

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Sabrina Fontana de Andrade

**ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM
PLAQUETAS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Santa Maria, RS
2016

Sabrina Fontana de Andrade

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE
PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito para obtenção do Grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva
Coorientadora: Prof. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Andrade, Sabrina Fontana de
Atividade de enzimas do sistema purinérgico em
plaquetas de pacientes com mieloma múltiplo / Sabrina
Fontana de Andrade.- 2016.
49 f.; 30 cm

Orientador: José Edson Paz da Silva
Coorientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Mieloma múltiplo 2. Sistema purinérgico 3.
Plaquetas 4. ADP. ATP 5. Adenosina I. Silva, José Edson
Paz da II. Leal, Daniela Bitencourt Rosa III. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Sabrina Fontana de Andrade. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: binafarmacia@yahoo.com.br

Sabrina Fontana de Andrade

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE
PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito para obtenção do Grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 2 de agosto de 2016:

José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)
(Coorientadora)

Juliana Fleck, Dra. (UNIFRA)

Clóvis Paniz, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me dar condições de persistir e por me acompanhar nessa caminhada.

Aos meus pais, Elemar e Giselda, que sempre me incentivaram a progredir e estiveram sempre presentes me auxiliando para que essa conquista fosse possível.

Ao meu irmão, Diego, que me inspirou pela sua busca incessável pelo conhecimento e sua dedicação à vida acadêmica.

Ao meu marido, Jáder, e minha filha, Laura, por estarem sempre ao meu lado e por saberem compreender as minhas ausências.

Agradeço ao meu orientador, professor José Edson Paz da Silva, por ter acreditado na minha capacidade e ter me proporcionado essa oportunidade.

À professora Daniela Bitencourt Rosa Leal, minha coorientadora, pela disponibilidade e pelo auxílio para tornar esse trabalho possível.

Aos meus colegas de trabalho e amigos do LAC, muito obrigado por me incentivarem a ingressar no mestrado e ao apoio através dos conhecimentos de cada um e das palavras de persistência nos momentos complicados.

Aos pacientes, que aceitaram colaborar para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização desse estudo, o meu sincero agradecimento.

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas”.

(Steve Jobs)

RESUMO

ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

AUTORA: Sabrina Fontana de Andrade

ORIENTADOR: José Edson Paz da Silva

O mieloma múltiplo (MM) caracteriza-se como um tumor de células plasmocitárias que corresponde a aproximadamente 10% das neoplasias hematológicas. Até os dias de hoje é considerada como uma doença incurável, que pode durante o seu percurso, apresentar complicações como sangramentos ou trombose. A hemostasia é o equilíbrio entre pró-coagulantes e anticoagulantes, com o objetivo de prevenir a perda de sangue. As ectonucleotidases, presentes na superfície plaquetária, são responsáveis pela regulação dos níveis extracelulares de nucleotídeos de adenina. ATP e ADP, bem como o nucleosídeo adenosina, têm sido implicados em um grande número de funções fisiológicas: o ADP é o principal fator recrutador de plaquetas, enquanto que o ATP é um inibidor competitivo da agregação induzida por ADP. A adenosina é uma molécula capaz de induzir vasodilatação e inibir a agregação plaquetária. O processo de ativação plaquetária é acompanhado pela secreção de proteínas plaquetárias, como o fator 4 plaquetário (PF4) e o aumento da formação de tromboxano (TXA₂). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade das ecto-enzimas (E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA) nas plaquetas e mensurar as concentrações de PF4 e TXA₂ em pacientes com MM. Os resultados demonstraram uma redução significativa na atividade da E-NTPDase para hidrólise de ATP tanto nos pacientes tratados ($p < 0,001$) como naqueles que estavam sem receber tratamento ($p < 0,05$) para MM. Essa redução pode acarretar em uma diminuição dos níveis extracelulares de ADP, já que essa enzima é responsável pela conversão de ATP em ADP, o que estaria reduzindo a agregação plaquetária nos pacientes com MM. Quando avaliou-se a atividade da enzima E-5'-nucleotidase, nenhuma diferença estatística foi observada nesses pacientes. Um aumento significativo ($p < 0,001$) na atividade da E-ADA foi observado nos pacientes com MM realizando tratamento, podendo esse ter ocorrido como uma resposta fisiológica ao aumento de adenosina nesses pacientes. A adenosina tem propriedade antiagregante e vasoprotetora e o seu aumento pode estar relacionado com os medicamentos utilizados por esses pacientes. As dosagens de PF4 e TXB₂ (metabólito estável do TXA₂) revelaram valores séricos menores dessas substâncias nos pacientes com MM não tratados ($p < 0,05$; $p < 0,001$) e MM tratados ($p < 0,01$; $p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Esses dados revelam uma menor capacidade de agregação e ativação de plaquetas nos pacientes com MM, e evidenciam a participação da sinalização purinérgica na hemostasia desses pacientes.

Palavras-chave: Mieloma múltiplo. Sistema purinérgico. Plaquetas. ADP. ATP. Adenosina.

ABSTRACT

ACTIVITY OF THE PURINERGIC SYSTEM ENZYME IN PLATELETS OF MULTIPLE MIELOMA PATIENTS

AUTHOR: SABRINA FONTANA DE ANDRADE
ADVISOR: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Multiple myeloma (MM) is characterized as a tumor of plasma cells which corresponds to approximately 10 % of haematological malignancies. Nowadays it is considered as an incurable disease, which can present complications such as bleeding or thrombosis. Hemostasis is the balance between procoagulant and anticoagulant systems aiming to prevent blood loss. The enzymes ectonucleotidases present on platelet surface are responsible for the regulation of extracellular levels of adenine nucleotides. ADP and ATP, as well as the nucleoside adenosine have been involved in a large number of physiological functions: ADP is the main platelets recruitment factor, while ATP is a competitive inhibitor of ADP-induced aggregation. Adenosine is a molecule able to induce vasodilation and inhibit platelet aggregation. Platelet activation process is accompanied by the secretion of platelet proteins such as platelet factor 4 (PF4) and increased formation of thromboxane (TXA₂). Considering these concepts the aim of this study was to evaluate the activity of ecto-enzymes (E- NTPDase, 5'- nucleotidase and E -ADA) in platelets and measuring concentration of PF4 and TXA₂ in patients with MM. The results showed a reduction in the E-NTPDase activity for ATP hydrolysis in both treated ($p < 0,001$) patients and in those who were not receiving treatment ($p < 0,05$) for MM in the period of blood samples collection. This reduction can result in a decrease in extracellular levels of ADP, as this enzyme is responsible for conversion of ATP into ADP, which would reduce platelet aggregation in patients with MM. When we evaluated the enzyme E-5'- nucleotidase, no statistical difference was observed concerning its activity in these patients. An increase in E- ADA activity ($p < 0,001$) was observed in patients with MM performing treatment, this may have occurred as a physiological response to increase of adenosine in these patients. Adenosine has vasoprotective and antiplatelet property and its increase can be related to the medicines used for these patients. Dosages of PF4 and TXB₂ (stable metabolite of TXA₂) showed lower values of these substances in MM untreated ($p < 0,05$; $p < 0,001$) and MM treated patients ($p < 0,01$; $p < 0,001$) in the control group. These data reveal a lower capacity aggregation and platelet activation in patients with MM, and highlight the participation of purinergic signaling in hemostasis in these patients.

Keywords: Multiple Myeloma. Purinergic system. Platelets. ADP. ATP. Adenosine.

LISTA DE QUADROS

APRESENTAÇÃO

Quadro 1 – Componentes das plaquetas.....	18
--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

APRESENTAÇÃO

- Figura 1** – Etapas da hemostasia primária 19
- Figura 2** - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina 22

MANUSCRITO

- Figura 1.-** E-NTPDase activity with ATP (A) or ADP (B) as substrate and E-5'-NT activity (C) in platelets of multiple myeloma (MM) treated (n = 18) and untreated (n = 6) patients and control group (n = 19). Bars represent means \pm SEM. The asterisk symbol represents statistical difference (*) $P < 0.05$ and (***) $P < 0.001$ between the MM groups and control group (ANOVA with the Tukey *post hoc* test) 35
- Figura 2.-** Ecto-Adenosine deaminase (E-ADA) activity in platelets of healthy volunteers (control, n = 19), untreated MM patients (untreated MM, n = 6) and patients receiving treatment (treated MM, n = 18) using adenosine as substrate, respectively. Bars represent means \pm SEM. The asterisk symbol represents statistical difference (*) $P < 0.05$ and (***) $P < 0.001$ between the MM groups and control group (ANOVA with the Tukey *post hoc* test) 36
- Figura 3. -** Serum PF4 (A) and plasmatic TXB₂ (B) in healthy volunteers (control, n = 19), untreated MM patients (untreated MM, n = 6) and patients receiving treatment (treated MM, n = 18). Bars represent means \pm SEM. The asterisk symbol represents statistical difference (*) $P < 0.05$, (**) $p < 0,01$ and (***) $P < 0.001$ between the MM groups and control group (ANOVA with the Tukey *post hoc* test) 37

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1. – Drugs used in the treatment of MM patients.....	31
Tabela 2. – Platelet parameters, age and gender of patients receiving treatment for multiple myeloma (treated MM), untreated patients (untreated MM) and control group	34

ANEXOS

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos	48
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT:	Serotonina
ADP:	Adenosina difosfato
AMP:	Adenosina monofosfato
ATP:	Adenosina trifosfato
COX-1:	Ciclo-oxigenase-1
E-5-NT:	Ecto-5'-nucleotidase
E-ADA:	Ecto- adenosina desaminase
E-NPP:	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDase:	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
GP:	Glicoproteína
HUSM:	Hospital Universitário de Santa Maria
Ig:	Imunoglobulina
IMiDs:	Droga Imunomoduladora
MM:	Mieloma múltiplo
MO:	Medula óssea
PF4:	Fator 4 plaquetário
TEV:	Tromboembolismo venoso
TXA₂:	Tromboxano A ₂
TXB₂:	Tromboxano B ₂

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	14
1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	MANUSCRITO	26
4	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS.....	48

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita de forma que primeiramente são apresentados os itens **INTRODUÇÃO** e **OBJETIVOS**. As seções **MATERIAIS e MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO** estão apresentadas sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item “**MANUSCRITO**”.

O item **CONCLUSÃO** está disposto após o manuscrito, apresentando interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados apresentados no artigo. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente as citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia incurável caracterizada por proliferação de plasmócitos clonais na medula óssea (MO) que pode cursar com alterações imunofenotípicas heterogêneas, além de múltiplas disfunções orgânicas, como produção de grande quantidade de imunoglobulina (Ig) monoclonal ou fragmento desta, chamada proteína M, falência renal, hipercalemia com destruição esquelética, anemia e infecções recorrentes (BAITALLE,1997; MANGAN, 2005; KYLE,2009).

O MM predomina no sexo masculino e na raça negra, sendo a idade média dos pacientes, ao diagnóstico, 65 anos. Aproximadamente 15% dos casos de MM recém diagnosticados encontram-se na condição de assintomático (KYLE et al., 2003; RAJKUMAR, 2005; SMITH, 2005).

Após a confirmação do diagnóstico de MM, o paciente deve ser avaliado quanto ao prognóstico (GREIPP et al., 2005). O tratamento deve ser iniciado exclusivamente em doentes com MM sintomático. Recomenda-se apenas vigilância clínica nos casos assintomáticos, uma vez que a quimioterapia convencional precoce não mostrou qualquer impacto na sobrevivência global (CHOU, 2012).

A escolha do tratamento inicial está dependente da estratificação do risco e da elegibilidade do candidato para quimioterapia de alta dose seguida de transplante autólogo de células estaminais hematopoiéticas. Deste modo, os indivíduos com idades inferiores a 65 anos, doença ativa e sem comorbidades significativas são candidatos ao autotransplante (HAROUSSEAU et al., 2009).

Considerando os pacientes não candidatos ao transplante, o agente mais utilizado é o melfalan associado à prednisona, com nível de resposta em até 60% dos pacientes (ANDERSON et al., 2000). O inibidor de proteassoma, bortezomibe mostra significativa atividade, tanto em MM recém-diagnosticado quanto refratário. Quando combinado com dexametasona em pacientes recentemente diagnosticados, as taxas de resposta ficam próximas de 90%, com 10% dos pacientes atingindo uma resposta completa (SAN MIGUEL et al., 2008; JAGANNATH et al.,2009;). Mais recentemente, foi relatado o uso de bortezomibe em combinação com ciclofosfamida e dexametasona, com uma taxa de resposta global de 88%, com resultados rápidos e toxicidades gerenciáveis (REEDER et al., 2009).

A talidomida, uma droga imunomoduladora (IMiDs), isoladamente ou em combinação com a dexametasona, tem sido utilizada em diversos centros para o tratamento de recaída pós-transplante. Seu papel como tratamento de manutenção e como terapia de primeira linha também é alvo de grande interesse (MAIOLINO; MAGALHAES, 2007).

As neoplasias são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de eventos trombóticos. O MM não foge dessa regra. Até 1999 relatava-se que os pacientes com MM ativo, com necessidade de tratamento, apresentavam 10% de frequência de tromboembolismo venoso (TEV) (BARLOGIE ,et al.,1999).

A relação entre câncer e alteração na coagulação já havia sido sugerida há quase 150 anos por Trousseau; posteriormente, ficou claro o maior risco que os pacientes oncológicos têm de desenvolverem fenômenos tromboembólicos. Isto pode ser consequência da ativação do sistema de coagulação pelas células neoplásicas ou pelas terapias empregadas (quimioterapias e cirurgias) (PRANDONI et al., 2002).

O tratamento de pacientes com MM, em particular com a introdução de medicamentos como IMiDs e inibidores de proteassomas nos últimos anos, podem também ter afetado os processos anticoagulantes e pró-trombóticos. O risco de TEV em pacientes que receberam esquema terapêutico baseado em um agente imunomodulador, especialmente quando usado em combinação com altas doses de dexametasona, varia de 3% para 19% na ausência de tromboprolifaxia (CARRIER et al., 2011; RUPA-MATYSEK et al., 2011; TIMP et al., 2013).

Por outro lado, a incidência de trombose venosa e arterial é muito baixa durante o tratamento com regimes contendo bortezomibe. Estudos pré-clínicos sugerem um possível efeito antitrombótico do inibidor do proteossoma, devido ao efeito inibitório do bortezomibe no fator nuclear $K\beta$ (NF- $K\beta$) e uma redução da agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP) de maneira dependente da dose (OSTROWSKA et al., 2004; AVCU et al., 2008; ZANGARI et al., 2011).

As descrições clássicas relatam que, durante o curso clínico do MM, 15%-30% dos pacientes podem apresentar manifestações hemorrágicas, que variam de acordo com o tipo de MM (15% para Imunoglobulina G e 30% para Imunoglobulina A) (BARLOGIE,et al.,1999).

São descritas várias causas como responsáveis por esses sangramentos, podendo acometer todos os componentes da hemostasia. Assim, são descritas: a) infiltração vascular pela célula maligna, b) plaquetopenia secundária à infiltração medular ou ao tratamento realizado, c) anormalidades funcionais das plaquetas (incluindo uremia), d) doença ou síndrome de von Willebrand adquirida, e) deficiências adquiridas de fatores da coagulação secundárias à doença hepática, f) presença de anticoagulantes circulantes do tipo heparina e g) inibição da polimerização da fibrina. Outras importantes condições associadas às manifestações hemorrágicas são a síndrome de hiperviscosidade e a sepse (EBY, et al., 2003).

As plaquetas são particularmente afetadas na presença de neoplasias: até 30% dos pacientes apresentam aumentos na plaquetometria e 11% apresentam diminuição (SUN et al.,1979). Também já foi demonstrado que as plaquetas agregam-se *in vitro* na presença de células neoplásicas e ocorre plaquetopenia quando da infusão dessas células *in vivo* (GASIC et al.,1976). Plaquetas ativadas têm maior poder adesivo e interagem com outras células como leucócitos, células endoteliais ou células tumorais (VARON et al.,2001). Êmbolos tumorais usualmente são envoltos em uma rede de fibrina e plaquetas que contribuem para a adesão endotelial. Esse trombo tumoral, uma vez aderido ao endotélio, leva à lesão e, conseqüentemente, à liberação do fator de permeabilidade vascular, além de perda da inibição da agregação plaquetária, anticoagulação e vasodilatação local (DE CICCIO, 2004).

O processo hemostático consiste de uma série de reações bioquímicas e fisiológicas que culminam no impedimento do sangramento dos vasos sanguíneos, os quais tenham sido quimicamente ou fisicamente traumatizados. A hemostasia é realizada através da interação de três sistemas biológicos: (1) componentes da vasculatura, incluindo células endoteliais; (2) plaquetas sanguíneas; (3) proteínas plasmáticas das vias de coagulação intrínseca e extrínseca (MARCUS, 1999).

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

Baseado em observações a partir da microscopia eletrônica, as plaquetas podem ser divididas em três zonas anatomicamente distintas: membrana, citoesqueleto e organelas, conforme descrito no Quadro 1 (JOHNS, 2004).

Quadro 1 – Componentes das plaquetas

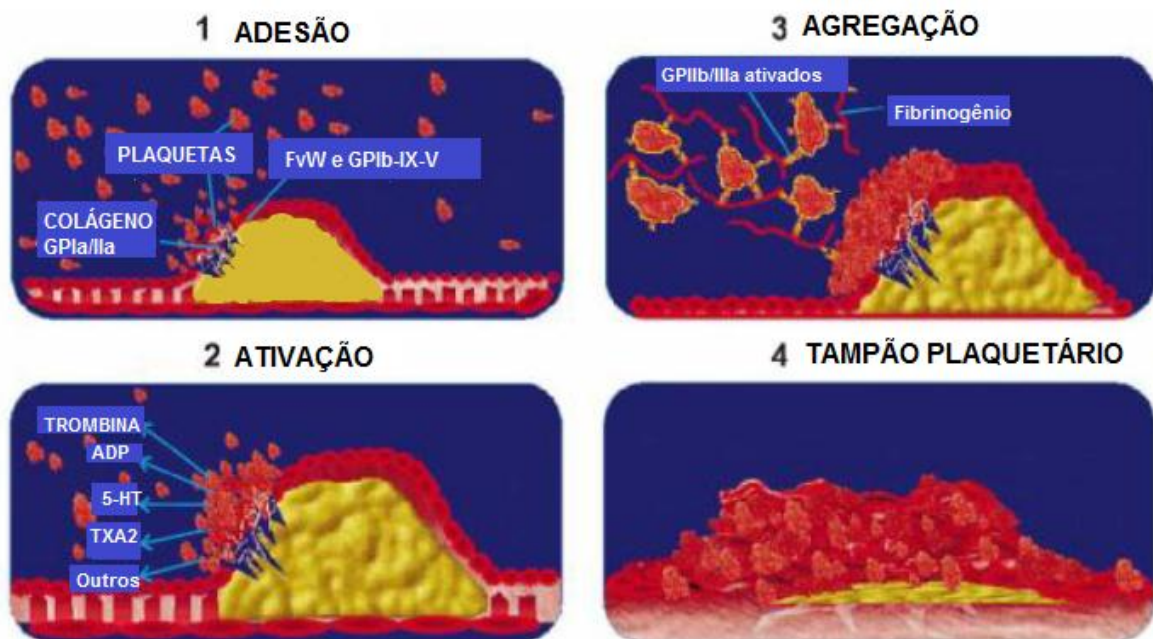
Zona	Estrutura primária	Componentes	Função
Membrana	Membrana plasmática	Mucopolissacarídeos para absorção de proteínas pró-coagulantes do plasma	Adesão e agregação plaquetária
	Membrana plaqueta	Microtúbulos e microfilamentos para estrutura e suporte	
	Submembrana	Receptor de glicoproteínas (GP)	
Citoesqueleto	Microfilamentos		Manter a forma e promover contração
Organelas	Alfa grânulos	Albumina Alfa-2 antiplasmina C1 inibidor de esterase Fator plaquetário 4 (PF4) PF4 baixa afinidade Beta tromboglobulina Fator de crescimento Fibrinogênio Fator V Fibronectina VWF antígeno	Adesão primária e secundária e agregação de plaquetas
	Corpos densos	ATP ADP Serotonina Cálcio	Fonte promotora de energia, adesão de plaquetas

Fonte: Adaptado de JOHNS, 2004.

A membrana consiste em uma bicamada de fosfolípidos típica, que contém glicoproteínas de membrana (WHITE; CLAWSON, 1980). Possui um sistema de canais abertos e invaginações, fazendo com que a superfície de contato com o ambiente plasmático seja igual ou superior ao de células com dimensões maiores (POLASEK, 2006). Também é na membrana que estão presentes os receptores de glicoproteínas (GP) tais como, GPIb, GPIIb, GPIIIa, GPIX. O citoesqueleto é composto por microtúbulos e microfilamentos, que servem para manter a forma discoide e fornecer capacidade contrátil deste fragmento celular. Finalmente, a terceira região anatômica, a das organelas, está constituída basicamente por grânulos (JOHNS, 2004).

Quando a continuidade de um vaso sanguíneo é afetada, as plaquetas são submetidas a uma resposta em série, altamente regulada e funcional, que inclui: adesão, ativação, reação de liberação e agregação decorrente da exposição à superfície pró-coagulante. O objetivo é a rápida formação de um tampão hemostático, que obstrui o local do dano, prevenindo a perda de sangue (HARRISON, 2004). Essas reações bioquímicas fisiológicas são definidas como resposta hemostática primária (Figura 1). Os eventos iniciais são modulados pela exposição dos componentes dos vasos sanguíneos, como as microfibrilas, a membrana basal e o colágeno. Concomitantemente, ocorre a adesão plaquetária à matriz subendotelial e consequentemente a ativação plaquetária. A palavra "adesão" descreve a interação entre as plaquetas e qualquer outro tipo celular diferente, enquanto que "agregação" se refere exclusivamente à interação entre duas plaquetas (LOPEZ-FARRÉ, 2001).

Figura 1 – Etapas da hemostasia primária



Fonte: Adaptado de BRASS (2001).

A ativação plaquetária é, em geral, iniciada pela exposição a um agonista plaquetário que se liga aos receptores de superfície e engatilha uma cascata de eventos bioquímicos. A trombina, o colágeno, o ADP, a epinefrina e o tromboxano A₂ (TXA₂) são estímulos fisiológicos para a ativação plaquetária. Os eventos posteriores

têm elementos comuns e outros, que se diferenciam especialmente como resultado da estimulação de receptores específicos (MESA ; ALFONSO, 2000).

Quando ativadas, as plaquetas expressam rapidamente GP de superfície que interagem com outras plaquetas, endotélio vascular e células inflamatórias (LÖWENBERG et al., 2010). O ADP tem papel fundamental no processo de ativação, agindo sobre os receptores purinérgicos P2X1, P2Y1 e P2Y2, localizados na superfície das plaquetas, que agem sinergicamente na mudança da conformação, prolongando a ativação e tornando-a irreversível (GACHET, 2008).

O TXA₂ é produzido a partir do ácido araquidônico oriundo dos fosfolípidos localizados na membrana plaquetária, através da fosfolipase A₂ citoplasmática. O ácido araquidônico é metabolizado pela ciclo-oxigenase-1 (COX-1) para prostaglandina e TXA₂. Essa molécula atua sobre a ativação plaquetária, agindo sobre receptores de superfície específicos (PAPATHANASIOU, 2009).

Durante a mudança de forma das plaquetas, os grânulos contidos em seu citoplasma são centralizados e seus conteúdos são liberados no lúmen do sistema de canais abertos, e posteriormente são liberados para o exterior, em um processo chamado de reação de secreção (GRYGLEWISK, 2008). As plaquetas ativadas aumentam a secreção de substâncias biologicamente ativas, armazenadas ou recém-sintetizadas dentro dos seus grânulos (JENNINGS, 2009).

Os alfa-grânulos contêm a maioria dos fatores plaquetários envolvidos na hemostasia, incluindo grandes peptídeos, como a trombosponina, p-selectina, fator plaquetário 4 (PF4) e beta-tromboglobulina e fatores envolvidos na coagulação. Além disso, possuem moléculas de adesão que atuam na interação plaquetária com a parede vascular. A membrana dos alfa-grânulos contém glicoproteínas como a GPIb, GPVI, GPIIb/IIIa e P-selectina, que durante a ativação serão expressas sobre a membrana das plaquetas (MAYNARD et. al, 2007).

Os grânulos densos possuem elevada concentração de cálcio, fosfato, trifosfato de adenosina (ATP), ADP e serotonina. Também contém moléculas de adesão: GPIb, GPIIb/IIa e P-selectina. Durante a ativação plaquetária, as proteínas de membrana dos grânulos densos são incorporadas a membrana plasmática das plaquetas e o seu conteúdo é liberado para o meio extracelular. O ADP e o ATP contidos nos grânulos densos estão envolvidos primariamente no processo hemostático (CLEN et al., 2000).

A ativação plaquetária é um fator crítico para que ocorra a agregação das plaquetas, pois ADP, TXA₂ e fibras colágenas são mediadores potentes nesse processo. O TXA₂ promove agregação de plaquetas através da estimulação de proteínas-G acopladas aos receptores nas membranas das plaquetas. A ligação do TXA₂ aos seus receptores leva à ativação da fosfolipase C que induz a expressão do complexo-G responsável por mediar agregação plaquetária (ARMSTRONG; GOLAN, 2007). A liberação do ADP, ATP (em baixas concentrações) e do TXA₂, causa agregação adicional de plaquetas no local da lesão vascular. O ADP provoca engurgitamento das plaquetas e estimula a adesão entre as membranas das plaquetas adjacentes, ocorrendo ainda mais liberação de ADP e TXA₂. Esta retroalimentação positiva resulta na formação de massa de plaquetas suficientemente grande para ocluir a região da lesão vascular (LEON et al., 2004).

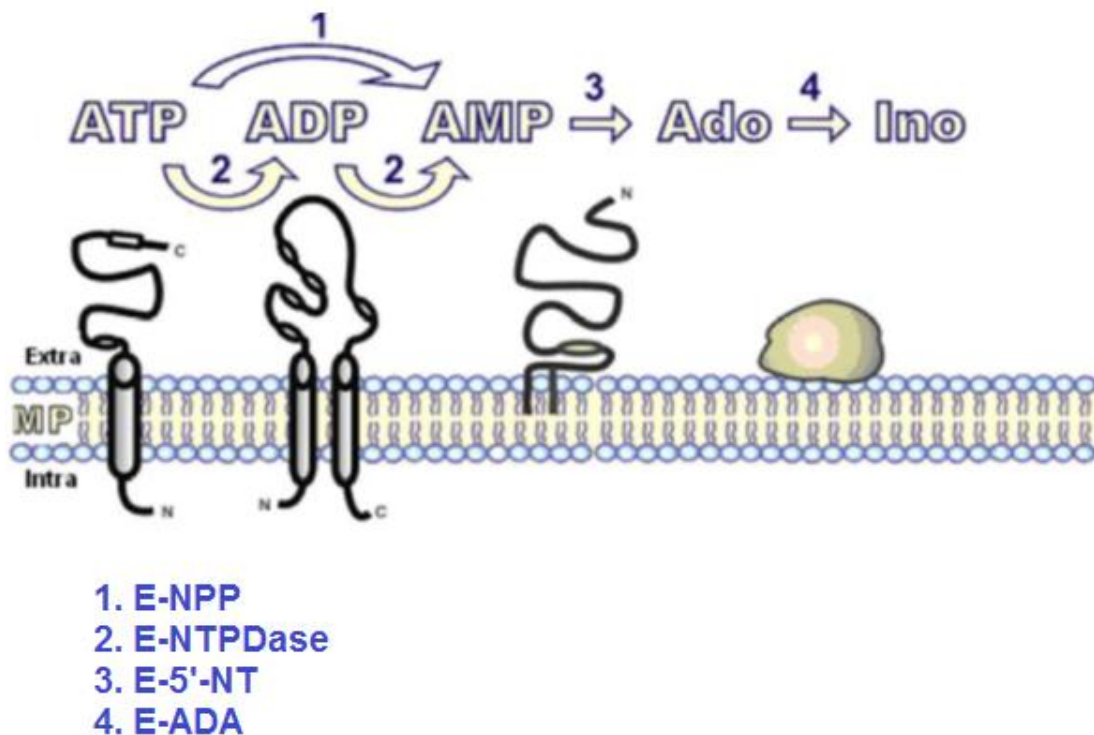
A sinalização purinérgica envolve três componentes essenciais: uma fonte de nucleotídeos de adenina, receptores específicos, através dos quais os nucleotídeos exercem seus efeitos, e as enzimas ectonucleotidases, responsáveis pelo controle dos níveis dessas moléculas no meio extracelular (ROBSON, et al., 2001).

Os nucleotídeos extracelulares de adenina ATP, ADP e adenosina monofosfato (AMP), e o nucleosídeo adenosina estão envolvidos em uma variedade de processos fisiopatológicos em diferentes células. O metabolismo extracelular destes nucleotídeos, gerando nucleosídeos, tem uma importante função regulatória no controle da homeostase, principalmente por regularem a agregação plaquetária, via receptores purinérgicos P2 (ZIMMERMANN, 1999; ATKINSON et al., 2006). Os nucleotídeos encontram-se presentes em altas concentrações no citoplasma celular, enquanto que no compartimento extracelular suas concentrações são mantidas na ordem de nanomolar (ATP 1-10 nM) (DI VIRGILIO, 2005). Concentrações aumentadas de nucleotídeos podem ser liberadas no meio extracelular em resposta a diferentes estímulos ou condições, tais como lise celular, hipóxia e inflamação (LAZAROSWSKI et al., 1997).

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

A concentração desses nucleotídeos extracelulares, e as respostas celulares a essas moléculas, devem ser reguladas após exercerem seus efeitos, com a finalidade de manter níveis fisiológicos. Isso é realizado por um complexo multienzimático chamado de “ectonucleotidases” (ZIMMERMANN, 2001). Essas enzimas incluem: as ecto-nucleosídeo-trifosfo-difosfohidrolases (E-NTPDases, CD39), as ecto-nucleotídeo-pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), as ecto-fosfatases alcalinas e a ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT, CD73) (ROBSON et al.,2006). Através de reações sucessivas, essas enzimas constituem uma cascata enzimática altamente eficiente, hábil em controlar a concentração e o tempo em que essas moléculas sinalizadoras permanecem no espaço extracelular, apresentado na Figura 2 (ZIMMERMANN, 2001).

Figura 2 – Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina



Fonte: Adaptado de YEGUTKIN (2008).

A E-NTPDase (nucleosídeo trifostato 5'-difosfohidrolase ou apirase; EC 3.6.1.5;CD39) hidrolisa o ATP e ADP, liberado pelas plaquetas ativadas. A remoção do ATP e ADP inibem o recrutamento de plaquetas, fazendo com que as mesmas

retornem ao seu estado inativado. No processo de hidrólise do ATP, ADP e AMP, a adenosina é liberada. A adenosina inibe a agregação plaquetária, expressão do fator tecidual ou moléculas de adesão. Inibe também a liberação de citocinas pelas células endoteliais ativadas (KAWASHINA et al., 2000; ARMSTRONG et al., 2006 b).

A hidrólise do ADP até adenosina, através das ectonucleotidases, estimula o processo de inibição da agregação plaquetária (ROBSON et al., 2006). Portanto, há uma consequente inibição da agregação plaquetária através dos receptores de adenosina (KAHNER et al., 2006). A adenosina extracelular e os derivados da adenina são moduladores do tônus vascular e da função plaquetária (COADE et al., 1989). Estas enzimas estão amplamente distribuídas nos tecidos animais e representam as principais ectonucleotidases expressas pelo endotélio e células musculares lisas do sistema circulatório (ZIMMERMANN et al., 1999; SCHETINGER et al., 2001).

Posteriormente, à hidrólise do ATP e ADP em AMP pela E-NTPDase1 tem-se a ação da E-5'-NT (EC 3.1.3.5; CD73), a qual, hidroliza o AMP em adenosina que é um modulador do tônus vascular e um inibidor da agregação plaquetária. Ambos E-NTPDase1 e E-5'-NT estão localizados na membrana plaquetária e desempenham um importante papel na regulação do fluxo sanguíneo e trombogênese (MARCUS et al., 2003; KAWASHIMA et al., 2000).

Existem sete tipos de E- 5'-NT humanas isoladas e caracterizadas. Estas enzimas variam de acordo com a sua localização celular, onde cinco destas enzimas estão localizadas no citosol. As funções da E-5'-NT correlacionam-se diretamente ao seu papel na produção de adenosina. Assim, de acordo com a sua localização tecidual, ela desempenha importantes funções como, por exemplo, no controle da agregação plaquetária, na regulação do tônus vascular e também na neuromodulação e neuroproteção no sistema nervoso (KAWASHIMA et al., 2000), uma na matriz mitocondrial e uma ancorada no exterior da membrana plasmática.

A adenosina desaminase (E-ADA, ADA; E.C. 3.5.4.4) é uma importante enzima desaminante, pertencente ao metabolismo purinérgico, que converte de forma irreversível adenosina em inosina. Essa enzima tem sido encontrada em uma grande variedade de tecidos de mamíferos, como intestino, timo, tecidos linfoides e não linfoides (CRISTALLI et al., 2001). Em humanos existe na forma de duas isoenzimas classificadas como: ADA1 e ADA2, cada uma com suas particulares propriedades bioquímicas (SHAROYAN et al., 2006).

A ADA1 está localizada principalmente no citosol, sendo encontrada em todas as células e tecidos humanos, apresentando alta atividade em linfócitos e monócitos. Tem sido demonstrado que quase toda atividade da ADA humana é atribuída a esta isoenzima (ZAVIALOV & ENGSTROM, 2005).

Diferentemente da ADA1, a ADA2 é encontrada predominantemente no soro de indivíduos normais (UNGERER et al., 1992). Esta isoenzima, representa a menor parte da atividade da ADA total em tecidos, sendo que a maioria das células humanas contém pequena quantidade de ADA2 (GAKIS, 1996).

A regulação da concentração da adenosina extracelular foi uma das primeiras funções fisiológicas atribuídas à ADA, logo após sua descoberta na membrana celular (FRANCO et al., 1997). Além do importante papel na regulação dos níveis extracelulares de adenosina, a ADA desempenha funções independentes de sua atividade enzimática (FRANCO et al., 1998). Estas funções extra-enzimáticas estão associadas à ligação da ADA a três diferentes moléculas da superfície celular incluindo a CD26 e receptores de adenosina A1 e A2b. Desta forma, foi proposto que a ADA atue como uma molécula co-estimulatória de receptores de adenosina (CIRUELA et al., 1996; HERRERA et al., 2001).

Estudos com as enzimas E-NTPDase, E-5'-NT e E-ADA demonstraram que essas enzimas estão envolvidas no mecanismo de tromboregulação de algumas patologias como Esclerose Múltipla (SPANEVÉLIO et al., 2010) e a doença de Chagas (SOUZA et al., 2012). O MM ainda é uma patologia incurável e na maioria dos casos o objetivo terapêutico visa controlar a doença, melhorar os sintomas e a qualidade de vida. Sendo assim, o presente estudo pretende analisar a atividade de enzimas do sistema purinérgico nas plaquetas do pacientes com MM tratados e não tratados e avaliar a ativação plaquetária nesses grupos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de enzimas do sistema purinérgico em plaquetas de pacientes com MM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a atividade da enzima E-NTPDase em plaquetas de pacientes com MM tratados e não tratados;
- Verificar a atividade da enzima E-5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com MM tratados e não tratados;
- Verificar a atividade da enzima E-ADA em plaquetas de pacientes com MM tratados e não tratados;
- Dosar as concentrações de PF4 e TXB₂, nas amostras de pacientes com MM tratados e não tratados.

3 MANUSCRITO

Atividade das Ectoenzimas e Proteínas Plaquetárias estão Alteradas em Pacientes com Mieloma Múltiplo.

Ectoenzymes Activities and Platelet Proteins are Altered in Multiple Myeloma Patients.

Sabrina F. de Andrade^{a*}, Pâmela de B. Soares^a, Livia G. Castilhos^b, Thiago Duarte^c, José A. M. de Carvalho^d, Stephen A. Adefegha^{b,e}, Marta M.M. F. Duarte^c, Daniela B. R. Leal^{a,b}, José E.P.da Silva^{a,d*}

Ectoenzymes Activities and Platelet Proteins are Altered in Multiple Myeloma Patients

Sabrina F. de Andrade^{a*}, Pâmela de B. Soares^a, Livia G. Castilhos^b, Thiago Duarte^c, José A. M. de Carvalho^d, Stephen A. Adefegha^{b,e}, Marta M. M. F. Duarte^c, Daniela B. R. Leal^{a,b}, José E.P.da Silva^{a,d*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil,

^c Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

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

^e Department of Biochemistry, Federal University of Technology , P.M.B. 704, Akure, Nigeria

* Corresponding authors at: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/CCS/ UFSM, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Prédio 26 – Sala 1357, Tel.: +55 55 32208940. E-mail addresses: binafarmacia@yahoo.com.br (S.F.Andrade), jepazdasilva@gmail.com (J.E.P da Silva).

Abstract

Multiple myeloma (MM) is an immunoproliferative disorder and one of its complications is thrombosis. Ecto-enzymes such as Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) and ecto-adenosine deaminase (E-ADA) can be found on platelets' surface. These enzymes are responsible for the regulation of extracellular levels of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and nucleoside (adenosine) in order to maintain normal hemostasis. The platelet activation process is accompanied by the secretion of platelet proteins such as platelet factor 4 (PF4) and thromboxane A₂ (TXA₂). This study aimed to investigate the activities of ecto-enzymes present on the platelet surface as well as the concentration of PF4 and TXB₂ (thromboxane B₂), a stable metabolite of TXA₂, in MM patients. Twenty-four patients with MM (eighteen treated and six untreated) and nineteen apparently healthy subjects (control group) were selected. Results revealed a decrease in ATP hydrolysis in the treated group by 57% and 41% in untreated patients when compared with control group. The E-ADA activity was significantly ($P < 0.001$) increased in treated MM group only compared to the control group. PF4 and TXB₂ were reduced in both treated and untreated MM group when compared with the control group. These results suggest a lower capacity aggregation and platelet activation showing mainly a platelet hyporeactivity in MM patients undergoing treatment. .

Keywords: Multiple myeloma; platelets; E-NTPDase; E-ADA; PF4; TXA₂

1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a neoplastic disorder associated with the proliferation of clonal plasma cells in bone marrow and characterized by the production of monoclonal proteins. It represents approximately 10% of all hematologic malignancies [1]. During the clinical course of MM, 15-30 % of patients may have hemorrhagic manifestations, which vary according to the type of MM (15% IgG and 30 % IgA) [2]. Several causes are reported to be responsible for these bleeding which can affect all the components of hemostasis. These include the vascular infiltration by malignant cells, thrombocytopenia, bone marrow infiltration and functional abnormalities of platelets [3].

Platelets are well known for their function as critical mediators of hemostasis including adhesion, aggregation and subsequent formation of a platelet thrombus [4]. Adenosine diphosphate (ADP) is the main promoter of platelet aggregation [5], whereas adenosine is a potent inhibitor of aggregation and an important modulator of vascular tone [6]. Moreover, studies have demonstrated that adenosine triphosphate (ATP) has a complex role in the regulation of platelet aggregation. High ATP concentrations inhibit aggregation induced by ADP, but low concentrations can contribute to enhanced collagen, thromboxane A₂ (TXA₂), and thrombin- induced aggregation [7].

A cascade of ecto-enzymes on surface of platelets plays crucial roles in controlling the extracellular concentration of these signaling molecules at physiological levels [8]. These enzymes are found on the surface of virtually all mammalian cell type and include ectonucleotidases from distinct families such as the E-NTPDase (EC 3.6.1.5, CD39), E-NPP (EC 3.1.4.1), and E-5'-NT (EC 3.1.3.4, CD73). These ectoenzymes are responsible for the hydrolysis of ATP, ADP and AMP as well as the formation of adenosine, which in turn, is converted into inosine by E-ADA (EC 3.5.4.4) [9]. Studies have shown that the ectoenzymes (E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA) are involved in the pathogenesis of various physiological and diseased conditions [10], such as Chagas disease [11] and multiple sclerosis [12]. Alterations in the activities of these enzymes in platelet have been observed in pathological conditions such as multiple sclerosis and Chagas disease. [10–11].

Platelet factor 4 (PF4) is a member of CXC chemokine family synthesized mostly by megakaryocytes and sequestered in α -granules of platelets. It is

recognized originally as an inhibitor of heparin-mediated reactions and is released during platelet aggregation. Data have demonstrated that PF4 shows both procoagulant and anticoagulant activities [13]. It also plays an important role in hemostasis/thrombosis, hematopoiesis, angiogenesis and immunoregulation [14]. The TXA₂ is formed from the hydrolysis of arachdonic acid after the platelets are exposed to activating agonists such ADP. The released TXA₂ acts as a positive feedback mediator in the activation and recruitment of more platelets to the primary hemostatic plug [15-16].

Considering the relevance of ectoenzymes and platelet proteins in the maintenance of primary hemostasis in platelets, this study sought to investigate the involvement of the purinergic system enzymes in thromboregulation and to evaluate platelet activation through the measurement of specific platelet protein, PF4 and the active metabolite of thromboxane, TXB₂ in patients with MM.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals

The substrates adenosine 5'-diphosphate disodium salt (ADP), adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), 5'-monophosphate sodium salt (AMP), thymidine 5' monophosphate p-nitrophenyl ester sodium salt (p-Nph-5'-TMP), adenosine , as well as bovine serum albumin, Trizma base, HEPES and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). K₂HPO₄ was purchased from Reagen and Tetrabutylammonium chloride from Merck (Darmstadt, Germany). All the other chemicals used in this experiment were of analytical grade and highest purity.

2.2 Patients and samples

Twenty-four patients diagnosed with MM and nineteen apparently healthy subjects, as a control group, were selected for this study at the Federal University of Santa Maria Hospital, Santa Maria, Brazil. Eighteen of the MM patients were currently receiving medications including bortezomib, cyclophosphamide, pamidronate and/or zoledronic acid based on physician's prescription for the treatment of MM, shown in Table 1, while six patients were not using drugs during this period. All subjects gave their consent to participate in the study and the Human Ethics Committee of the Health Science Center, Federal University of Santa Maria approved the protocol (24833313.5.0000.5346).

Table 1

Drugs used in the treatment of MM patients

Number of treated patients	Treatment (Drugs)
3	Zoledronic acid and Cyclophosphamide
6	Zoledronic acid
5	Bortezomib and Cyclophosphamide
1	Bortezomib
3	Pamidronate

2.3 Quantitative determination of platelets

Total blood was collected in tubes containing 7.2 mg dipotassium EDTA anticoagulant and the quantitative determination of platelets was performed by automated hematology analyser (SYSMEX XE-5000, Roche Diagnostic, USA).

2.4 Platelet preparation

PRP (platelet rich plasma) was prepared by the method described by Pilla et al. [17] and modified by Lunkes et al. [18]. Briefly, peripheral blood was collected in sample tubes containing sodium citrate 0.129 M and centrifuged at 160g for 15 min. Afterwards, the PRP was centrifuged at 1,400g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES isomolar buffer.

2.5 Separation of serum and blood plasma

The blood samples for serum separation were collected in sample tubes without anticoagulant and left at room temperature for 30 minutes before being centrifuged for 15 minutes at 1000 x *g*. The blood samples for plasma separation were collected into sample tubes containing 7.2 mg dipotassium EDTA as anticoagulant and centrifuged for 15 min at 1000 x *g*.

2.6 Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard [19].

2.7 E-NTPDase and E-5'-NT activity determination

The E-NTPDase enzymatic assay in platelets was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, at a final volume of 200 μL as described by Lunkes et al. [18]. For AMP hydrolysis, the E-5'-NT activity was carried out as previously described, except that the 5 mM CaCl_2 was replaced by 10 mM MgCl_2 . Twenty microliters of the isolated platelets (8-12 μg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubated for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1mM, and AMP at a final concentration of 2mM, and incubated for 60 min. Both enzyme assays were stopped by addition of 200 μL of 10% TCA to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by method of Chan et al. [20] using malachite green as colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after 10% TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.8 E-ADA activity determination

E-ADA activity from platelets was determined according to Giusti and Galanti [21] based on the direct measurement of the formation of ammonia produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Briefly, 50 μL of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine pH 6.5, and was incubated at 37°C for 60 min. Afterwards, the reaction was stopped by adding a solution of 106.2 nM phenol and 167.8 nM sodium nitropussiate and a hypochlorite solution. The amount of ammonia produced was measured at 620 nm and the results were expressed as U/L. One unit (1U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

2.9 Platelet factor 4 and thromboxane B₂ quantification

The serum levels of platelet factor 4 were determined using a commercial kit (Quantikine ® ELISA Human CXCL4/PF4 Immunoassay; R&D Systems) based on enzyme immunoassay technique. Quantitation of thromboxane formation was assessed by measuring the plasma levels of thromboxane B₂, a stable hydrolyzed product of unstable thromboxane A₂ (TXA₂). This was done by using a commercial kit (Thromboxane B₂ EIA Kit; Oxford Biomedical Research, Inc- USA). This test kit operates on the basis of competition between the enzyme conjugate and the TXB₂ in the sample for a limited number of binding sites on the antibody coated plate.

2.10 Statistical analysis

The data obtained were expressed as mean ± Standard Error of Mean (SEM). For statistical analysis, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with the Tukey *post hoc* test. The calculations and graphs were performed and plotted with the aid of GraphPad Prism 6 software. Differences were considered significant when the probability was $p < 0.05$.

3. Results

3.1 General characteristics of the patients

The results of platelet count, age and genre of individuals from different groups (untreated, treated and control) were shown in **Table 2**. There was no significant ($p > 0.05$) difference between the groups for all the parameters tested.

Table 2

Platelet parameters, age and gender of patients receiving treatment for multiple myeloma (treated MM), untreated patients (untreated MM) and control group. Results are expressed as mean \pm SEM.

	Control (n=19)	Untreated MM (n=6)	Treated MM (n=18)
Age (years)	55 \pm 3	59 \pm 6	62 \pm 2
Males (%)	47	33	72
Platelets ($\times 10^3 \mu\text{L}$)	233 \pm 17	160 \pm 51	186 \pm 22

3.2 ATP, ADP and AMP hydrolysis

The results of ATP hydrolysis by E-NTPDase in platelet are shown in Fig. 1A. Statistical analysis showed a decrease of 41% and 57% in the E-NTPDase activity by ATP hydrolysis in the untreated MM (6.7 ± 1.04 nmol Pi/min/mg of protein, $P < 0.05$) and treated MM (4.9 ± 0.77 nmol Pi/min/mg of protein, $P < 0.001$) groups, respectively, when compared to the control group (11.4 ± 1.08 nmol Pi/min/mg of protein). However, there was no significant ($P > 0.05$) difference in the E-NTPDase activity for hydrolysis of ADP (Fig.1B) between untreated MM patients (8.1 ± 1.01 nmol Pi/min/mg of protein), treated MM patients (5.8 ± 1.01 nmol Pi/min/mg of protein) and control group (6.3 ± 0.72 nmol Pi/min/mg of protein). The results obtained for the E-5'-NT activity are shown in figure 1C. In a similar manner, no significant ($P > 0.05$) difference was observed in the AMP hydrolysis among the three groups; control group (1.4 ± 0.24 nmol Pi/min/mg of protein), untreated MM patients group (2.5 ± 0.79 nmol Pi/min/mg of protein) and treated MM patient group (2.1 ± 0.37 nmol Pi/min/mg of protein).

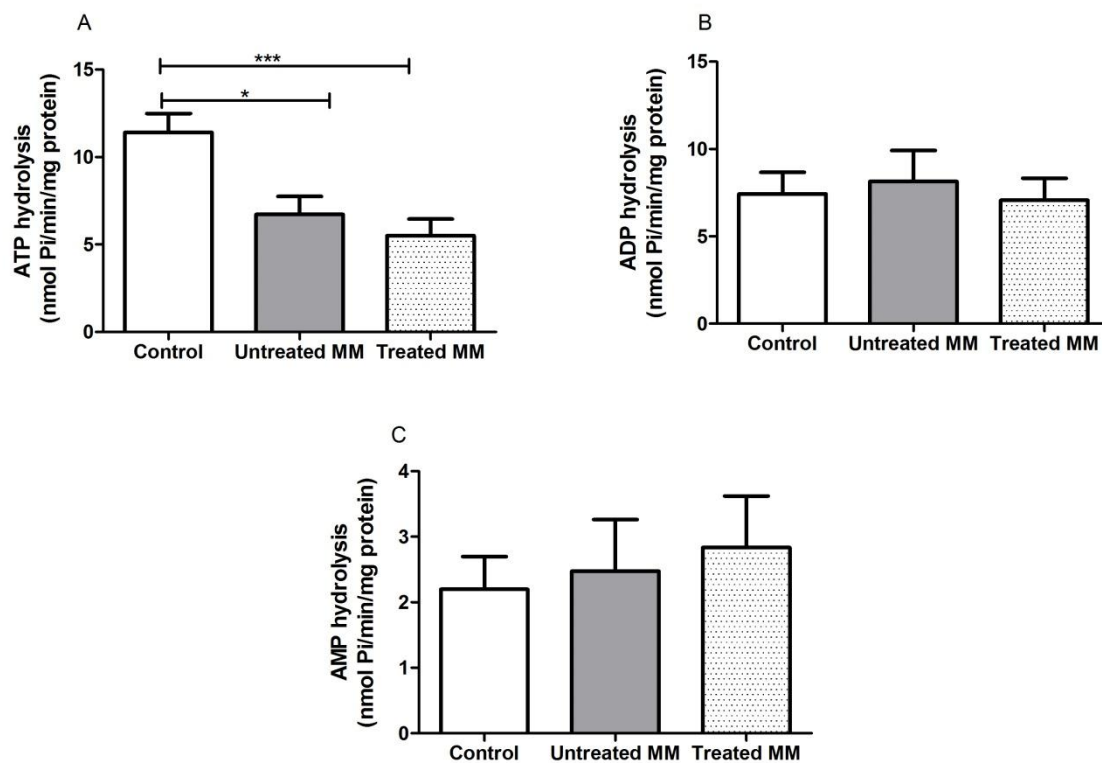


Figure 1. E-NTPDase activity in ATP (A), ADP (B) and E-5'-NT activity (C) in platelets of multiple myeloma (MM) treated (n = 18) and untreated (n = 6) patients and control group (n = 19). Bars represent means \pm SEM. The asterisk symbol represents statistical difference (*) $p < 0.05$ and (***) $p < 0.001$ between the MM groups and control group (ANOVA with the Tukey *post hoc* test).

3.3 E-ADA activity

E-ADA activity of platelets is shown in Fig. 2. Results showed an increase of 139% in E-ADA activity of treated MM groups (6.9 ± 1.0 U/L) when compared to untreated MM group (3.0 ± 0.6 U/L). Also, there was an increase of 146% in E-ADA activity of treated MM group when compared to the control group (2.8 ± 0.4 U/L). In addition, no significant difference was observed between the untreated MM and control groups.

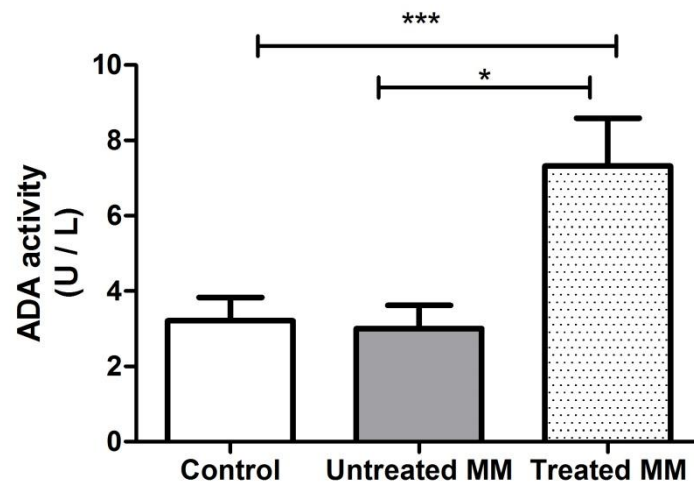


Figure 2. Ecto-Adenosine deaminase (E-ADA) activity in platelets of healthy volunteers (control, n = 19), untreated MM patients (untreated MM, n = 6) and patients receiving treatment (treated MM, n = 18) using adenosine as substrate, respectively. Bars represent means \pm SEM. The asterisk symbol represents statistical difference (*) $p < 0.05$ and (***) $p < 0.001$ between the MM groups and control group (ANOVA with the Tukey *post hoc* test).

3.3 Platelet factor 4 and thromboxane B₂ quantification

The results of the quantification of PF4 are shown in Fig. 3A. The treated MM group (38.5 ± 3.3 ng/mL) showed a decrease of 51% in serum levels of platelet factor 4 when compared with the control group (70.7 ± 2.8 , $P < 0.001$). Furthermore, there was a decrease of 28% in the level of serum PF4 in untreated group (50.60 ± 7.6 ng/mL) compared to the control group ($P < 0.05$).

The data for measurement of TXB₂ are shown in Figure 3B. The results showed a 42% reduction in plasma levels of TXB₂ treated group (51.0 ± 3.5 ng/mL; $P < 0.001$) compared to the control group (87.4 ± 2.2 ng/mL). However, the untreated group (66.1 ± 8.8 ng/mL) showed a reduction of 24% when compared to the control group ($P < 0.01$).

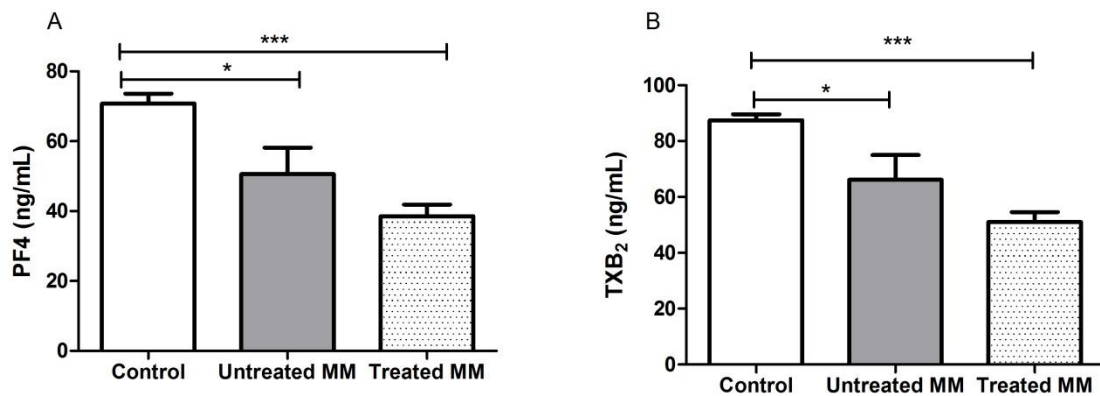


Figure 3. Serum PF4 (A) and plasmatic TXB₂ (B) in healthy volunteers (control, n = 19), untreated MM patients (untreated MM, n = 6) and patients receiving treatment (treated MM, n = 18). Bars represent means \pm SEM. The asterisk symbol represents statistical difference (*) $P < 0.05$, (**) $p < 0,01$ and (***) $P < 0.001$ between the MM groups and control group (ANOVA with the Tukey *post hoc* test).

4. Discussion

Platelet aggregation in the presence of low concentrations of ADP is a reversible process. However, at higher concentrations of ADP, irreversible secondary aggregation are produced and the contents of platelets storage granules are released into the bloodstream [22]. Enzymatic mechanism that hydrolyses ADP in the circulation are very important to limit platelet aggregation. Ectonucleotidases are key in this process by hydrolyzing extracellular nucleotides to adenosine [23]. In this study, we found a decrease in the E-NTPDase activity for the hydrolysis of ATP in treated/ untreated MM groups compared to control group, however no significant change was observed in this enzyme activity for hydrolysis of ADP. This indicates that the reduction in E-NTPDase activity for the hydrolysis of ATP may lead to the lowering of extracellular concentration of ADP peaked which could be at a lower potential for platelet aggregation in MM patients. The non-significant difference observed in E-NTPDase activity for the hydrolysis of ADP between the control, treated and untreated MM groups.

The results also showed a significant increase in ADA activity in patients who were receiving treatment for MM. This increase may be attributed to a physiological response to the increase in the extracellular concentration of adenosine in treated MM patients. However, the non-significant change in E-5'-NT observed between the groups may possibly be attributed to increased adenosine from routes other than NTPDase-ATP/ADP, showing that there may be excessive AMP in MM patients. Furthermore, the increased ADA activity in the treated MM patients could be related to medications used by patients.

Platelet activation may be assessed by increase in specific platelet proteins such as PF4 and thromboxane A2 metabolites [24]. In this study, PF4 and TXB₂ levels were significantly reduced in treated and untreated MM patient. Furthermore, our results demonstrated that there was no evidence of activation of platelets in these groups, since the increase in platelet activation would result in increased levels of these proteins.

A study by Karl et al., 2014 [25] compared the ability of platelet aggregation (using aggregometer) and activation (expression of p-selectin) in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), MM active and MM in *plateau*-phase post-treatment. The results showed that the active MM patients displayed platelet hyporeactivity, reduced aggregation and activation responses compared to both MGUS patients and MM patients post treatment. These results are in agreement with the findings in our study, in that we observed a lower potential for aggregation and platelet activation in MM patients, with greater significance in the group of treated MM patients.

In conclusion, the results revealed that the activities of ENTPDase and E-ADA are altered in platelets of MM patients, suggesting that purinergic signaling may be involved in thromboregulation of MM. The decreased E-NTPDase activity as well as the low levels of PF4 and TXB₂ in MM patients may be indication of reduced platelet reactivity in these patients. However, this platelet hyporeactivity is more pronounced in MM treated group and increased E-ADA in this group may reflect increased adenosine in these patients. Furthermore, the lower activation capacity and platelet aggregation may be related to the increased adenosine concentration which may have resulted from chemotherapies used by patients to treat this pathology.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgments

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE/UFSM) and Programa de Iniciação Científica (PROIC-HUSM), Brazil

References

- [1] A.Palumbo, K. Anderson, Multiple myeloma, *N Engl J Med.* 364 (2011) 1046-1060.
- [2] B. Barlogie, Plasma cell myeloma. In: Williams. Hematology. E.Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller, T.J. Kipps, eds. 5 ed, McGraw-Hill, New York, 1995, pp. 1.109-1.126.
- [3] C. Eby, M. Blinder, Hemostatic complications associated with paraproteinemias. *Curr Hematol Rep.* 2 (2003) 388-394.
- [4] H.K. Eltzschig, T. Eckle, Ischemia and reperfusion from mechanism to translation, *Nat. Med.* 17 (2011) 1391–1401.
- [5] O.O. Braun, S. Amisten, A. Wihlborg, K. Hunting, D. Nilsson, D. Erlinge, Residual platelet ADP reactivity after clopidogrel treatment is dependent on activation of both the unblocked P2Y1 and the P2Y12 receptor and is correlated with protein expression of P2Y12, *Purinergic Signal.* 3 (2007) 195–201.
- [6] M. Rozalski, M. Nocun, C. Watala, Adenosine diphosphate receptors on blood platelets potential new targets for antiplatelet therapy, *Acta Biochim. Pol.* 52 (2005) 411–415.
- [7] A.V. Birk, J. Broekman, E.M. Gladek, H.D. Robertson, J.H.F. Drosopoulos, A.J. Marcus, H. Szeto, Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity, *J. Lab. Clin. Med.* 140 (2002) 166–175.
- [8] B.N. Kahner, H. Shankar, S. Murugappan, G.L. Prasad, S.P. Kunapuli, Nucleotide receptor signaling in platelets, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 2317–2326.
- [9] H. Zimmermann, Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides, *Naunyn Schmiedeberg Arch oh Pharmacol.* 362 (2000) 299 - 309.
- [10] M.R. Schetinger, et al., NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health, *Biofactors* 31 (2) (2007) 77–98.
- [11] V.C.G Souza, et al., Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. *Purinergic Signal.* 8 (4) (2012) 753 – 762.
- [12] R.M. Spanevélio, et al., Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J. Neurol.* 257 (1) (2010) 24 – 30.

- [13] K. Pilatova, K. Greplova, R. Demlova, B. Bencsikova, G.L. Klement, L. Zdrzilova-Dubská, Role of platelet chemokines, PF-4 and CTAP-III, in cancer biology, *J. Hematol. Oncol.* (2013) 6 – 42.
- [14] J. Thachil, The prothrombotic potential of platelet factor 4, *Eur. J. Intern. Med.* 21 (2010) 79 – 83.
- [15] B. Samuelsson, M. Goldyne, E. Granstrom, M. Hamberg, S. Hammarstrom, C. Malmsten, Prostaglandins and thromboxanes, *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978) 997 – 1029.
- [16] S.M. Hourani, N.J.Cusack, Pharmacological receptors on blood platelets, *Pharmacol. Rev.* 43 (1991) 243 – 298.
- [17] C. Pilla, T. Emanuelli, S.S. Frassetto, A.M.O. Battastini, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets, *Platelets* 7 (1996) 225 – 230.
- [18] G. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V. Morsch, C. Mazzanti, M. Schetinger, Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb. Res.* 109 (2003) 189–194.
- [19] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [20] K.M. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–380.
- [21] G. Giusti, B. Galanti, Colorimetric method, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 315–323.
- [22] G.V.R. Born, Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, *Nature* 194 (1962) 927-9.
- [23] E.G. Trams, A proposal for the role of ecto-enzymes and adenylates in traumatic shock, *J. Theor. Biol.* 87 (1980) 609-21.
- [24] H.M. Rinder, E.L. Snyder, J.L. Bonan, P.A. Napychank, H. Malkus, B.R. Smith, Activation in stored platelet concentrates: correlation between membrane expression of p-selectin, glycoprotein IIb/IIIa, and b-thromboglobulin release, *Transfusion* 33 (1993) 25-9.
- [25] K. Egan, N. Cooke, E. Dunne, P. Murphy, J. Quinn, D. Kenny, Platelet hyporeactivity in active myeloma. *Thrombosis Research* 134 (2014) 747–749.

4 CONCLUSÕES

- A atividade da E-NTPDase sofreu alteração nos grupos de pacientes com MM tratados e não tratados, apenas para a hidrólise do ATP, sugerindo que há uma menor conversão de ATP em ADP. Sendo este fato uma das prováveis causas da redução da agregação plaquetária nos pacientes com essa patologia.
- O aumento da atividade da E-ADA nos pacientes com MM tratados, em relação aos demais grupos do estudo provavelmente está relacionado a uma resposta fisiológica ao aumento de adenosina nestes pacientes, indicando uma possível interferência do tratamento na produção desse nucleosídeo.
- Os níveis de PF4 e TXB₂ estavam diminuídos nos grupos de pacientes com MM tratados e não tratados evidenciando que não houve aumento na ativação plaquetária dos pacientes com MM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, X. C.; XYLE R.A.; DALTON W. S.; et al. Multiple Myeloma: new insights and therapeutic approaches. **Hematology. Am Soc Hematol Educ Program**, 147-65, 2000.
- ARMSTRONG, E. J. ; MORROW, D. A.; SABATINE, M. S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part I: introduction and cytokines. **Circulation**, v.113, p.72–75, 2006.
- ARMSTRONG, A.W.; GOLAN D.E. Pharmacology of Hemostasis and Thrombosis. In :___ GOLAN, D.E.; TASHJIAN, A.H.; ARMSTRONG, W.; ARMSTRONG, A.W. Principles of pharmacology, ed 3, Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p. 387-415.
- ATKINSON, B., et al., Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 36, p. 217-222, 2006.
- AVCU, F. et al., Effects of bortezomib on platelet aggregation and ATP release in human platelets, in vitro. **Thromb Res**, v. 121, p.567-751, 2008.
- BAITALLE, R.; HAROUSSEAU, J. L. Multiple Myeloma. **N Eng J Med**, v. 336, n. 23, p. 1657-1664, 1997.
- BARLOGIE, B. et al., Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. **Blood**, v. 93, p. 55-65, 1999.
- BIRK, A. V. et al., Role of a novel soluble nucleotide phosphohydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: Hemostasis, thrombosis, and vascular biology. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, p. 116–124, 2002.
- BRASS, S. Cardiovascular biology: small cells, big issues. **Nature**, v. 409, p. 145-147,2001.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, p. 1471-83, 2007.
- CARRIER, M. et al., Rates of venous thromboembolism in multiple myeloma patients undergoing immunomodulatory therapy with thalidomide or lenalidomide: a systematic review and meta-analysis. **J Thromb Haemost**, v 9, p. 653-663, 2011.
- CHOU, T. Multiple myeloma : recent progress in diagnosis and treatment. **Journal of clinical and experimental hematopathology**, v. 52, n. 3, p. 149-159, 2012.
- CIRUELA, F. et al., Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. **FEBS Letters**, v. 380, p. 219-223, 1996.

- CLEN, D. et al. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. **Blood**, v. 95, n. 3, p. 921-929, fev. 2000.
- COADE, S.B.; PEARSON, J.D. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. **Circulation Res**, v. 65, p. 531-537, 1989.
- DE CICCIO, M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. **Crit Rev Oncol. Hematol.**, v. 50, n. 3, p.187-196, 2004.
- DI VIRGILIO, F. et al., Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, p.587-600, 2001.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v.1, n. 3, p. 205-209, 2005.
- EBY C., BLINDER M. Hemostatic complications associated with paraproteinemias. **Curr Hematol Rep**, v. 2, p. 388-394, 2003.
- FRANCO, R. et al., Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme, **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 283-294, 1997.
- FRANCO, R. et al., Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunological Reviews**, v. 161, p. 27-42, 1998.
- GACHET, C. P₂ receptors, platelet function and pharmacological implications. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 466-472, 2008.
- GASIC, G.J. et al., Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. **Int J Cancer**, v. 11, n. 3, p. 704-718, 1973.
- GAKIS, C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. **The European Respiratory Journal**, v. 9, p. 623-624, 1996.
- GREIPP, P.R. et al., International staging system for multiple myeloma. **J Clin Oncol.**, v.23, n.15, p. 3412-3420, 2005.
- GRYGLEWSKI, R.J. Prostacyclin among prostanoids. **Pharmacological Reports**, v. 60, n. 1, p. 3-11, jan./fev. 2008.
- HAROUSSEAU, J.L. Moreau P. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 25, p. 2645-2654, jun. 2009.
- HERRERA, C. et al., Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 127-134, 2001.
- HARRISON, P. Measuring platelet function? **The Hematology Journal**, v. 5, p. 164-169, 2004.
- JAGANNATH, S., DURIE, B.G., WOLF, J.L. et al. Extended follow-up of a phase 2 trial of bortezomib alone and in combination with dexamethasone for the frontline treatment of multiple myeloma. **British Journal of Haematology**, 146, 619–626, 2009.

JENNINGS, L.K. Mechanisms of platelet activation need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. **Thrombosis Haemostasis**, v. 102, n. 2, p. 288-257, ago. 2009.

JOHNS, C.S. Platelet function testing. **Clinical Hemostasis Review**, v. 18, n. 4, p. 1-9, jul./ago. 2004.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v.11, n.3, p.201-212, 2011.

KAHNER, B.N. et al., Nucleotide receptor signaling in platelets. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 4, p. 2317-2326, 2006.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v. 96, n. 6, p. 2157-2162, set. 2000.

KYLE, R.A.;CHILD, J.A.; ANDERSON, K. et al. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. **Br J Haematol**, v.121 p. 749-757, 2003.

LAZAROWSKI, E.R. Homolya L, Boucher TK. Identification of an ecto-nucleoside diphosphokinase and its contribution to interconversion of P2 receptor agonists. **J Biol Chem.**, v. 272, n.33, p. 20402-20407, 1997.

LOPEZ-FARRÉ, A. et al., Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 305, p. 09-16, 2003.

LÖWENBERG, E. C.; MEIJERS, J. C. M.; LEVI, M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, n. 6, Jun. 2010.

MAIOLINO, A.; MAGALHÃES, R. J. P. O transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas no tratamento do Mieloma Múltiplo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.29, n.1, p.36-41, 2007.

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

MARCUS, A.J. et al., The endothelial cell ecto- ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 1351–1360, 1997.

MARCUS, A.J. Platelets: their role in hemostasis, trombooses and inflammation. In: Gallin, J.I. and Spiderman,R.editors. **Inflammation:Basic Principles and Clinical Correlates**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 77-95, 1999.

MARCUS, A.J. et al., Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 31, p. 234-246, 2005.

MESA, M.G.; ALFONSO, C.C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. **Rev Cub Angiol y Cir Vas** 1: 132-141, 2000.

MAYNARD, D.M. et al. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *Journal of Thrombosis Haemostasis*, v. 5, n. 9, p. 1945-1955, set. 2007.

OSTROWSKA, J.K. et al., Proteasome inhibitor prevents experimental arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats. **Thromb Haemost**, v. 92, p. 171-177, 2004.

PAPTHANASIOU, A.; GOUDEVENOS, J.; TSELEPIS, A.D. Aspirin resistance in cardiovascular disease: pathogenesis diagnosis and clinical impact. **Current Pharmaceutical designs**, v. 15, n. 10, p. 1085-1094, 2009.

POLASEK, J. Three modes of platelets degranulation? **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 35, n. 5, p. 408-409, jan. 2006.

PRANDONI, P. et al., Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3484-3488, 2002.

RAJKUMAR, S.V. MGUS and smoldering multiple myeloma: Update on pathogenesis, natural history, and management. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** , p. 340-5, 2005.

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

REEDER, C.B. et al., Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial. **Leukemia**, v.23, p.1337–1341, 2009.

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

RUPA-MATYSEK,J.; GIL,L.; KOMARNICKI,M. Thrombotic complications following the treatment of multiple myeloma with new agents. **Pol Merkur Lekarski**, v. 31, p. 372-377,2011.

SAN MIGUEL, J.F. et al., Trial.Investigators. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. **New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 906–917, 2008.

SALLES, I.I. et al., Inherited traits affecting platelet function. **Blood review**, v. 22, p. 155-172, 2008.

SCHETINGER, M.R.C. et al., ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative iochemistry and Physiology**, v. 128. p. 731-741, 2001.

SHAROYAN, S. et al., Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochimica Polonica**, v.53, p. 539- 546, 2006.

SMITH, A.; WISLOFF, F.; SAMSON, D. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. **Br J Haematol** , v. 132, p. 410-451, 2005.

SUN,N.C. et al., Hemostatic abnormalities in malignancy, a prospective study of one hundred eight patients. Part I. Coagulation studies. **Am J Clin Pathol.**, v. 71, n. 1, p. 10-16, 1979.

TIMP, J.F. et al., Epidemiology of cancer associated venous thrombosis. **Blood**, v. 122, p. 1712-1723, 2013.

UNGERER, J.P.J.et al., Serum adenosine deaminase: isoenzyme and diagnostic application. **Clinical Chemistry**, v. 38, p. 1322-1326, 1992.

VARON,D.; BRILL, A. Platelets cross-talk with tumor cells. **Haemostasis**, v. 31, Suppl 1, p. 164-6, 2001.

WHITE, J. G. ; CLAWSON, C. C. The surface-connected canalicular system of blood platelets- a fenestrated membrane system. **The American Journal of Pathology**, v. 101, n. 2, p. 353-364, nov. 1980.

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

ZANGARI, M. et al., Hemostatic effects of bortezomib treatment in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. **Haematologica**, v. 93, p. 953-954, 2008.

ZANGARI, M. et al., Low venous thromboembolic risk with bortezomib in multiple myeloma and potential protective effect with thalidomide/ lenalidomide-based therapy: review of data from phase 3 trials and studies of novel combination regimens. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 11, p. 228-236, 2011.

ZAVIALOV, A.V; ENGSTROM, A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **The Biochemical Journal**, v. 391, p. 51-57, 2005.

ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: Principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. **Nature America Inc**, v. 9, p. 987-988, 1999.

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

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA COM SERES HUMANOS

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À APOPTOSE, RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS, SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA, METILAÇÃO DE DNA E ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA NO MIELOMA MÚLTIPLO.

Pesquisador: José Edson Paz da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 24833313.5.0000.5346

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 494.114

Data da Relatoria: 10/12/2013

Apresentação do Projeto:

O estudo constará da análise de amostras coletadas de aproximadamente 40 pacientes recém-diagnosticados para mieloma múltiplo (MM) e que ainda não tenham recebido tratamento. Os mesmos serão avaliados após 3, 6, 12 meses do início do tratamento, e o mesmo período após transplante de medula óssea, quando ocorrer. As amostras biológicas da medula óssea e do sangue periférico a serem utilizadas, farão parte das alíquotas coletadas para os exames de rotina para diagnóstico e acompanhamento do tratamento de MM. O presente estudo pretende avaliar quantitativamente a expressão de proteínas associadas à apoptose (bcl-2, bax) e à resistência a múltiplas drogas MDR (Pgp, MRP) na população de linfócitos B; dosar citocinas Th1/Th2; quantificar a expressão das ectoenzimas CD39 e CD73, e receptor P2X7 em linfócitos B; quantificar nucleotídeos e nucleosídeo de adenina; avaliar a presença de metilação nos genes CDKN2B, CDH1, ESR1, HIC1, CCND2, DCC e TGFHR2 envolvidos na regulação de diversas vias celulares de linfócitos B; avaliar o perfil de agregação plaquetária induzida pela quimioterapia; avaliar o

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-000
UF: RS Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-0382

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título do projeto: "EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À APOPTOSE, RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS, SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA, METILAÇÃO DE DNA E ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA NO MIELOMA MÚLTIPLA." Pesquisador responsável: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva Instituição/Departamento : Departamento de Análises Clínicas – UFSM Telefone para contato : (55) 3220-8503 ou (55) 9942-9494

Local de coleta de dados : _____ Nome da paciente: _____ Idade: ____ anos

Responsável legal: _____

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

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa e a responder um questionário, de forma voluntária, tendo o direito de desistir a qualquer momento. Objetivo: a pesquisa avaliará a atividade de algumas substâncias que compõem o sangue de pacientes com Mieloma múltiplo e de pessoas sem qualquer outra doença, para melhor entendermos sobre a patologia e assim obtermos informações capazes de futuramente auxiliar no controle e novos tratamentos, já que no momento não temos cura para esta doença. Procedimento e riscos: a pesquisa consistirá na coleta de sangue podendo ocorrer o risco de um pequeno desconforto devido à picada da agulha, e do local da coleta ficar dolorido ou arroxado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde. Benefícios: os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante e consiste apenas para ajudar em novos estudos sobre a evolução, controle e tratamento do mieloma múltiplo. Confidencialidade: as informações fornecidas no questionário serão de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Em nenhum momento será revelado ou utilizado seu nome.

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

Santa Maria, dede

Assinatura do sujeito de pesquisa ou representante legal

Nº. identidade

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

Santa Maria, de de

Assinatura do responsável pelo estudo

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

José Edson Paz da Silva (55)3220-8503, Sabrina Fontana de Andrade (55) 9942-9494