia e doenças cardíacas (FUSEGAWA et al., 1999; FUSEGAWA AND HANDA, 2000). A exposição aguda à fumaça de cigarro aumenta os níveis de epinefrina do plasma e induz à reação de liberação de plaquetas em indivíduos hipertensos, o que exhibe determinado aumento no grau de hiper-reatividade de plaquetas (MUNDAL et al., 1998). Além disso, foi relatado que a agregação espontânea de plaquetas continua aumentada após 10 horas da abstinência do fumo em fumantes habituais, e essa cronicidade de agregabilidade plaquetária pode ter efeito sobre o aparecimento e progressão das desordens aterosclerótica e trombogênica (FUSEGAWA et al., 1999).

2.2.5. Plaquetas e doenças neurológicas

As plaquetas estão sendo utilizadas como um excelente modelo para investigar doenças neurológicas, devido às características similares que estas células têm com os neurônios, como por exemplo, estocar e liberar neurotransmissores, além de apresentar receptores para os mesmos em sua superfície (CHAKRABARTI et al., 1998). Estas similaridades entre plaquetas e neurônios reforçam a importância de se estudar parâmetros bioquímicos em plaquetas como marcadores clínicos de doenças neurológicas como a depressão, a esquizofrenia, a doença de Alzheimer (RAINESALO et al., 2003; CATTABENI et al., 2004) e a exposição à fumaça de cigarro, facilitando assim uma melhor compreensão da etiopatogenia dessas doenças.

2.3. Cigarro e SNC

A migração adequada de neurotransmissores e a localização de populações de células específicas dentro de cada região cerebral fazem parte do desenvolvimento normal no SNC (SLOTKIN, 2004). Porém, a atividade neural pode ficar vulnerável devido a agentes químicos, os quais podem diminuir as respostas ou bloquear neurotransmissores, cuja extensão de alterações pode alcançar todas as fases de montagem do encéfalo, desde o estágio embrionário inicial até adolescência (SLOTKIN, 2004). A exposição da nicotina no pré-natal, ou ambiente com fumaça de cigarro podem ser os meios de perturbação trófica na sinalização de neurotransmissores (SLOTKIN, 2004). Estudos indicam que a fumaça de cigarro pode mudar a atividade de sistemas biológicos como o tecido do encéfalo, e desse modo pode causar dano irreparável no organismo, como o aumento da peroxidação lipídica nas regiões do encéfalo (ANBARASI et al., 2005; MANNA, et al., 2006). A nicotina é um dos componentes chaves que causa neuroteratogênese com efeitos adversos no número de células do encéfalo, no desenvolvimento sináptico e na função neurocomportamental (LEVINAND SLOTKIN, 1998; SLOTKIN, 1998, 1999).

3. Sistema purinérgico

3.1. Nucleotídeos

Os nucleotídeos extracelulares de adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídeo adenosina são importantes moléculas sinalizadoras que medeiam diversos processos biológicos e patológicos (RATHBONE et al., 1999; RIBEIRO et al., 2003; ILLES AND RIBEIRO, 2004). Os nucleotídeos e nucleosídeos podem ter suas concentrações alteradas, hidrolisados por enzimas do sistema purinérgico como as ectonucleotidases. Desse modo, esses nucleotídeos ATP, ADP e AMP

podem estimular células ou órgãos alvos conferindo determinado efeito tanto no SNC como no sistema vascular (RATHBONE et al., 1999; KANNAN, 2002; REMIJIN et al., 2002).

No sistema vascular, a sinalização purinérgica está associada com o controle do tônus vascular mediado por ATP liberado de células endoteliais (BURNSTOCK, 1990; RALEVIC, 2001). Durante as doenças arteriais como a aterosclerose, eventos de migração, proliferação de células endoteliais tem um importante papel no desenvolvimento do espessamento intimal (SCHACHTER, 1990; GIBBONS, 1993). Estudos indicam que ATP e ADP e adenosina também desempenham papel central de sinalização destes acontecimentos e do mecanismo de trombo-regulação (SOSLAU AND YOUNGPRAPAKORN, 1997; ZIMMERMANN, 1999; BURNSTOCK, 2002; REMIJIN et al., 2002).

Os nucleotídeos de adenina constituem 90% dos nucleotídeos plaquetários e encontram-se distribuídos em dois pools distintos: o pool metabólico, utilizado na manutenção das funções celulares, constituído principalmente por ATP, e o pool de armazenamento, que contém ATP e ADP para a liberação durante a secreção plaquetária (LEE et al., 1998). Entretanto, processos hemostáticos desempenhados através de mecanismos de adesão, agregação e subsequente formação de trombos em locais de injúria vascular, são importantes funções realizadas por células anucleadas, denominada plaquetas (HARKER, 1997; MARCUS et al., 2003; WAGNER AND BURGER, 2003). O ATP possui um papel complexo nos mecanismos de regulação de agregação plaquetária, sendo que em baixas concentrações ativa e em altas concentrações inibe a agregação de plaquetas induzida pelo ADP (BIRK et al., 2002; ROZALSKI et al., 2005). Por sua vez, o ADP constitui-se no principal agonista envolvido no recrutamento e agregação das plaquetas em locais de injúria vascular, enquanto que a adenosina possui efeitos inibitórios sobre esta agregação (ROZALSKI et al., 2005).

No SNC os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina possuem diversas funções como a neurotransmissão, a neuroproteção (CUNHA AND RIBEIRO, 2000; DUNWIDDIE AND MASINO, 2001; CUNHA, 2001) e a proliferação de células gliais (FIELDS AND BURNSTOCK, 2006). Também, podem estar envolvidos na formação e regulação da sinaptogênese, plasticidade neuronal e na diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) (RATHBONE et al., 1999; FIELDS AND

STEVENS, 2000; CICARRELLI et al., 2001; STEVENS et al., 2002; WINK et al., 2003, ARESTI et al., 2005). O ATP é um importante neurotransmissor excitatório nas sinapses nervosas purinérgicas, age como neuromodulador e pode ser armazenado e liberado no meio extracelular juntamente com outros neurotransmissores, tais como acetilcolina, glutamato e noradrenalina através das vesículas pré-sinápticas dependentes de cálcio (GIBB AND HALLIDAY, 1996; SPERLÁGH AND VIZI, 1996; ZIMMERMANN, 1996; ILLES AND RIBEIRO, 2004).

A adenosina tem papel relevante na neuromodulação regulando a liberação de vários neurotransmissores, age tanto pré quanto pós-sinápticamente (CUNHA, 2001; DUNWIDDIE AND MASINO, 2001; RIBEIRO, et al., 2003). A regulação da liberação de neurotransmissores excitatórios, por esta molécula, tem se tornado importante em muitos processos patológicos, pois a adenosina pode limitar o dano causado pela excitotoxicidade destes neurotransmissores, exercendo assim uma ação protetora no SNC (ZIMMERMANN et al., 1998; DUNWIDDIE AND MASINO, 2001).

3.2. Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina

As ecto-nucleotidases são enzimas que hidrolisam nucleotídeos de adenina extracelulares, entre elas destacam-se a E-NTPDase (CD39), a 5'-nucleotidase (CD73) e a ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), as quais são enzimas capazes de alterar os níveis de ATP, ADP, AMP e adenosina (ZIMMERMANN, 2001; GODING et al., 2003; ROBSON et al., 2006).

3.2.1. E-NTPDase

A família das E-NTPDases (Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) possui oito membros (Figura 6), os quais são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001) e diferem quanto à

especificidade ao substrato, distribuição tecidual e localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; BIGONNESE et al., 2004). Quatro E-NTPDases são típicas da superfície celular, onde seus sítios catalíticos estão voltados para o meio extracelular (E-NTPDase 1, 2, 3 e 8). E-NTPDases 4, 5, 6 e 7 apresentam localização intracelular e sítio catalítico voltado para face interna da célula (ROBSON et al., 2006).

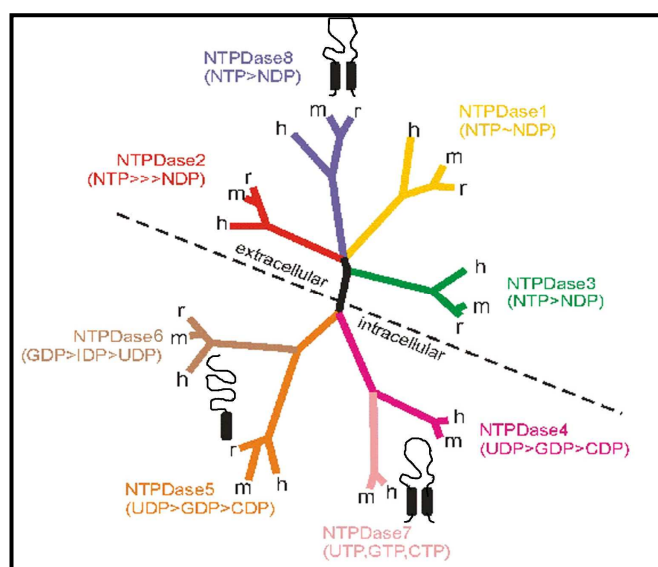


Figura 6. Família das enzimas E-NTPDases. Adaptado de Robson (2006).

Estas enzimas apresentam um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões que são conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACRs), as quais são de extrema importância para a atividade catalítica (ZIMMERMANN, 1999).

A E-NTPDase-1 (ecto/CD 39) hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (ZIGANSCHIN et al., 1994). Na família das E-NTPDases, a enzima E-NTPDase-1 foi a primeira a ser descrita e encontram-se ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas, próximas ao grupamento amino e carboxi terminal com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 7) (ZIMMERMANN, 2001).

Já foi identificado em sinaptossomas isolados que a E-NTPDase-1 é expressa nesse meio, bem como em cultura de neurônios primários de córtex cerebral e astrócitos (BATTASTINI et al., 1991; WANG AND GUIDOTTI, 1998). Pesquisas em imunohistoquímica revelaram que essa enzima é amplamente distribuída no encéfalo de ratos, tal como em neurônios de córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, células gliais e endoteliais (WANG AND GUIDOTTI, 1998).

As E-NTPDases possuem funções fisiológicas e fisiopatológicas em vários tecidos (ROBSON et al., 2006). Em plaquetas intactas de humanos, a E-NTPDase-1 pode estar envolvida na regulação da concentração dos nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular. Alguns estudos indicam que o uso de E-NTPDase-1 solúvel constitui-se num potencial agente terapêutico para inibição de processos trombóticos mediados por plaquetas.

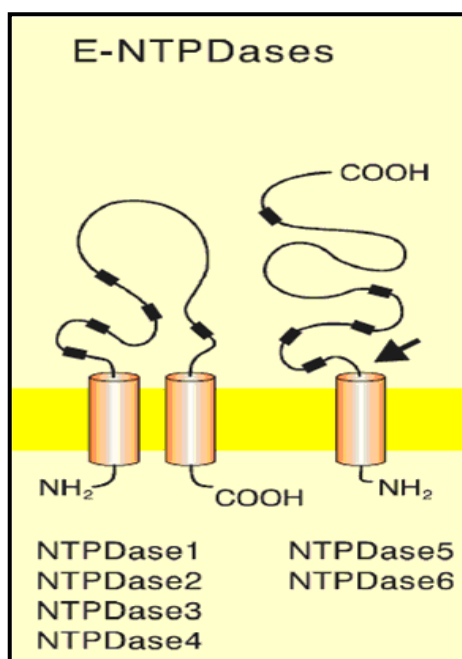


Figura 7. Estrutura das enzimas da família E-NTPDase. Adaptado de Zimmermann (2001).

A solução purificada de E-NTPDase-1 bloqueou *in vitro* a agregação plaquetária induzida por ADP e inibiu a reatividade plaquetária induzida pelo colágeno (GAYLE III et al., 1998; ENJYOJI, 1999). Nos últimos anos, esta enzima está sendo amplamente estudada em condições patológicas de modelos experimentais (BONAN et al., 2000; LUNKES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005; THOMÉ et al., 2009). A função geral desta enzima é atribuída à hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP e ADP e, portanto, dependendo da localização tecidual, da atividade enzimática, possui diferentes papéis fisiológicos (SARKIS et al., 1995; ZIMMERMANN, 1999; BONAN et al., 2001).

3.2.2. 5'-Nucleotidase

A 5'-Nucleotidase (ecto-5'-nucleotidase, CD73) é uma enzima ancorada à membrana plasmática via uma molécula de GPI (glicosilfosfatidil inositol) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 8). Entretanto, formas solúveis e clivadas desta enzima também já foram descritas (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER et al., 2005).

Esta enzima catalisa a desfosforilação de vários nucleotídeos 5'-monofosfatados como CMP, IMP, UMP, GMP e AMP à seus respectivos nucleosídeos (ZIMMERMANN, 1996). No entanto, foi demonstrado que a 5'-nucleotidase hidrolisa mais eficientemente o AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN et al., 1998; ZIMMERMANN, 2001).

A função da enzima 5'-nucleotidase correlaciona-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 do sistema nervoso (ZIMMERMANN et al., 1998; KAWASHINA et al., 2000; DUNWIDDIE AND MASINO, 2001).

No SNC, a 5'-nucleotidase está predominantemente associada à glia, mas várias evidências têm demonstrado que essa atividade também está associada a

neurônios (ZIMMERMANN et al, 1998; ZIMMERMANN, 1996, 2001). A 5'-nucleotidase é transitoriamente expressa na superfície de células neuronais e nas sinapses durante o desenvolvimento sináptico (BRAUN et al, 1995). A atividade 5'-nucleotidase encontra-se aumentada em astrócitos, células microgliais (BRAUN et al, 1997) e em sinaptossomas de hipocampo após isquemia focal e reperfusão (SCHETINGER et al, 1998). Além disso, estudos demonstram que a 5'-nucleotidase possui características de molécula de adesão (AÍRAS et al, 1995).

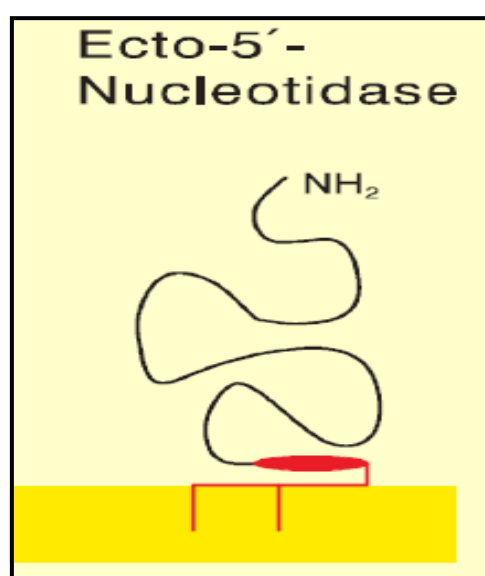


Figura 8. Estrutura da Ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana plasmática via uma molécula de GPI. Adaptado de Zimmermann (2001).

3.2.3. E-NPP

A ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (EC 3.1.4.1; E-NPP) representa uma família de proteínas eucarióticas que são expressas como ectoenzimas transmembranas ou como proteínas secretadas (BOLLEN et al., 2000; GIJSBERS et al., 2001; DUAN et al., 2003). O sítio catalítico é extracelular, sendo

esta família de proteínas denominada de ecto-NPPs (E-NPP) (Figura 9). Esta enzima está sendo descrita como um novo foco dentro da sinalização purinérgica no controle da ativação de plaquetas, pois está localizada juntamente com a E-NTPDase e a 5'-nucleotidase na superfície destas células (Figura 10), onde faz parte de um sistema múltiplo enzimático na hidrólise de nucleotídeos (FÜRSTENAU et al., 2006).

As E-NPPs são responsáveis pela hidrólise de ligações 5'-fosfodiéster em nucleotídeos e seus derivados, onde ambas purinas e pirimidinas servem como substratos, resultando na produção de nucleotídeos monofosfatos (ZIMMERMANN, 2001; GODING et al., 2003). Esta enzima compreende três membros (NPP1-3), os quais são responsáveis pela conversão cíclica do ATP para AMP e ADP para AMP (CIMPEAN et al., 2004).

Alguns estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa evidenciaram a importância das ectonucleotidases em processos patológicos na neurotransmissão e sistema vascular (LUNKES et al., 2004; SPANEVELLO et al., 2006; THOMÉ et al., 2009). De interesse especial, no estudo de quatro semanas de exposição à fumaça de cigarro em ratos, o qual foi determinado a atividade das ectonucleotidases em plaquetas, houve um aumento na hidrólise do ATP e do AMP em relação ao grupo controle. Essa alteração na hidrólise de nucleotídeos demonstrou ser, possivelmente, um mecanismo adaptativo patofisiológico devido exposição à fumaça de cigarro (THOMÉ et al., 2009).

A fumaça de cigarro pode promover câncer, acidente vascular cerebral e doenças cardiovasculares. Cerca de três milhões de pessoas morrem a cada ano devido ao tabagismo. Tanto no SNC como no sistema vascular a fumaça de cigarro causa danos, sendo que nesses tecidos encontram-se as ectonucleotidases que promovem funções importantes para o funcionamento de sistemas biológicos e suas atividades podem estar alteradas em situação patológica.

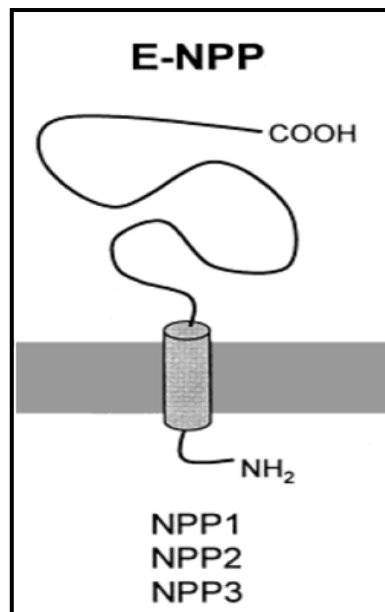


Figura 9. Imagem ilustrativa da topografia de ectonucleotidases E-NPPs de membrana. Adaptado de Zimmermann (2001).

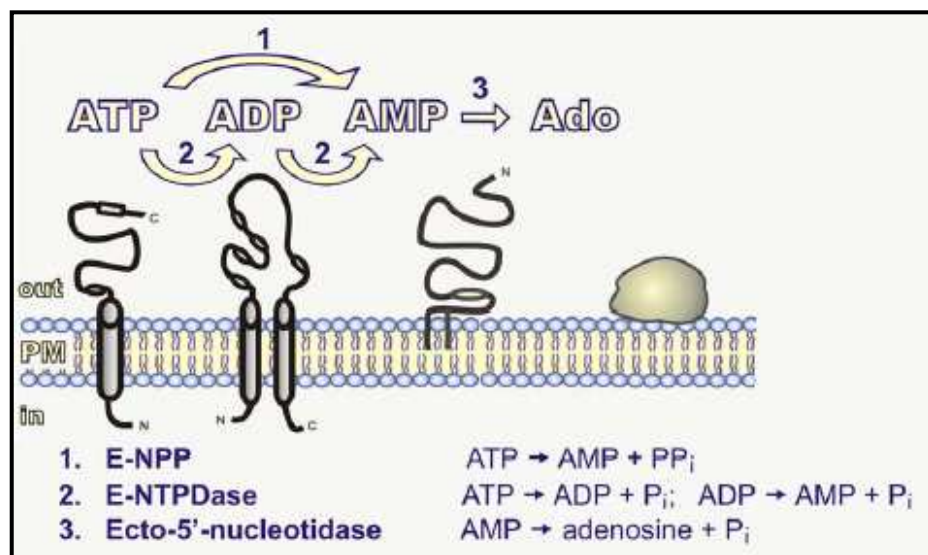


Figura 10. Cascata enzimática de hidrólise de nucleotídeos ATP, ADP e AMP na membrana de plaqueta. Adaptado de Fürstürstenu et al (2006).

4. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação está baseada na versão submetida à publicação na revista: Life Sciences: Molecular, Cellular and Functional Basis of Therapy.

Manuscrito: **Cigarette smoke alter the ectonucleotidases activities in the cerebral cortex and platelets of rats.**

Cigarette Smoke Alter the ectonucleotidases activities in the cerebral cortex and platelets of rats

G.R. Thomé¹, C.M. Mazzanti¹, R.M. Spanevello², M. Corrêa¹, V.M. Morsch¹, P.A. Maldonado¹, D. Cargnelutti¹, M.M.M.F. Duarte¹, A. Mazzanti³, A.M. Fiorenza¹, J.F. Gonçalves², V. Battisti¹, M.C. Lavall¹, L.L.S. Moraes¹, S.C.A. Da Luz⁴, M.R.C. Schetinger¹

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

² Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

* Corresponding author:

Cinthia Melazzo Mazzanti and Maria Rosa Chitolina Schetinger

Departamento de Química,

Centro de Ciências Naturais e Exatas

UFSM, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil

Fax: +55 -55 -3220 -8978

E -mail: mariaschetinger@gmail.com and cmelazzomazzanti@gmail.com

Abstract

Aim: Inflammatory and degenerative pathophysiological processes within the central nervous system and platelets are important causes of human disease promoted by cigarette smoke. The objective of the present study was to evaluate activity of the enzymes that hydrolyze nucleotides and nucleosides in synaptosomes of cerebral cortex and platelets from rats exposed to aged and sidestream diluted smoke of commercial cigarettes.

Main methods: The animals were randomly divided into two groups (ten rats in each group): control (not exposed to cigarette smoke) and smoke (exposed to cigarette smoke). The smoke group was exposed via inhalation through the nose only 15 minutes per day inside a cigarette smoke exposure chamber during 3 weeks.

Key findings: The results demonstrated in cortex synaptosomes that E-NTPDase (with ATP and ADP as substrate) activity was significantly higher in the smoke group ($p < 0.05$), while the 5'-nucleotidase with AMP as substrate demonstrated decreased activity in the smoke group ($p < 0.05$). However, in platelets activities demonstrated that E-NPP and E-NTPDase with ATP as substrate and 5'-nucleotidase with AMP as substrate were significantly higher in the smoke group ($p < 0.05$) as compared to the control group, while E-NTPDase with ADP as substrate demonstrated decreased activity in the smoke group ($p < 0.05$).

Significance: A decrease of adenosine, a neuroprotective nucleoside, was observed in brain, which could lead to damage of the brain tissue. However, in platelets, there was an increase of adenosine, which may reflect adaptative changes. These alterations caused by cigarette smoke on ectonucleotidase activities may assist in verifying pathophysiological effects in biological systems.

Keywords: E-NTPDase; 5'-Nucleotidase; E-NPP; Platelets; Synaptosomes; Cigarette Smoke.

Introduction

The toxicity of cigarette smoke is determined by a complex set of product characteristics, including the tobacco blend and additives (Hammond et al., 2006). Many of these compounds present in tobacco smoke, such as nicotine, nitrosamine and aromatic amines, are carcinogens and can mediate tumor initiation and promotion, beside of the to cause oxidative stress, which increases the propensity for cardiac disease (Smith et al., 2006; Yanbaeva et al., 2007). Moreover, acute cigarette smoking significantly increases plasma epinephrine and induces platelet reactions, including the release of nucleotides (Rahman et al., 1996; Genbacev-Krtolica, 2005). On the other hand, analysis of brain exposed to environmental tobacco smoke (ETS) through cigarette smoke inhalation has shown a down-regulation of genes associated with synaptic function, neurotransmission and neurotrophic support, as well as inflammatory response and glial activation due to damaged brain tissue (Manna et al., 2006).

Extracellular adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their nucleoside derivative adenosine are important signaling molecules that mediate diverse biological and pathological processes (Rathone et al., 1999; Ribeiro et al., 2003). In recent years, studies have demonstrated that ATP, ADP and adenosine regulate thromboregulation mechanism (Soslau and Youngprapakorn 1997; Zimmermann 1999; Remijin et al., 2002) and have a diverse array of functions in the central nervous system (CNS) such as neurotransmission (Burnstock 2006); neuroprotection (Cunha 2001); neurite outgrowth (Rathone et al., 1999) and proliferation of glial cells (Fields and Burnstock 2006).

Signaling events induced by extracellular adenine nucleotides are controlled by the action of ectonucleotidases, including members of ectonucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (E-NPPs, EC 3.1.4.1) and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDases, E.C. 3.6.1.5, CD39) families as well as ecto-5'-nucleotidase. The enzyme E-NTPDase hydrolyzes the extracellular nucleotides tri- and- diphosphate (ATP and ADP) to adenosine monophosphate (AMP) while that E-NPP enzyme is responsible for hydrolyzing 5'- phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives resulting in production of nucleotides monophosphate (Zimmermann 2001; Goding et al., 2003). The AMP produced from action of E-NTPDase and E-NPP is subsequently hydrolyzed to adenosine by the action of ecto-5'-nucleotidase. Together these ecto-enzymes constitute a highly organized enzymatic cascade for the regulation of nucleotide-mediated signaling, controlling the rate, amount and timing of nucleotide hydrolysis from ATP degradation to nucleoside adenosine formation (Wink et al., 2006). These enzymes have been characterized in the neurons and platelets and it has been proposed that E-NTPDase, E-NPP and 5-nucleotidase activities regulate a variety of physiological functions including neurotransmission and platelet activation (Lunkes et al., 2003; Spanevello et al., 2006a, b).

Considering the presence of purinoceptors in rat and the importance of ectonucleotidases in the control of synaptic transmission and maintenance of normal hemostasis in platelets, the objective of the present study was to evaluate enzymatic activity of the enzymes that hydrolyze nucleotides and nucleosides in synaptosomes of cerebral cortex and platelets from rats exposed to aged and sidestream diluted smoke of commercial cigarettes.

Materials and Methods

Chemicals

Nucleotides, HEPES and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) and bovine serum albumin. K_2HPO_4 was obtained from Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A., BR). All other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

Animals

Adult male Wistar rats (200–300g) with four month of age were used in this experiment. The animals were kept on a 12-h light 12-h dark cycle, at a temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, (COBEA) and are in accordance with international guidelines.

Cigarette composition

The brand of cigarette used in the experiment was manufactured by Philip Morris Brazil Industry and Company LTDA from the city of Santa Cruz do Sul - Rio Grande do Sul, Brazil. Tobacco smoke contains thousands of different chemicals, including tar, nicotine and carbon monoxide. These measurements of chemicals are obtained using standardized testing methods that compare different brands when "smoked" by a machine under identical laboratory conditions. The basic ingredients

of cigarettes as printed on cigarette packs of the brand used in the experiment are: sugar, paper, plant extracts and agents of flavor and each cigarette contains 10 mg tar, 0.8 mg nicotine and 10 mg carbon monoxide. Moreover, the ingredients in cigarette brand hard pack 20 cigarettes contain burnt items (such as propylene glycol, glycerol, guar gum, side seam adhesives among others) and unburnt items (such as filtration material, filter wraps, filter adhesives among others).

Cigarette smoke exposure

The animals were randomly divided into two groups (ten rats in each group): control (not exposed to cigarette smoke) and smoke (exposed to cigarette smoke). The smoke group was exposed to aged and diluted sidestream smoke of commercial cigarettes via inhalation through the nose only inside an exposure chamber during 3 weeks. In the first, second and third weeks, animals were concomitantly exposed to the smoke of two, three and four cigarettes per day, respectively. The duration of each exposure was 15 minutes, 7 days each week. Control animals were placed another clean chamber for the same amounts of time and without exposure to smoke. At no time were the control rats in the same environment during the exposure of cigarette smoke. The chambers (one for control and another for smoke) of exposure were washed with clean water and detergent and aired out for 24 hours after use. At the end of the experimental period (21 days), rats were anesthetized with ketamine chlorhydrate and xylazine (5:1; 0.1 ml/100g) and the tissues were collected for the subsequent enzymatic assays.

Smoke generation

The system of exposure to cigarette smoke is simple. After placing the rats inside the chamber of exposure (size 564 x 385 x 371mm; volume 53100 mL/1795 oz; plastic material) between 2 and 4 cigarettes were lit (Figure 6). Cigarettes were fixed in a metal holder allowing them to be fully burned down within the period of 15 minutes. After lighting the cigarettes, the chamber was immediately closed, with only a small opening (371mm x 40mm) in the chamber for ventilation. A metal grille was placed on top of the cigarette holder for the rats not to injure themselves and to avoid direct contact with the cigarette. The inhalation was aged and diluted sidestream smoke that could also be termed as a surrogate of AFT that does not require smokers.

Synaptosome Preparation

The synaptosomes were isolated as described by Nagy and Delgado-Escueta (1984), using a discontinuous Percoll gradient. The cerebral cortex was gently homogenized in 10 volumes of an ice-cold medium (medium I), consisting of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, with a pH of 7.5, in a motor driven Teflon-glass homogenizer and then centrifuged at 1.000 x g for 10 min. An aliquot of 0.5 ml of the crude mitochondrial pellet was mixed with 4.0 ml of an 8.5% Percoll solution and layered into an isoosmotic discontinuous Percoll/sucrose gradient (10%/16%). The synaptosomes that banded at the 10 and 16% Percoll interface were collected with a wide-tip disposable plastic transfer pipette. The synaptosomal fraction was washed twice with isoosmotic solution by centrifugation at 17.200 x g for 20 min to

remove any contaminating Percoll. The pellet from the second centrifugation was suspended in an isoosmotic solution and the final protein concentration was adjusted to 0.4-0.6 mg/ml. Synaptosomes were prepared fresh daily, maintained at 0-4 °C throughout the procedure and used for E-NTPDase and 5'-nucleotidase assays.

E-NTPDase and 5'-nucleotidase activities from synaptosome assay

The E-NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µl as described in a previous study from our laboratory (Schetinger et al., 2000). Twenty microliters of enzyme preparation (8-12 µg of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37°C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to obtain a final concentration of 1.0 mM and incubation proceeded for 20 min in either case. 5'-Nucleotidase activity was determined essentially by the method of Heymann et al. (1984), in a reaction medium containing 10 mM MgSO₄ and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 µl. Twenty microliters of enzyme preparation (8-12 µg of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37°C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of AMP to a final concentration of 2.0 mM and proceeded for 20 min. In all cases, the reaction was stopped by the addition of 200 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to obtain a final concentration of 5%. Then, the tubes were chilled on ice for 10 min. The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1986), using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out by adding the synaptosomal fraction after TCA addition to correct for

non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate. Enzyme activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Platelet-rich plasma preparation

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes et al. (2004), with the following minor modifications. Total blood was collected from cardiac puncture with 0.12 M sodium citrate as anticoagulant. The total blood-citrate system was centrifuged at 160 × g during 15 min. The PRP was centrifuged at 1400 × g for 30 min and washed twice by centrifugation at 1400 × g for 10 min with 3.5 mM HEPES isomolar buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES isomolar buffer and adjusted to 0.4-0.6 mg of protein per milliliter.

E-NTPDase and 5'-nucleotidase from platelet assays

The E-NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 µl as described by Pilla et al. (1996). Twenty microliters of the enzyme preparation (8–10 µg of protein) was added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM, and the time of incubation was 60 min. For AMP hydrolysis, the 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, except that 5 mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂ and 2 mM of AMP was added. Both reactions were stopped by the

addition of 200 μ l of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. After this, the inorganic phosphate released by ATP, ADP and AMP hydrolysis was determined in triplicate by the method of Chan et al. (1986) using KH_2PO_4 as standard. The same process was carried out on the control tubes to exclude non enzymatic hydrolysis, by adding twenty microliters of protein to the reaction medium after TCA. The results were expressed as nmol inorganic phosphate released/ minute/ milligram of protein (nmol Pi released/ min/ mg protein).

E-NPP from platelet assays

The E-NPP activity, from platelets, was assessed using *p*-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Fürstenau et al. (2006). The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 6 mM glucose, 5.0 mM CaCl_2 , pH 8.9, was preincubated with approximately 20 μ g per tube of platelet protein for 10 min at 37°C in a final volume of 200 μ l. 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 μ l 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 18.8×10^{-3} M/cm. Controls to correct non-enzymatic substrate hydrolysis were performed by adding platelet preparations after the reaction had been stopped with NaOH as described for platelets. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomol of *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein (nmol *p*-nitrophenol released/min/mg protein).

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) using serum albumin as standard.

Blood gases, pH and carboxyhemoglobin

To evaluate the reproducibility of this model of cigarette smoke exposure, blood gas and pH and carboxyhemoglobin (HbCo) were measured. Blood gas consists of partial pressure of CO₂ (pCO₂), partial pressure of oxygen (pO₂), carbonate ion (HCO₃⁻), total CO₂ (tCO₂), saturation of oxygen (sO₂). The rats were previously anesthetized with ketamine chlorhydrate and xylazine (5:1; 0.1mL/100g) and the fur on the ventral face of the neck was clipped. The rats were then placed in the dorsal position and anti-sepsis was carried out with alcohol-iodine-alcohol, after which the skin was cut and the sternocleidomastoid muscle was pushed back with microsurgical instruments in order to identify the right common carotid artery by surgical microscope with a magnification of 10 x which was isolated with mononylon number 6.0. Then, arterial blood was collected by puncture with an insulin needle (0.45 x 13). The syringe was prepared in advance with a solution of sodium heparin 5000 IU (100 µL/2mL blood). Immediately after collection, the arterial blood was placed under ice for up to 3 hours until it was read in the Radiometer analyzer (model ABL-5, Copenhagen).

Platelet aggregation ex vivo

The blood samples were drawn by cardiac puncture using sodium citrate 0.129 M as anticoagulant (1:9). The tests started within 3 hours after the puncture and the samples were kept at room temperature (24° to 27° C). Platelet aggregation was measured by the method of Born and Cross (1963) by measuring turbidity with a Chrono-log optical aggregometer, with AGGRO/LINK[®] Model 810-CA software for Windows version 5.1. The preparation of platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of blood for 10 min at 500 rpm and the preparation of platelet-poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation of the sample by 2400 rpm for 20 minutes. Aggregation was measured at 37°C and expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline at 6 min after the addition of the agonist (ADP 10 µM), with platelet-poor plasma as a reference.

Anatomopathologic analysis of lung tissue

To confirm this model of exposure, an anatomopathologic analysis of lung tissue was carried out. The samples of lung tissue, ex vivo, were collected and fixed in formalin solution of 10%, and then dehydrated and embedded in paraffin, followed by sectioning and histological staining with hematoxylin and eosin (HE) (Tolosa and Rodrigues et al., 2003). The slides were observed in an optical microscope to check for possible changes in the lung tissue indicative of exposure to cigarette smoke.

Statistical analysis

Student's *t* test was used to evaluate differences between groups. A *p* value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with

an SPSS software package (SPSS 10.0 Chigago, USA). All data were expressed as mean \pm SEM.

Results

The results obtained for synaptosomal E-NTPDase activity are shown in figure 1. As can be observed, activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats with ATP as substrate were increased and Student's *t* test revealed that ATP hydrolysis was significantly higher in the smoke group (23.3 %) ($p < 0.05$) (Figure 1A); when compared to the control group and when ADP was used as substrate Student's *t* test also revealed an increase (25.4%) (Figure 1B). In addition, the result of the activity obtained for 5'-nucleotidase with AMP as substrate was also altered and Student's *t* test revealed that AMP hydrolysis was significantly decreased in the smoke group (73.9 %) (Figure 1C) ($p < 0.05$) when compared with the control group.

The results obtained for E-NPP activity from platelets are shown in figure 2. As can be seen, Student's *t* test revealed that E-NPP activity in the platelets was significantly higher in the smoke group (91.4 %) ($p < 0.05$) when compared to the control group. Moreover, E-NTPDase activities from platelets of rats with ATP as substrate were increased and Student's *t* test revealed that ATP hydrolysis was significantly higher in the smoke group (95.6 %) ($p < 0.05$) when compared to the control group (Figure 3A) and when ADP was used as substrate Student's *t* test revealed a decrease (53.8%) (Figure 3B). It can be seen that cigarette smoke significantly inhibited ADP hydrolysis from platelets. On the contrary, the results for 5'-nucleotidase with AMP hydrolysis showed significantly higher activity in the smoke group (159.8 %) ($p < 0.05$) when compared to the control group (Figure 3C). A significant increase (78%) in

platelet aggregation was observed in the smoke group ($p < 0.05$) when compared with the control group (Figure 4).

The anatomopathologic analysis of lung tissue by microscopy revealed the presence of chronic inflammatory infiltrate on the wall of the bronchiole and peribronchiolar with extension to the alveolar septa of mild to moderate intensity (Figure 5B). The disorganized feature of the alveolar walls demonstrated sparse areas of pulmonary emphysema (Figure 5C). In conclusion, the histological sections of the lung revealed bronchiolitis associated with pulmonary emphysema. The normal lung tissue of controls is shown in figure 5A.

The analysis of blood gas, pH and carboxyhemoglobin from control rats and those exposed to aged and diluted sidestream smoke are shown in Table 1. A significant increase in $p\text{CO}_2$, HCO_3^- , $t\text{CO}_2$ and carboxyhemoglobin (HbCo) ($p < 0.05$) were observed in the smoke group when compared to the control group.

Discussion

Several studies from our laboratory has demonstrated that the ectonucleotidases have the important role in thromboregulation and neurotransmission process; and alterations in their activities have been observed in various diseases suggesting that its could be an important physiological and pathological parameter (Lunkes et al., 2003, Silva et al., 2005; Araujo et al., 2005; Spanevello et al., 2006a, b; Mazzanti et al., 2007; Schetinger et al., 2007). One prior study from our laboratory demonstrated alteration of ATP and AMP nucleotide hydrolysis in rat platelets and adenosine nucleoside hydrolysis in rat plasma, caused by aged and diluted sidestream smoke exposure during 4 weeks (Thomé et al.,

2009). In addition, this is the second study to investigate the enzymes that hydrolyze nucleotides and nucleosides with the aim of to compare the physiological role of these enzymes in the CNS and platelets of rat submitted the model of cigarette smoke exposure during 3 weeks.

Previous studies have indicated that cigarette smoke can change activity of biological systems such as the blood and brain tissue and many of the chemical constituents cause irreparable damage to the organism (Fusegawa and Handa 2000; Manna et al., 2006; Yanbaeva et al., 2007). In the present study we investigated the effects of cigarette smoke on E-NTPDase and 5'-nucleotidase activities from brain and platelets and E-NPP activity from platelets, which are considered critical enzymes for the normal functioning of many tissues, mainly the CNS and platelets.

Our results demonstrated that in synaptosomes from cerebral cortex the ATP and ADP hydrolysis were increased in rats exposed the cigarette smoke (Figure 1A, B) while that the AMP hydrolysis was decreased (Figure 1C) demonstrating that compounds found in cigarette smoke altered the purinergic signaling in the cerebral cortex.

ATP is involved in the important functions in the CNS. Numerous studies demonstrated that ATP is the molecule that acts as the neurotransmitter and neuromodulator in the CNS. On the other hand, the adenosine (its breakdown product) is an important molecule in the neuromodulation, homeostatic regulation and neuroprotection of the CNS. It has been reported that ectonucleotidases such as E-NTPDase and 5'-nucleotidase are the most relevant ectoenzymes involved in adenine extracellular nucleotide hydrolysis synaptic cleft. (Cunha and Ribeiro 2000; Burnstock and Williams 2000; Zimmermann 2001; Balz et al., 2003). Our results demonstrate the E-NTPDase activity is increased, while that 5'-nucleotidase is

decreased in cerebral cortex of rats exposed the cigarette smoke. In this context, is probable that the increase E-NTPDase could have an important effect in terminating the function of the extracellular ATP and the inhibition of the 5'-nucleotidase may decrease the adenosine level. Based in these findings we can suggest that alterations caused by the cigarette smoke can contributed for the neural damage described in the literature (Anbarasi et al., 2005; US DHHS 1989; Yanbaeva et al., 2007).

The next set of experiments was performed in order to evaluate the effects of the cigarette smoke in the ectonucleotidase activities in the platelets of the rats. Our results demonstrated that E-NTPDase activity was increased when ATP was used as substrate and decreased when ADP was used as substrate (Figure 3A and B). The 5'-nucleotidase (Figure 3C) and E-NPP (Figure 2) activities were increased in platelets of the rats exposed the cigarette smoke. Moreover, previous studies conducted in our laboratory demonstrated changes in ectonucleotidase activity in platelets from rats exposed to cigarette smoke for 4 weeks (Thomé et al., 2009). Take together these findings demonstrating that the cigarette smoke also altered the purinergic signaling in the vascular system.

ATP, ADP and their metabolite adenosine can modulate multiple effects on the vascular system by interacting with specific receptors in platelets (Di Virgilio et al., 2001). The nucleotide ADP is mainly responsible for inducing changes in platelets shape and promoting platelet aggregation (Birk et al. 2002a). On the other hand adenosine, is a potent inhibitor of platelet aggregation, and an important modulator of tone vascular (Anfossi et al., 2002; Remijin et al., 2002; Borowiec et al., 2006). Moreover high ATP concentrations, inhibits aggregation induced by ADP, but low concentrations can contribute to enhance collagen, thromboxane A2 and thrombin

induced aggregation (Soslau and Youngprapakorn 1997; Birk et al., 2002a, b). The decreased in E-NTPDase activity in relation the ADP can contribute for the proaggregant effect in the platelets, which may be associated with the increased the platelet aggregation observed in this study (Figure 4). On the other hand, the increase of the E-NPP and 5'-nucleotidase activities found in our work could be related to a compensatory organic response, contributing for the adenosine production. We can suggested that the cigarette smoke alter the levels of the nucleotide interfering with the processes of coagulation and thrombus formation which may increases the propensity for cardiac disease (Smith et al., 2006; Yanbaeva et al., 2007).

Studies have indicated that neurons and platelets are cells with similar characteristics. Platelets are capable of storing and releasing neurotransmitters and expressing appropriate neurotransmitter transport (Cattabeni et al., 2004). For this reason and because they are more accessible, platelets were used in the investigation of neuron dysfunction and disabilities. In this context, considering that cigarette smoke may be involved in disorders in the CNS, we also investigated the effect of cigarette smoke on E-NPP, E-NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets in order to determine whether the activity of these enzymes reflects the ectonucleotide status in the CNS.

Our results demonstrated that cigarette smoke only produced a similar effect in platelets and cerebral cortex for ATP hydrolysis, demonstrating that the activity of platelets in the peripheral tissues may not be good peripheral marker to reflect the status of ADP and AMP at the synaptic site. We suggest that differences in the physiological role of these ectonucleotidases in cerebral cortex and platelets may have been the main factors that differentiated these activities.

To evaluate the reproducibility of the model of exposure aged and diluted sidestream smoke blood gas, pH and carboxyhemoglobin were measured and an anatomopathologic analysis of lung tissue was carried out. Blood gas parameters (pH, pO₂, sO₂) were unchanged due to the compensatory mechanism carried out by the buffering system to maintain blood homostasis. On the other hand, the parameters of partial carbon dioxide pressure (pCO₂), carbonate ion (HCO₃⁻) and total carbon dioxide pressure (tCO₂) from blood gas were altered in the group exposed to cigarette smoke, demonstrating that the animals were exposed to cigarette smoke efficiently (Table 1). The high amount of carboxyhemoglobin, a blood biomarker for cigarette smoke, demonstrates the efficiency of this model of exposure as a surrogate to ETS (Table 1).

The anatomopathologic analysis of lung tissue showed the presence of chronic inflammatory infiltrate on the wall of the bronchioles and peribronchiolar with extension to the alveolar septal of mild to moderate intensity (Figure 5B). The disorganized feature of alveolar walls showed sparse areas of pulmonary emphysema (Figure 5C). These findings confirm bronchiolitis associated with pulmonary emphysema. The normal lung tissue of controls is shown in figure 5A.

Conclusion

Based on the results presented here we may suggest that the rats exposed to subacute cigarette smoke presented alterations in E-NTPDase and 5'-nucleotidase activity in cerebral cortex and in E-NPP, E-NTPDase and 5'-nucleotidase activity in platelets. Our results suggest that the alterations caused by cigarette smoke in the

activities of ectonucleotidase, such as the decrease of the neuroprotector adenosine, may contribute to the understanding of pathophysiological effects in biological systems such as the brain tissue. However, in platelets, the increase in adenosine formation observed may better reflect pathophysiological adaptive changes due to exposure to cigarette smoke in rats. Moreover, the platelets did not prove to be a good peripheral marker to reflect the ectonucleotidase status at the synaptic site. Thus, we can suggest that future studies be carried out in order to understand the effects of cigarette smoke on the platelet coagulant status and in the purinergic neurotransmission.

Acknowledgements

The authors wish to thank 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).

REFERENCES

- Anbarasi, K., Vani, G., Balakrishna, K., Devi, C.S. Effect of bacoside A on membrane-bound ATPases in the brain of rats exposed to cigarette smoke. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2005; 19, 59–65.
- Anfossi, G., Russo, I., Massuco, P. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. *Thrombosis Research* 2002; 105: 71-78.
- Araújo M, Rocha J, Morsch A, Zanin R, Bauchspiess R, Morsch V, Schetinger MRC. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1740(3): 421-426.
- Balz, D., Wyse, A.T.S., Morsch, V.M., Silva, A.C., Vieira, V.L., Morsch, A.L.B., Schetinger, M.R.C. In vitro effects of l-arginine and guanidino compounds on NTPDase1 and 5'-nucleotidase activities from rat brain synaptosomes. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2003; 21: 75-81.
- Birk, A.V., Broenkman, J., Gladec, E.M., Robertson, H.D., Drosopoulos, J.H.F., Marcus, A.J., Szeto, 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* 2002a; 139: 116-124.

Birk, A.V., Broekman, J., Gladek, E.M., Robertson, H.D., Drosopoulos, J.H.F., Marcus, A.J., Szeto, H. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 2002b; 140: 166-175.

Born, G.V.R., Cross, M.J. The aggregation of blood platelets. *Journal of Physiology* 1963; 95: 168-178.

Borowiec, A., Lechward, K., Tkacz-Stachowska, K., Skladanowski, A.C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochimica Polonica* 2006; 53:269-278.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 218-254.

Burnstock, G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. *Pharmacological Reviews* 2006; 58: 58-86.

Burnstock, G. and Williams, M. P2 Purinergic Receptors: Modulation of Cell Function and Therapeutic Potential. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000; 295: 862-869.

Cattabeni, F., Colciaghi, F., Di Luca, M. Platelets provide human tissue to unravel pathogenic mechanisms of Alzheimer disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2004; 28: 763-770.

Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986; 157: 375-378.

Cunha, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as homeostasis regulator in nervous system: different role, different sources and different receptors. *Neurochemistry International* 2001; 38: 107-125.

Cunha, R.A. and Ribeiro, J.A. ATP as a presynaptic modulator. *Life Sciences* 2000; 68: 119-137.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97: 587- 600,

Fields, R.D., Bursnstock, G. Purinergic signaling in neuron – glia interactions. *Nature reviews* 2006; 7: 423-436.

Fürstenau, C.R., Trentin, D.S., Barreto-chaves, M.L.M., Sarkis, J.J.F. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as a part of multiple systems for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 2006; 17: 84-91.

Fusegawa, Y., Handa, S. Platelet Aggregation Induced by ADP or Epinephrine Is Enhanced in Habitual Smokers. *Thrombosis Research* 2000; 97: 287-295.

Genbacev-Krtolica, O. High light for phenols, quinolines, indoles, benzene and 2-cyclopenten-1-one are oviduct toxicants in cigarette smoke, by Prue Talbot, Karen Riveles, and Ryan Rosa: List of tobacco-smoke constituents that are harmful for reproduction grows-passive smokers may be at risk. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 2005; 86(1): 4–5.

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

Hammond, D., Fong, G.T., Cummings, K.M., O'Connor, R.J., Giovino, G.A., McNeill, A. Cigarette Yields and Human Exposure: A Comparison of Alternative Testing Regimens. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 2006; 15(8): 1495-501.

Heymann, D., Reddington, M., Kreutzberg, G.W. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *Journal of Neurochemistry* 1984; 43: 971-978.

Lunkes, G.I., Lunkes, D., Stefanello, F., Morsch, A., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Schetinger, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research* 2003; 109:189-194.

Lunkes, G., Lunkes, D., Morsch, V., Mazzanti, C., Morsch, A., Miron, V., Schetinger, M.R.C. NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan induced diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2004; 65: 1-6.

Manna, S.K., Rangasamy, T., Wise, K., Sarkar, S., Shishodia, S., Biswal, S., Ramesh, G.T. Long term environmental tobacco smoke activates nuclear transcription factor-kappa B, activator protein-1, and stress responsive kinases in mouse brain. *Biochemical Pharmacology* 2006; 71: 602-1609.

Mazzanti, C., Spanevello, R., Morsch, A., Zanin, R., Battisti, V., Ahmed, M., Gonçalves, J.F., Mazzanti, A., Gracca, D.L., Morsch, V.M., Chetinger, M.R.C. Previous treatment with vitamin E alters adenine nucleotide hydrolysis in platelets from adult rats experimentally demyelinated by ethidium bromide. *Life Sciences* 2007; 81: 241-248.

Nagy, A., and Delgado Escueta, A.V. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using non-toxic isosmotic gradient material (Percoll). *Journal of Neurochemistry* 1984; 43: 1114-1123.

Pilla, C., Emanuelli, T., Frassetto, S.S., Battastini, A.M.O., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets* 1996; 7: 225-230.

Rahman, I., Morrison, D., Donalson, K., MacNee, W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996; 154: 1055-1060.

Rathone, M., Middlemiss, P., Gysbers, J. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in Neurobiology* 1999; 59: 663-690.

Remijn, J.A., Wu, Y., Jeninga, E.H. et al. Role of ADP receptor P2y12 in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2002; 22: 686-691

Ribeiro, J.A., Sebastião, A., Mendonça, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology* 2003; 68: 377-392.

Schetinger, M.R.C., Porto, N.M., Moretto, M.B., Morsch, V.M., Rocha. J.B.T., Vieira, V., Stefanello, F. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. *Neurochemical Research* 2000; 25: 949-955.

Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Bonan, C.D., Wyse, A.T. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Bio Factors* 2007; 31: 77-98.

Silva, A.C., Morsch, A.L.B., Zanin, R.F., Côrrea, M.C., Arantes, L.C., Araújo, M.C., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in

chronic renal failure: relationship between hemostatic defects and renal failure severity. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1741(3): 282–288.

Smith, C.J., Perfetti, T.A., King, J.A. Perspectives on Pulmonary Inflammation and Lung Cancer Risk in Cigarette Smoker. *Inhalation Toxicology* 2006; 18: 667-677.

Soslau, G. and Youngprapakorn, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1355: 131-140

Spanevello, R.M., Mazzanti, C.M., Kaizer, R., Zanin, R., Festugato, R., Graça, D., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon β . *Neurochemical Research* 2006a; 31: 455-462.

Spanevello, R.M., Mazzanti, C.M., Maldonado, P., Zanin, R., Morsch, A., Hannel, L., Mazzanti, A., Festugatto, R., Graça, D., Schmatz, R., Loro, V.L., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon β . *Life Sciences* 2006b; 80: 1109-1114.

Thomé, G.R., Mazzanti, C.M., Ahmed, M., Corrêa, M., Spanevello, R.M., Maldonado, P.A., Luchese, C., Cargnelutti, D., Morsch, V.M., De Bona, K. S., Duarte, M. M. M. F.,

Mazzanti, A., Fiorenza, A.M., Da Luz, S.C. A., Nogueira, C.W., Schetinger, M.R.C. Activity of ectonucleotidases and adenosine deaminase in rats exposed to cigarette smoke. *Inhalation Toxicology*, 2008 (In press).

Tolosa, E.M.C., Rodrigues, C.J. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2ª ed. São Paulo. 2003; Editora: Malone.

US Department of Health and Human Services (DHHS). Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress. A Report of the Surgeon General. DHHS Publication 1989 No. 89-8411. CDC, Rockville MD.

Wink, M.R., Raganhol, E., Tamajusuku, A.S.K., Lenz, G., Zerbini, L.F., Libermann, T.A., Sévigny, J., Battastini, A.M.O., Robson, S.C. Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the Dominant Ectonucleotidase Expressed by Rat Astrocytes. *Neuroscience* 2006; 138: 421-432.

Yanbaeva, D.G., Dentener, M.A., Creutzberg, E.C., Wesseling, G., Wouters, E.F.M. Systemic Effects of Smoking. *American College of Chest Physicians* 2007; 131: 1557-1566.

Zimmermann, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research* 2001; 52: 44-56.

Zimmermann, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structure, catalytic properties and a search for function. *Trends in Pharmacological Sciences* 1999; 20: 231–236.

TABLE

	control group	smoke group
pH	9.87 ± 2.35	11.25 ± 2.18
pCO₂	46.25 ± 6.51	55.62 ± 3.29*
pO₂	62.62 ± 14.64	56.75 ± 18.41
HCO₃⁻	24.12 ± 1.24	27.62 ± 1.30*
tCO₂	25.25 ± 1.28	29.37 ± 1.30*
sO₂	88.12 ± 6.83	89.00 ± 5.50
HbCo	0.23 ± 0.05	6.38 ± 0.94*

Table 1. Measurement of gas and pH in arterial blood of rats after three weeks of exposure to cigarette smoke. The control group was not exposed to cigarette smoke and the smoke group was exposed to cigarette smoke. The pH is defined as the negative log of the activity of H⁺ which is the entity actually measured with the pH meter. pCO₂ and pO₂ are expressed in mmHg; HCO₃⁻ and tCO₂ are expressed in nmol/L; sO₂ is expressed in %. Carboxyhemoglobin (HbCo) is expressed in mg/dL. Values represent the mean value ± SEM. (*P < 0.05; n=10).

FIGURES

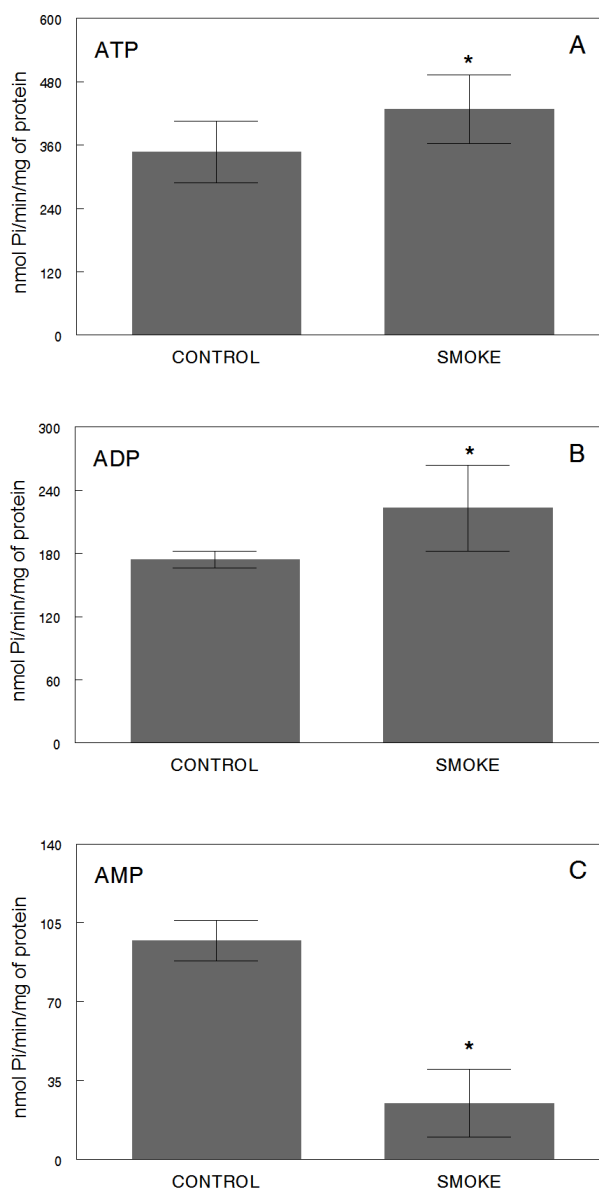


Figure 1. E-NTPDase activity in synaptosomes of rats using ATP (A) and ADP (B) as substrate and 5'-nucleotidase activity in platelets of rats using AMP as substrate (C) after three weeks exposure to cigarette smoke. The control group was not exposed to cigarette smoke and the smoke group was exposed to cigarette smoke. The enzymes activities were expressed in nmol Pi released/min/mg protein. Bars represent mean value \pm SEM. (* $P < 0.05$; $n=10$).

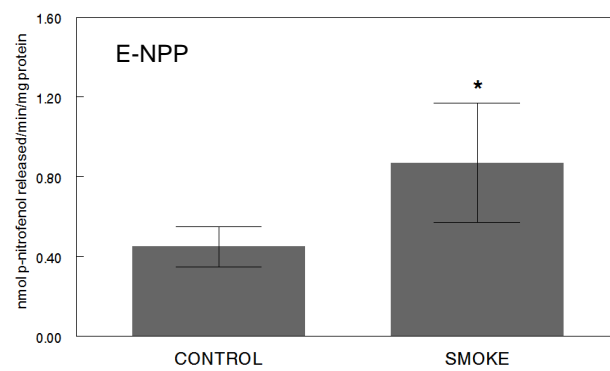


Figure 2. E-NPP activity in platelets of rats after three weeks exposure to cigarette smoke. The control group was not exposed to cigarette smoke and the smoke group was exposed to cigarette smoke. The E-NPP enzyme activity was expressed in nmol p-nitrophenol released/min/mg protein. Bars represent mean value \pm SEM. (* $P < 0.05$; $n=10$).

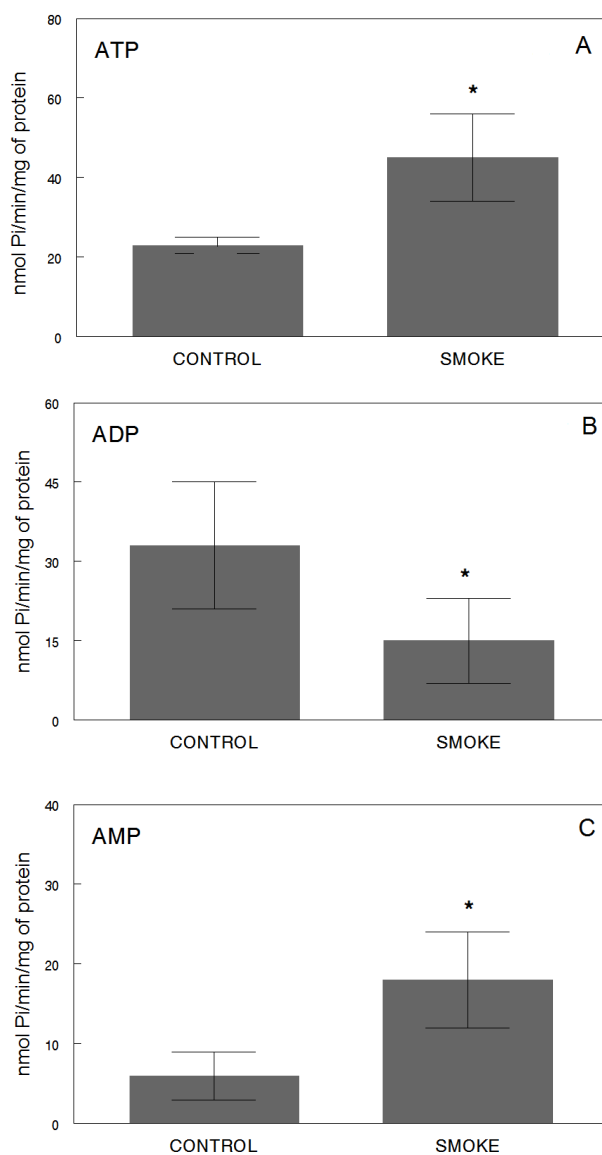


Figure 3. E-NTPDase activity in platelets of rats using ATP (A) and ADP (B) as substrate, 5'-nucleotidase activity in platelets of rats using AMP as substrate (C) after three weeks exposure to cigarette smoke. The control group was not exposed to cigarette smoke and the smoke group was exposed to cigarette smoke. The E-NTPDase and 5'-nucleotidase were expressed in nmol Pi released/min/mg protein. Bars represent mean value \pm SEM. (*P < 0.05; n=10).

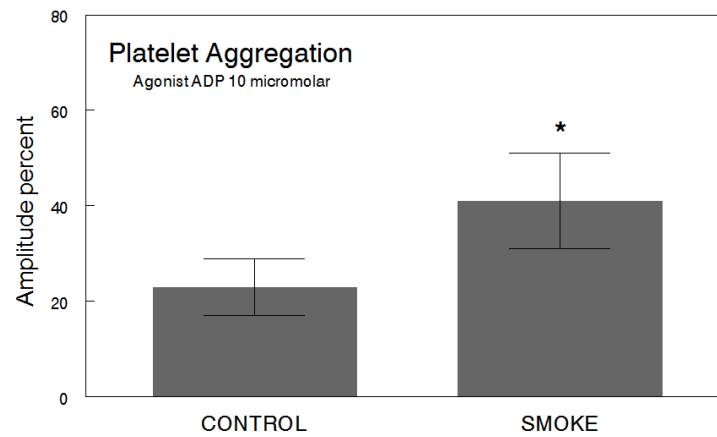


Figure 4. Aggregation of platelets in rats after three weeks exposure to cigarette smoke. The control group was not exposed to cigarette smoke and the smoke group was exposed to cigarette smoke. Bars represent the mean value \pm SEM. ($P < 0.05$; $n=10$). The aggregation of platelets was expressed in amplitude percent.

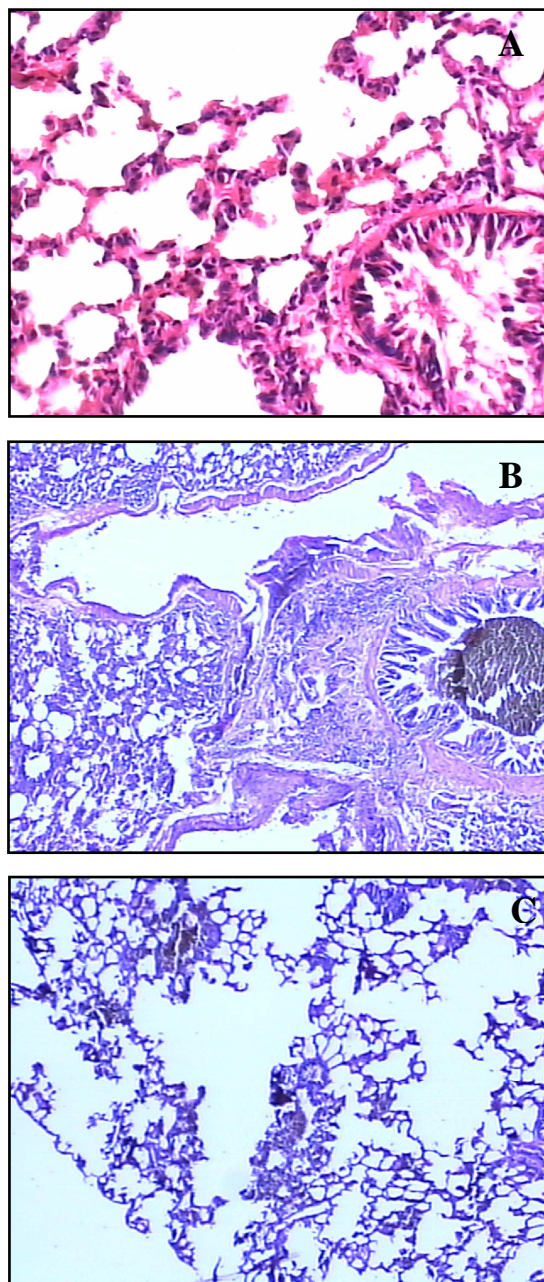


Figure 5. (A) Normal histological aspect of rat lung tissue, H&E (200x). (B) The image of rat lung tissue exposed to cigarette smoke with presence of chronic inflammatory infiltrate on the wall of the bronchiole and peribronchiolar with extension to the alveolar septa of mild to moderate intensity, H&E (40x). (C) Rat lung tissue exposed to cigarette smoke with bumpy alveolar walls, featuring sparse areas of pulmonary emphysema, H&E (100x).

5. DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado que as ectonucleotidases têm importante papel nos processos de trombo-regulação e neurotransmissão. Alterações na atividade dessas enzimas foram observadas em várias doenças sugerindo que as ectonucleotidases podem ser um importante parâmetro fisiológico e patológico (LUNKES et al., 2003, SILVA et al., 2005; ARAUJO et al., 2005; SPANEVELLO et al., 2006a, b; MAZZANTI et al., 2007; SCHETINGER et al., 2007). No entanto, não foi encontrado na literatura estudos que relacionassem os efeitos da exposição à fumaça de cigarro com a atividade das ectonucleotidases em ratos. Estudo prévio realizado em nosso laboratório demonstrou alterações na hidrólise de nucleotídeos ATP e AMP em plaquetas de ratos e na hidrólise do nucleosídeo adenosina em plasma de ratos, causado pela exposição à fumaça de cigarro (THOMÉ et al., 2009). Sendo assim, este é o segundo estudo realizado para investigar as enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeos com o objetivo de comparar o papel fisiológico dessas enzimas no SNC e plaquetas de ratos submetidos ao modelo de exposição à fumaça de cigarro (Figura A).

As pesquisas indicam que a fumaça de cigarro pode mudar a atividade de sistemas biológicos tal como o sangue e o encéfalo, além de muitos constituintes químicos serem capazes de causar dano irreparável no organismo (FUSEGAWA AND HANDA, 2000; MANNA et al., 2006; YANBAEVA et al., 2007). No presente trabalho foi investigado os efeitos da fumaça de cigarro nas atividades da NTPDase e 5'-nucleotidase de encéfalo e plaquetas e atividade da E-NPP de plaquetas, as quais são consideradas enzimas cruciais para o funcionamento normal de muitos tecidos, principalmente do SNC e plaquetas.

Os resultados demonstraram que em sinaptossomas de córtex cerebral a hidrólise do ATP e ADP foram aumentadas em ratos expostos à fumaça de cigarro, e a hidrólise do AMP foi diminuída, demonstrando que compostos originados da fumaça de cigarro alteraram a sinalização purinérgica. O ATP está envolvido em funções importantes no SNC. Inúmeros estudos demonstraram que o ATP é uma molécula que age como neurotransmissor e neuromodulador no SNC. Por outro

lado, a adenosina (produto de quebra do ATP) é também uma importante molécula envolvida com a neuromodulação e neuroproteção do SNC. Já foi reportado que a E-NTPDase e a 5'-nucleotidase são as ectoenzimas de maior relevância envolvidas na hidrólise de nucleotídeos de adenina extracelular na fenda sináptica (CUNHA AND RIBEIRO, 2000; BURNSTOCK AND WILLIAMS, 2000; ZIMMERMANN, 2001; BALZ et al., 2003). Neste estudo, foi demonstrado um aumento na atividade da E-NTPDase e uma diminuição na atividade da 5'-nucleotidase no córtex cerebral de ratos expostos à fumaça de cigarro (Figura 1). É provável que o aumento na atividade da E-NTPDase pode ter importante efeito na função terminal do ATP extracelular e a inibição da 5'-nucleotidase pode diminuir o nível de adenosina. Neste contexto, pode-se sugerir que as alterações causadas pela fumaça de cigarro podem contribuir para o dano neuronal descrito na literatura (US DHHS, 1989; ANBARASI et al., 2005; YANBAEVA et al., 2007).

Neste trabalho, também foi avaliado o efeito da fumaça de cigarro na atividade das ectonucleotidases em plaquetas de ratos. Os resultados demonstraram que a atividade da E-NTPDase aumentou quando o ATP foi usado como substrato e diminuiu quando o ADP foi utilizado como substrato. As atividades da 5'-nucleotidase e E-NPP aumentaram em plaquetas de ratos expostos a fumaça de cigarro (Figuras 2 e 3). Além disso, um estudo prévio demonstrou uma alteração na atividade das ectonucleotidases em plaquetas de ratos expostos à fumaça de cigarro por quatro semanas (THOMÉ et al., 2009). Estes resultados demonstram que a fumaça de cigarro pode alterar a sinalização purinérgica no sistema vascular.

O ATP, o ADP e seu metabólito adenosina podem modular múltiplos efeitos no sistema vascular pela interação com receptores específicos em plaquetas (DI VIRGILIO et al., 2001). O nucleotídeo ADP é o principal responsável por induzir mudanças na forma das plaquetas e promover sua agregação (BIRK et al., 2002a). Por outro lado, a adenosina é um potente inibidor da agregação plaquetária e importante modulador do tônus vascular (ANFOSSI et al., 2002; REMIJIN et al., 2002; BOROWIEC et al., 2006). Além disso, uma alta concentração de ATP inibe a agregação induzida pelo ADP, mas em baixas concentrações o ATP pode contribuir para o aumento do colágeno, do tromboxano A₂ e da trombina os quais induzem ao processo de agregação (SOSLAU AND YOUNGPRAPAKORN, 1997; BIRK et al., 2002a, b). O decréscimo na atividade da NTPDase em relação ao ADP pode

contribuir para efeitos pró-agregantes nas plaquetas, o qual pode estar associado com o aumento da agregação de plaquetas observado nesse estudo (Figura 4). Por outro lado, o aumento das atividades da E-NPP e 5'-nucleotidase encontrados neste estudo, pode estar relacionado com uma resposta orgânica compensatória, contribuindo para produção de adenosina. Neste contexto, sugere-se que a fumaça de cigarro altera os níveis de nucleotídeos interferindo nos processos de coagulação e formação de trombos os quais podem aumentar a propensão de doenças cardíacas (SMITH et al., 2006; YANBAEVA et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que neurônios e plaquetas são células com características similares. As plaquetas são capazes de armazenar e liberar neurotransmissores e expressar apropriado transporte de neurotransmissores (CATTABENI et al., 2004). Por esta razão e pela facilidade de acesso, plaquetas foram usadas na investigação de alterações neuronal. Neste contexto, considerando que a fumaça de cigarro pode estar envolvida em desordens no SNC, foi também investigado o efeito da fumaça de cigarro sob as atividades da E-NPP, E-NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas com objetivo de determinar se a atividade dessas enzimas refletem o "status" das ectonucleotidases no SNC. Os resultados demonstraram que a fumaça de cigarro somente produziu efeito similar nas plaquetas e córtex cerebral para hidrólise de ATP, demonstrando que a atividade de plaquetas no tecido periférico não pode ser considerada um bom marcador para refletir o status de ADP e AMP na fenda sináptica. Assim, pode-se sugerir que o papel fisiológico dessas ectonucleotidases no córtex cerebral e nas plaquetas podem ter sido o principal fator responsável pela diferença na atividade destas enzimas.

Para avaliar a reprodutibilidade do modelo de exposição à fumaça de cigarro envelhecida e diluída pela via secundária (sidestream smoke), foram medidos os gases do sangue, o pH, a carboxihemoglobina e realizado análise anatomopatológica do tecido de pulmão. Não houve mudança nos parâmetros dos gases de sangue (pH, pO_2 e sO_2) devido ao mecanismo compensatório realizado pelo sistema de tamponamento, o qual mantém a homeostase do sangue. Por outro lado, os parâmetros da pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), íon carbonato (HCO_3^-) e pressão total de dióxido de carbono (tCO_2) dos gases de sangue foram alterados no grupo exposto à fumaça de cigarro, demonstrando que os animais

foram expostos eficientemente a fumaça de cigarro (Tabela 1). A alta quantidade de carboxihemoglobina, um biomarcador sanguíneo para fumaça de cigarro, demonstra a eficiência desse modelo de exposição à fumaça de cigarro.

A análise anatomopatológica do tecido de pulmão mostrou a presença de um infiltrado inflamatório crônico na parede de brônquios e peribronquiolar com extensão para os septos alveolares de intensidade leve à moderada. A estrutura desorganizada das paredes alveolares mostrou áreas esparsas de enfisema pulmonar (Figura 5). Estes resultados confirmam uma bronquiolite associada a enfisema pulmonar.

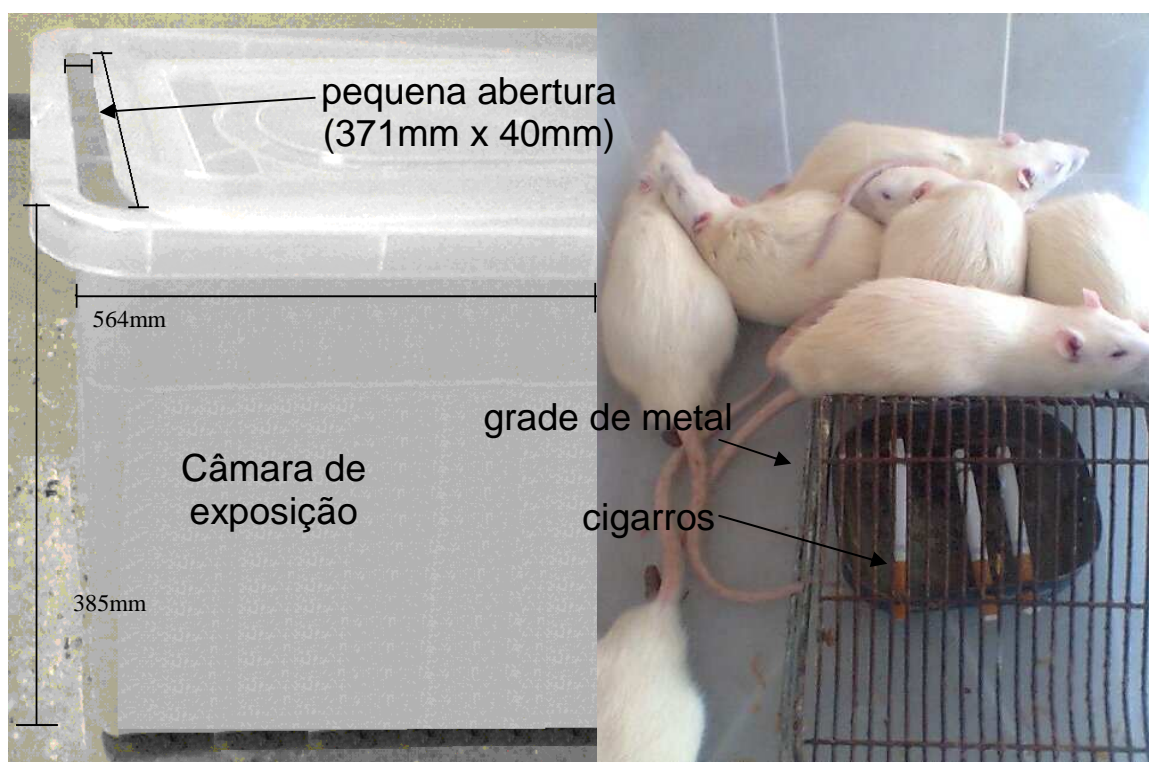


Figura A. Câmara de exposição à fumaça de cigarro em ratos.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A atividade da enzima E-NTPDase (ATP e ADP como substrato) foi aumentada e a atividade da 5'-nucleotidase diminuída em córtex cerebral de ratos expostos à fumaça de cigarro, indicando que esta fumaça pode interferir com a neurotransmissão purinérgica.

- ✓ A atividade da enzima E-NPP, E-NTPDase (ATP como substrato) e 5'-nucleotidase foram aumentadas em plaquetas e a atividade da enzima E-NTPDase (ADP como substrato) foi diminuída nestas células em ratos expostos à fumaça de cigarro. Pode-se sugerir que o aumento na formação de adenosina, esteja associado a um mecanismo compensatório que pode contribuir para o controle dos mecanismos de tromboregulação em modelos de exposição à fumaça de cigarro.

- ✓ As plaquetas não demonstraram ser bom marcador periférico para refletir o status de ectonucleotidases no SNC neste trabalho. Somente a enzima E-NTPDase (ATP como substrato) teve atividade semelhante nos dois locais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANBARASI, K., VANI, G., BALAKRISHNA, K., DEVI, C.S. **Effect of bacoside A on membrane-bound ATPases in the brain of rats exposed to cigarette smoke.** Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 2005; 19: 59-65.

ABREU-VILLAÇA, Y., SEIDLER, F.J., QIAO, D., TATE, C.A., COUSINS, M.M., THILLAI, I., SLOTKIN, T.A. **Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds.** Neuropsychopharmacology 2003a; 28: 1935-1949.

ABREU-VILLAÇA, Y., SEIDLER, F.J., TATE, C.A., SLOTKIN, T.A. **Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations.** Brain Research 2003b; 979: 114-128.

AIRAS, L., HELLMAN, J., SALMI, M., BONO, P., PUURUNEN, T., SMITH, D.J., JALKANEN, S. **CD73 Is Involved in Lymphocyte Binding to the Endothelium: Characterization of Lymphocyte-Vascular Adhesion Protein 2 Identifies It as CD73.** Journal of Experimental Medicine 1995; 182: 1603-1608.

ANDREWS, R.K., SHEN, Y., GARDINER, E.G. **The glycoprotein Ib- IX-V complex in platelet adhesion and signaling.** Thrombosis and Haemostasis 1999; 82: 357-364.

ARESTI, C., MEOMARTINI, M.E., AMADIO, S., AMBROSINI, E., VOLONTÉ, C., ALOISI, F., VISENTIN, S. **ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors.** Brain Research Reviews 2005; 48: 157-165.

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 2005; 1740: 421-426.

BAKER, R.R., ROBINSON, D.P. **Tobacco combustion - the last ten years.** Research Advanced Tobacco Science 1990; 16: 3-71.

BATLOUNI, M. **Ativação plaquetária e trombose arterial.** Arquivo Brasileiro de Cardiologia 1993; v. 60, n.6, p. 425-431.

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 1991; 16: 1303-1310.

BECKER, R.C. **Thrombosis and the role of the platelet.** American Journal of Cardiology 1999; 83: 3-6.

BELL, G.L. AND LAU, K. **Perinatal and neonatal issues of substance abuse.** Pediatric Clinics of North America 1995; 261-281.

BENOWITZ, N.L. **Nicotine and coronary disease.** Trends in Cardiovascular Medicine 1991; 1: 315-321.

BERLIN, I. **Smoking-induced metabolic disorders: A review.** Diabetes & Metabolism 2008; 34: 307-314.

BIGONESSE, F., LÉVESQUE, S.A., LULKUSKI, F., LECKA, J., ROBSON, S.C., FERNANDES, M.J., SEVIGNY, J. **Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8.** Biochemistry 2004; 43: 5511-5519.

BIRK, A., BROEKMAN, M., GLADEK, E., ROBERTSON, H., DROSOPOULOS, J., MARCUS, A., SZETO, H. **Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity.** The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 2002; 40: 166-175.

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

BONAN, C.D., WALZ, R., PEREIRA, G.S., WORM, P.V., BATTASTINI, A.; CAVALLEIRO, E., IZQUERDO, I., SARKIS, J. **Changes in synaptosomal ectonucleotidases activities in two rat models of temporal lobe epilepsy.** Epilepsy Research 2000; 39: 229-238.

BONAN, C.D., SCHETINGER, M.R.C., BATTASTINI, A.M.O., SARKIS, J.J.F. **Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: implications in physiological and pathological conditions.** Drug Development Research 2001; 52: 57-65.

BORGERDING, M. AND KLUS, H. **Analysis of complex mixtures - Cigarette smoke.** Experimental and Toxicological Pathology 2005; 57: 43-73.

BOUISSON, J. **Du cancer buccal chez les fumeurs.** Montpellier Med 1859; 2: 539-99.

BOYLE, P., VERONESI, U., TUBIANA, M. **School of Oncology Advisory Report to the European Commission for the "Europe Against Cancer Programme" European Code Against Cancer.** European Journal of Cancer 1995; 9: 1395-405.

BRAUN, N., BRENDEL, P., ZIMMERMANN, H. **Distribution of 5'-nucleotidase in the developing mouse retina.** Developmental Brain Research 1995; 88: 79-86.

BRAUN, N., LENZ, C., GILLARDON, F., ZIMMERMANN, M., ZIMMERMANN, H. **Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase.** Brain Research 1997; 766: 213-226.

BREDDIN, H.K. **Can platelet aggregometry be standardized?** Platelets 2005; 16(3/4): 151-158.

BURNSTOCK, G. **Dual control of local blood flow by purines.** Annals of the New York Academy of Sciences 1990; 603: 31-44.

BURNSTOCK, G. **Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death.** Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2002; 22: 364-372.

CATTABENI, F., COLCIAGHI, F., DI LUCA, M. **Platelets provide human tissue to unravel pathogenic mechanisms of Alzheimer disease.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 2004; 28: 763-770.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **Annual smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses - United States, 1997-2001.** Morbidity and Mortality Weekly Report 2005; 54: 625-8.

CHAKRABARTI, S.K., LOUA, K.M., BAI, C., DURHAM, H., PANISSET, J.C. **Modulation of monoamine oxidase activity in different brain regions and platelets following exposure of rats to methylmercury.** Neurotoxicology and Teratology 1998; 20: 161-168.

CICARRELLI, R., BALLERINI, P., SABATINO, G., RATHBONE, M., D'ONOFRIO, M., CACIAGLI, F., IORIO, P. **Involvement of astrocytes in purine - mediated reparative processes in the brain.** International Journal of Developmental Neuroscience, 2001; 19: 395-414.

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

CLARKE, P.B.S., REUBEN. M. **Release of [³H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [³H]-dopamine release.** British Journal of Pharmacology 1996; 117: 595-606.

CUNHA, R.A. AND RIBEIRO, J.A. **ATP as a presynaptic modulator.** Life Sciences 2000; 68: 119-137. Minireview.

CUNHA, R.A. **Adenosine as a neuromodulator and as homeostasis regulator in nervous system: different role, different sources and different receptors.** Neurochemistry International 2001; 38: 107-125.

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

DOLL, R., PETO, R., WHEATLEY, K., GRAY, R., SUTHERLAND, I. **Mortality in relation to smoking: 40 years observation on male British doctors.** Medical Publication of the Year 1994; 309: 901-11.

DUAN, R-D, BERGMAN, T., XU, N., WU, J., CHENG, Y., DUAN, J., NELANDER, S., PALMBERG, C., NILSSON, A. **Identification of human intestinal alkaline phingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to nucleotide phosphodiesterase family.** The Journal of Biological Chemistry 2003; 278: 38528-38536.

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

EATOUGH, D.J., HANSEN, L.D., LEWIS, E.A. **The chemical characterization of environmental tobacco smoke.** In: Ecobiochon DJ, Wu JM, editors. Proceedings of the International Symposium at McGill University, 1989. Massachusetts: Lexington Books; 1990; 3-39.

EHRlich, Y.H. AND KORNECKI, E. **Ecto-protein kinases as mediators for the action of secreted ATP in the brain.** Progress in Brain Research 1999; 120: 411–426.

ENJYOJI, K., SÉVIGNY, J., LIN, Y., FRENETTE, P.S., CHRISTIE, P.D., AM ESCH II, J.S., IMAI, M., EDELBERG, J.M., RAYBURN, H., LECH, M., BEELER, D.L., CSIZMADIA, E., WAGNER, D.D., ROBSON, S.C., ROSENBERG, R.D. **Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation.** Nature Medicine 1999; 5: 1010-1017.

ESPINOSA, J. **Células tronco.** Disponível em: <http://www.quadrante.com.br/Jpgs/especiais/031005/02_01.jpg / 17mar2009>

FAMADAS, L.C. **Hemostasia.** Disponível em: < <http://www.sosobesidade.com/Hemostasia.pdf> /17mar2009>

FFFCMPA, **Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre e Serviço de Informações Sobre Substâncias Psicoativas (SISP).** Disponível em: <<http://psicoativas.fffcmpa.edu.br/fum%20pas.html>/ 15jan2009>

FIELDS, R.D., BURNSSTOCK, G. **Purinergic signaling in neuron – glia interactions.** Nature Reviews 2006; 7: 423-436.

FIELDS, D., STEVENS, B. **ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia.** Trends in Neurosciences 2000; 23: 25-633.

FÜRSTENAU, C.R., TRENTIN, D.S., BARRETO-CHAVES, M.L.M., SARKIS, J.J.F. **Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: Kinetic characterization and biochemical properties.** Platelets 2006; 17(2): 84-91.

FUSEGAWA, Y. AND HANDA, S. **Platelet Aggregation Induced by ADP or Epinephrine Is Enhanced in Habitual Smokers.** Thrombosis Research 2000; 97: 287-295.

FUSEGAWA, Y., GOTO, S., HANDA, S., KAWADA, T., ANDO, Y. **Platelet spontaneous aggregation in platelet-rich plasma is increased in habitual smokers.** *Thrombosis Research* 1999; 93: 271-8.

GAETANO, G. **Historical overview of the role of platelets in hemostasis and trombosis.** *Haematologica* 2001; 4: 349-356.

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

GENBACEV-KRTOLICA, O. **High light for phenols, quinolines, indoles, benzene and 2-cyclopenten-1-one are oviduct toxicants in cigarette smoke, by Prue Talbot, Karen Riveles, and Ryan Rosa: List of tobacco-smoke constituents that are harmful for reproduction grows-passive smokers may be at risk.** *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 2005; 86(1): 4-5.

GIBB, A., HALLIDAY, F. **Fast purinergic transmission in the central nervous system.** *The Neuroscience* 1996; 8: 225-232.

GIBBONS, G.H. **Autocrine-paracrine factors and vascular remodeling in hypertension.** *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 1993; 2: 291-298.

GIJSBERS, R., CEULEMANS, H., STALMANS, W., BOLLEN, M. **Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases.** *J Biol Chem* 2001; 276: 1361-1368.

GIOVANNUCCI, E., RIMM, E.B., ASCHERIO, A., COLDITZ, G.A., SPIEGELMAN, D., STAMPFER, M.J., WILLETT, W.C. **Smoking and Risk of Total and Fatal Prostate Cancer in United States Health Professionals.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999; 8: 277-282.

GODING, J.W., GROBBEN, B., SLEGGERS, H. **Physiological and patophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1638: 1-19.

GUERIN, M.R., JENKINS, A.R. **Environmental tobacco smoke.** Research Advanced Tobacco Science 1992a; 18: 95-114.

GUERIN, M.R., JENKINS, R.A., TOMKINS, B.A. **The chemistry of environmental tobacco smoke: composition and measurement.** Chelsea, Michigan: Lewis Publisher 1992b.

HACKSHAW, A.K., LAW, M.R., WALD, N.J. **The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke.** British Medical Journal 1997; 315: 980-988.

HAMMOND, D., FONG, G.T., CUMMINGS, K.M., O'CONNOR, R.J., GIOVINO, G.A., MCNEILL, A. **Cigarette Yields and Human Exposure: A Comparison of Alternative Testing Regimens.** Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention 2006; 15(8): 1495-501.

HARDING, S.A., SARMA, J., JOSEPHS, D.H. **Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers.** Circulation 2004; 109:1926-1929.

HARKER, L. **The role of platelets in the early and the late vascular responses initiated by mechanical vascular injury.** Antithrombotic Therapy 1997; 11: 97-103.

HECKERLING, G. **Artigos de Gregório Heckerling.** Disponível em: <<http://www.amigosdocachimbo.com.br/artigos/> 08mar2009>

HOFFMANN D. AND HOFFMANN I. **The changing cigarette, 1950-1995.** Journal of Toxicology and Environmental Health 1997; 50, n.4, 307-364(58).

HOOVER, C.M., GALLICCHIO, L., GENKINGER, J.M., COMSTOCK, G.W., ALBERG, A.J. **A Prospective Cohort Study of Rectal Cancer Risk in Relation to Active Cigarette Smoking and Passive Smoke Exposure.** Journal Annals of Epidemiology 2007; 07: 1047-2797

HOUSTON, T. **Tobacco: A Cultural History of How an Exotic Plant Seduced Civilization.** Ed. Medscape General Medicine 2002; 4(2): 403p.

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

ILLES, P., RIBEIRO, J.A. **Neuronal P2 receptors of the central nervous system.** *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2004; 4(8): 831-8.

KANNAN, S. **E-NTPase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation.** *Medical Hypotheses* 2002; 58(6): 527-528.

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

KOZLOWSKI, L., O'CONNOR, R.J., SWEENEY, C.T. Cigarette Design. In: Shopland DR, Burns DM, Benowitz NI, Amacher RH, editors. **Risks associated with smoking cigarettes with low machine-measured yields of tar and nicotine.** NCI smoking and tobacco control monograph no. 13. Bethesda (Maryland): U.S. Department of Health and Human Services, NIH, National Cancer Institute; 2001, p.13-35.

LANTZ, P.M. **Smoking on the rise among young adults: implications for research and policy.** *Tobacco Control* 2003; 12: 160-70.

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

LEE, R.G., BITHEL, T., FOERSTER, J., ATHENS, J.W., LUKENS, J.N. WINTROLE. **Hematologia Clínica.** v.I/II. São Paulo: Manole, 1998, p.2623.

LEVIN, E.D. AND SLOTKIN, T.A. **Developmental neurotoxicity of nicotine.** In: Slikker, W., Chang, L.W. (Eds.), *Handbook of Developmental Neurotoxicology.* Academic Press, San Diego 1998; 587-615.

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

LUCHESE, C., STANGHERLIN, E.C., ARDAIS, A.P., NOGUEIRA, C.W., SANTOS, F. W. **Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups.** *Toxicology* 2007; 230: 189-196.

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

LUNKES, G., LUNKES, D., MORSCH, V., MAZZANTI, C., MORSCH, A., MIRON, V., SCHETINGER, M.R.C. **NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan induced diabetes.** *Diabetes Research and Clinical Practice* 2004; 65: 1-6.

MANNA, S.K., RANGASAMY, T., WISE, K., SARKAR, S., SHISHODIA, S., BISWAL, S., RAMESH, G.T. **Long term environmental tobacco smoke activates nuclear transcription factor-kappa B, activator protein-1, and stress responsive kinases in mouse brain.** *Biochemical Pharmacology* 2006; 71: 602-1609.

MARCUS, A.J., BROEKMAN, M.J., DROSOPOULOS, J., ISLAM, N., PINSKY, D. **Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1).** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1: 2497-2509.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Prevalência de tabagismo no Brasil, dados dos inquéritos epidemiológicos em capitais brasileiras.** Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/binary/down_sem/PRDownloadServlet?arquivo=Prvalencia_Tabagismo_Brasil_Inquerito_Domiciliar.pdf. / 28jan2009>.

MONACO, P.D., VIDOLIN, A.J. **A História do Tabaco.** Disponível em: <<http://pt.shvoong.com/medicine-and-health/1797721-hist%C3%B3ria-tabaco-livre-se-cigarro/> 12mar2009>.

MUNDAL, H.H., HJEMDAHL, P., GJESDAL, K. **Acute Effects of Cigarette Smoking on Platelet Function and Plasma Catecholamines in Hypertensive and Normotensive Men.** *American Journal of Hypertension* 1998; 11: 677-681.

MUSK, A.W., DE KLERK, N.H. **History of tobacco and health.** *Respirology* 2003; 8(3): 286-290.

NAEYE, R.L. **Cognitive and behavioral abnormalities in children whose mothers smoke cigarettes during pregnancy.** Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics 1992; 425-428.

OLAUSSON, P., ENGEL, J.A., SODERPALM, B. **Involvement of serotonin in nicotine dependence: Processes relevant to positive and negative regulation of drug intake.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior 2002; 71: 757-771.

ONAL, A., UYSAL, A., ULKER, S., DELEN, Y., YURTSEVEN, M.E., EVINÇ, A. **Alterations of brain tissue in fetal rats exposed to nicotine in utero: possible involvement of nitric oxide and catecholamines.** Neurotoxicology and Teratology 2004; 26: 103-112.

ÖSTERREICH, D. **Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz**, 1885. Disponível em: <http://caliban.mpizkoeln.mpg.de/~stueber/thome/band4/tafel_033.html / 17mar2009>

PANDA, K., CHATTOPADHYAY, R., GHISH, M.K., CHATTOPADHYAY, D.J., CHATTERJEE, I.B. **Vitamin C prevents cigarette smoke-induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis.** Free Radical in Biology and Medicine 1999; 27: 1064-1079.

PETO, R., LOPEZ, A.D., BOREHAM, J., THUN, M, HEATH. C. **Mortality from Smoking in Developed Countries: 1950-2000.** Oxford: Oxford University Press 1994.

PHILIP MORRIS INTERNATIONAL. **What's in Philip Morris International brands in Brazil;** Product Ingredients Brazil. Disponível em: <<http://www.pmintl-technical-product-information.com/asp/country.aspx?CountryName=BR> / 17mar2009>

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

PORTAL DE CHARUTOS DO BRASIL. **A História do Tabaco.** Disponível em: <http://www.charutos.com.br/artigos/art_charutos15.htm / 12mar2009>

RALEVIC, V. **Roles of purines and pyrimidines in endothelium.** In: Abbracchio MP, Williams M, eds. Purinergic and Pyrimidines in Endothelium. Berlin, Germany: Springer 2001; 101-120.

RAHMAN, I., MORRISON, D., DONALSON, K., MACNEE, W. **Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1996; 154: 1055-1060.

RAINESALO, S., KERANEN, T., PELTOLA, J., SARANSAARI, P. **Glutamate uptake in blood platelets from epileptic patients.** Neurochemistry International 2003; 23: 389-392.

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

RATHBONE, M., MIDDLEMISS, P., GYSBERS, J. ET AL. **Trophic effects of purines in neurons and glial cells.** Progress in Neurobiology 1999; 59: 663-690.

REMIJIN, J.A., WU, Y., JENINGA, E.H. ET AL. **Role of ADP receptor P2y12 in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood.** Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2002; 22: 686-691.

RIBEIRO, J.A., SEBASTIÃO, A., MENDONÇA, A. **Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications.** Progress in Neurobiology 2003; 68: 377-392.

RIGOTTI, N.A. AND PASTERNAK, R.C. **Nicotine and coronary disease.** Cardiology Clinics 1996 4(1): 51-68.

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

ROCKVILLE, M.D. **Office of Applied Studies. Substance Use and Mental Health Services Administration.** Overview of Findings from the 2004 National Survey on Drug Use and Health. 2005 vol. NSDUH Series H-27. DHHS Publication no. SMA 05-4061.

ROSEMBERG, J. **Pandemia do Tabagismo Enfoques históricos e atuais.** Secretaria de saúde do Estado de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

SARKIS, J., BATTASTINI, A., OLIVEIRA, E., FRASSETO, S., DIAS, F. **ATP diphosphohydrolases: and overview.** Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science 1995; 43: 131-136.

SCHACHTER, M. **Endothelium and smooth muscle: trophic interactions and potential for therapeutic intervention.** Journal of Human Hypertension 1990; 4: 17-21.

SCHEREK, R., BAKER, L.A., BALLARD, G., DOLGOFF, S. **Tobacco Smoking as an Etiologic Factor in Disease: cancer.** Cancer Research 1950; 10: 49-58.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N. **Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation.** Blood 2002; 99: 2801-2809.

SCHETINGER, M.R.C., BONAN, C.D., SCHIERHOLT, R.C., WEBBER, A., ARTENI, N., EMANUELLI, T., DIAS, R.D., SARKIS, J.J.F., NETTO, C.A. **Nucleotide Hydrolysis in Rats Submitted to Global Cerebral Ischemia: A Possible Link Between Preconditioning and Adenosine Production.** Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases 1998; 7(5): 281-286.

SHI, J., KUKAR, T., WANG, C., LI, Q., CRUZ, P. **Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase.** The Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 17471-17478.

SLOTKIN, T.A. **Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse?** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1998; 285: 931-945.

SLOTKIN, T.A. **Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos.** Environmental Health Perspective 1999; 107(1): 71-80.

SLOTKIN, T. A. **Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates.** Toxicology and Applied Pharmacology 2004; 198: 132– 151. Review.

SMITH, C.J., PERFETTI, T.A., KING, J.A. **Perspectives on Pulmonary Inflammation and Lung Cancer Risk in Cigarette Smoker.** *Inhalation Toxicology* 2006; 18: 667-677.

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

SPANEVELLO, R.M., MAZZANTI, C.M., KAIZER, R., ZANIN, R., CARGNELUTTI, D., HANNEL, L., CORRÊA, M., MAZZANTI, A., FESTUGATTO, R., GRAÇA, D., SCHETINGER, M.R.C., MORSCH, V.M. **Apyrase and 5'-nucleotidase Activities in Synaptosomes from the Cerebral Cortex of Rats Experimentally Demyelinated with Ethidium Bromide and Treated with Interferon- β .** *Neurochemical Research* 2006; 31: 455-462.

SPERLÁGH, B., VIZI, E. **Neuronal synthesis, storage and release of ATP.** *The Neuroscience* 1996; 8: 175-186.

STEVENS, B., PORTA, S., HAAK, L.; GALLO, V.; FIELDS, D. **Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials.** *Neuron* 2002; 36: 855-868.

THOMÉ, G.R., MAZZANTI, C.M., AHMED, M., CORRÊA, M., SPANEVELLO, R.M., MALDONADO, P.A., LUCHESE, C., CARGNELUTTI, D., MORCH, V.M., DE BONA, K.S., DUARTE, M.M.M.F., MAZZANTI, A., FIORENZA, A., DA LUZ, S.C.A., NOGUEIRA, C.W., SCHETINGER, M.R.C. **Activity of ectonucleotidases and adenosine deaminase in rats exposed to cigarette smoke.** *Inhalation Toxicology* 2009 (in press).

WAAL-MANNING, H.J., DE HAMEL, F.A. **Smoking habit and psychometric scores: a community study.** *New Zealand Medical Journal* 1978; 88:188-91.

WALD, N., HACKSHAW, A.K. **Cigarette smoking: an epidemiological overview.** In: Doll R, Drofton J, eds. *Tobacco Health.* *British Medical Bulletin* 1996; 52: 3–11.

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

WANG, T., GUIDOTTI, G. **Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system.** Brain Research 1998; 790: 318-322.

WESCHLER, H., RIGOTTI, N.A., GLEDHILL-HOYT, J., LEE, H. **Increasing levels of cigarette use among college students.** The Journal of the American Medical Association 1998; 280: 1673-8.

WINK, M., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A., CASALI, E., KARL, J., BARRETO-CHAVES, M., SARKIS, J.J., BATTASTINI, A. **Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocytes cultures from different brain regions.** Neurochemistry International 2003; 43: 621-628.

YANBAEVA, D.G., DENTENER, M.A., CREUTZBERG, E.C., WESSELING, G., WOUTERS, E.F.M. **Systemic Effects of Smoking.** American College of Chest Physicians 2007; 131: 1557-1566.

ZAMBONI, M. **Epidemiologia do câncer do pulmão.** Journal Pneumologia 2002; 28(1):41-7.

ZIGANSHIN, A., HOYLE, C., BURNSTOCK, G. **Ecto-Enzymes and metabolism of extracellular ATP.** Drug Development Research 1994; 32: 134-146.

ZIMMERMANN, H. **Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system.** Progress in Neurobiology 1996; 49: 589-618.

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

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

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