

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

**AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS
ECTONUCLEOTIDASES E DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM E SEM
ELEVAÇÃO DO SEGMENTO ST NO
ELETROCARDIOGRAMA**

TESE DE DOUTORADO

Marinês Calegari Lavall

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS
ECTONUCLEOTIDASES E DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM E SEM
ELEVAÇÃO DO SEGMENTO ST NO
ELETROCARDIOGRAMA**

Marinês Calegari Lavall

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina Schetinger
Co-Orientador: Prof^a Dr^a. Margarete Dulce Bagatini

Santa Maria, RS, Brasil
2013

**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 Tese de Doutorado**

**AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS ECTONUCLEOTIDASES E DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM E SEM ELEVAÇÃO
DO SEGMENTO ST NO ELETROCARDIOGRAMA**

elaborada por
Marinês Calegari Lavall

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dr^a.
(Presidente/Orientador)

Daiana Silva de Ávila, Dr^a.(UNIPAMPA)

Ricardo Brandão, Dr. (UFSM)

Roselei Fachineto, Dr^a (UFSM)

Vânia Lúcia Loro, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 30 de janeiro de 2013.

DEDICATÓRIA

A Deus.
Pela sua infinita bondade,
por todas as oportunidades de crescimento, que me deste!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, me concedendo saúde, paz, compreensão e oportunidades de experiências para o meu aprendizado profissional e pessoal.

A meus pais pela minha vida e pelo apoio nos momentos de necessidade.

Aos meus filhos pela compreensão, carinho, permitindo o meu trabalho.

Eu agradeço, a todas as pessoas, que de alguma forma me ajudaram para a realização deste trabalho, contribuindo para o meu amadurecimento profissional e acadêmico, e a todos os meus colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM.

Agradeço também as minhas orientadoras Dr^a. Maria Rosa Chitolina e Dr^a Margarete Dulce Bagatini, pela acolhida, pela amizade, disponibilidade e pela atenção dispensada, durante o desenvolvimento do meu trabalho. Paciência e tolerância são elementos insubstituíveis para estimular uma pessoa a crescer.

Aos colegas do laboratório de pesquisa da bioquímica, pelo apoio técnico e amizade.

Aos amigos que de alguma forma me ajudaram a não desistir de conquistar meus objetivos e sonhos.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

Os frágeis punem, excluem e discriminam, mas
as pessoas sábias promovem o ser humano.

(Augusto Cury)

RESUMO

Tese de Doutorado

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

AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS ECTONUCLEOTIDASES E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM E SEM ELEVAÇÃO DO SEGMENTO ST NO ELETROCARDIOGRAMA

AUTORA: MARINÊS CALEGARI LAVALL

ORIENTADORA: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

CO-ORIENTADORA: MARGARETE DULCE BAGATINI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de janeiro de 2013.

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. No IAM ocorre um bloqueio das artérias coronárias que pode ser total com elevação da supra ST (STEMI) ou parcial sem elevação da supra ST (NSTEMI), dependendo do tamanho do trombo. Esse trombo interrompe o fluxo sanguíneo com consequente falta de oxigênio para o miocárdio e ocorre um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que provocam lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares alterando o funcionamento de órgãos vitais. Também, nesse processo são liberados nucleotídeos de adenina ATP e ADP, que são hidrolisados pelas enzimas ectonucleotidases e regulam a formação do trombo. Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade das enzimas ectonucleotidases em plaquetas de pacientes STEMI e NSTEMI e em controles, bem como verificar o perfil oxidativo através de marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes. As amostras de sangue foram coletadas de 100 pacientes com IAM, atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Esses pacientes foram divididos em dois grupos caracterizados pelo eletrocardiograma: STEMI e NSTEMI. O grupo controle foi constituído de 74 indivíduos saudáveis. Os resultados demonstraram que pacientes STEMI apresentam maior atividade das enzimas ectonucleotidases e atividade da adenosina desaminase (ADA), bem como maiores níveis de troponina quando comparados com os pacientes NSTEMI. Em relação ao perfil oxidativo, foi observado um aumento na proteína carbonil, ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de albumina modificada pela isquemia (IMA) em pacientes STEMI. Sendo que o mesmo ocorreu para as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). No entanto, os níveis de vitamina C foram menores nos pacientes STEMI quando comparados com o grupo controle e pacientes NSTEMI, sugerindo menor proteção para estes pacientes ou esgotamento após cumprir sua função de defesa contra EROS. Nos pacientes NSTEMI a análise estatística dos marcadores de estresse oxidativo revelou um aumento dos níveis de IMA, tanto quanto em TBARS e SOD, quando comparados com o grupo controle. De acordo com os resultados encontrados sugerimos que as análises das atividades das ectonucleotidases poderiam ser utilizadas como um novo marcador para diferenciar pacientes STEMI dos pacientes NSTEMI e que os marcadores de estresse oxidativo (IMA, proteína carbonil e TBARS) e as defesas enzimáticas (CAT e SOD) não diferenciam a condição STEMI de NSTEMI.

Palavras chave: infarto agudo do miocárdio, NSTEMI, STEMI, nucleotídeos de adenina, nucleosídeo de adenosina, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Biologic Sciences Graduate Program: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF ECTONUCLEOTIDASE ENZYMES AND OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH AND WITHOUT LIFTING OF SEGMENT ST IN THE ELETROCARDIOGRAM

AUTHOR: MARINÊS CALEGARI LAVALL

ADVISER: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

CO- ADVISER: MARGARETE DULCE BAGATINI

Date and Place of Presentation: Santa Maria, January 30th 2013.

Acute myocardial infarction (AMI) is one of the major public health problems worldwide. A blockage of the coronary arteries occurs in AMI, which that may be total with ST segment elevation (STEMI) or partial with no ST segment elevation (NSTEMI) depending on the size of the thrombus. This thrombus blocks the blood flow and consequent there is a lack of oxygen to the myocardium increasing the formation of reactive oxygen species (ROS) which cause oxidative damage to macromolecules and various cellular structures changing the functioning of vital organs. Also, in this process we see the release of adenine nucleotides ATP and ADP, which are hydrolyzed by ectonucleotidase enzymes and regulate the thrombus formation. In this context, this study aimed to evaluate the activity of ectonucleotidase enzymes in platelets of STEMI and NSTEMI patients and controls as well as to check the oxidative profile through markers of oxidative stress and antioxidant defenses. Blood samples were collected from 100 patients with AMI treated at the University Hospital of Santa Maria (HUSM). These patients were divided into two groups characterized by electrocardiogram: STEMI and NSTEMI. The control group consisted of 74 healthy subjects. Results demonstrated that STEMI patients had higher activity of ectonucleotidase enzymes and adenosine deaminase (ADA) as well as higher troponin levels when compared with NSTEMI patients. Regarding the oxidative profile, we observed an increase in protein carbonyl, thiobarbituric acid (TBARS) levels and ischemia modified albumin (IMA) in STEMI patients. The same occurred in the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). However, the levels of vitamin C were lower in STEMI patients compared with the control group and NSTEMI patients, suggesting less protection for these patients or exhaustion after fulfilling the defense function against ROS. In the NSTEMI patients, the statistical analysis of oxidative stress markers revealed increased levels of IMA as well as SOD and TBARS compared to the control group. According to our results we suggest that the analysis of the ectonucleotidase activities could be used as a new marker for differentiating STEMI and NSTEMI patients. Moreover, the markers of oxidative stress (IMA, protein carbonyl and TBARS) and enzymatic defenses (CAT and SOD) do not distinguish the condition of STEMI NSTEMI.

Keywords: acute myocardial infarction, NSTEMI, STEMI, adenine nucleotide, nucleoside adenosine, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1 - | Isquemia do Miocárdio..... | 12 |
| Figura 2 - | Eletrocardiograma representando elevação do segmento ST no IAM..... | 13 |
| .. | | |
| MANUSCRITO | | |
| 1 | | |
| Figure 1 - | ATP hydrolysis in platelets from Acute Myocardial Infarction (AMI) patients with STEMI and NSTEMI conditions | 35 |
| Figure 2 - | ADP hydrolysis in platelets from Acute Myocardial Infarction (AMI) patients with STEMI and NSTEMI conditions | 35 |
| Figure 3 - | AMP hydrolysis in platelets from Acute Myocardial Infarction (AMI) patients with STEMI and NSTEMI conditions | 36 |
| Figure 4 - | Mean serum and platelet ADA levels estimated in AMI patients with STEMI and NSTEMI conditions | 36 |

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Table 1 – Baseline characteristics in AMI patients according to the type of AMI

.....

33

...

MANUSCRITO 2

Table 1 – Oxidative profile in STEMI and NSTEMI conditions and in healthy individuals.

.....

43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|--|
| ACB | Teste da Albumina ligada ao Cobalto |
| ADA | Adenosina Desaminase |
| ADP | Adenosina Difosfato |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| Ca | Cálcio |
| CD39 | NTPDase (Ecto-Apirase) |
| CD73 | 5'-Nucleotidase |
| CAT | Catalase |
| CT | Colesterol Total |
| cTnT | Troponina T |
| cTnI | Troponina I |
| DATASUS | Dados do Sistema Único de Saúde |
| DM | Diabetes Mellitus |
| DAC | Doença Arterial Coronariana |
| DT | Dor torácica |
| Ecto 5'NT | Ecto-5'-Nucleotidase |
| ENPPs | Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase |
| ECG | Eletrocardiograma |
| EDTA | Etilenodiaminotetracético |
| EROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| ERNS | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| FDA | Food and Drug Administration |
| IAM | Infarto Agudo do Miocárdio |
| IMA | Albumina Modificada pela Isquemia |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| MS | Ministério da Saúde |
| NSTEMI | Infarto agudo do miocárdio sem elevação do segmento ST |
| STEMI | Infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST |
| NTPDase | Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase |
| PRP | Plasma Rico em plaquetas |
| SCA | Síndrome Coronariana Aguda |
| SH | Grupos Sulfidrila |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| TBARS | Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido Tricloro Acético |
| TVP | Trombose Venosa Profunda |
| TG | Triglicerídeos |
| VIT C | Vitamina C |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 Objetivo geral | 21 |
| 2.2 Objetivos específicos | 21 |
| 3 MANUSCRITOS | 22 |
| 3.1 Manuscrito1- Extracellular hydrolysis of adenine nucleotides and nucleoside adenosine is higher in patients with ST elevation than non-ST elevation in acute myocardial infarction..... | 24 |
| 3.1.1 Abstract..... | 25 |
| 3.1.2 Introduction..... | 26 |
| 3.1.3 Material and methods..... | 27 |
| 3.1.4 Results..... | 28 |
| 3.1.5 Discussion..... | 28 |
| 3.1.6 References..... | 30 |
| 3.2 Manuscrito 2 - Oxidative profile of patients with ST segment elevation | 38 |
| 3.2.1 Abstract..... | 39 |
| 3.2.2 Introduction..... | 40 |
| 3.2.3 Materials and methods | 40 |
| 3.2.4 Results..... | 41 |
| 3.2.5 Discussion..... | 41 |
| 3.2.6 References..... | 41 |
| 4 DISCUSSÃO..... | 44 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 47 |
| 6 REFERÊNCIAS..... | 48 |

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS) demonstram altas taxas de mortalidade em pacientes que internam com infarto agudo do miocárdio (IAM). Das mortes ocorridas no Brasil no ano de 2010, 30% são decorrentes do aparelho circulatório (MS/SUS, 2012).

O IAM ocorre quando o fluxo sanguíneo coronariano diminui abruptamente, após a oclusão trombótica de uma artéria coronária previamente estreitada por aterosclerose (ANTMAN, 2002). A ruptura da placa aterosclerótica é a causa mais comum do IAM (HANSSON, 2005). O trombo formado interrompe o fluxo sanguíneo, desse modo ocorre desequilíbrio entre o fornecimento e a demanda de oxigênio. Se esse desequilíbrio for grave e persistente pode haver necrose celular irreversível do tecido miocárdico, como consequência da isquemia prolongada, representada na figura 1 (HARRISON, 2006).

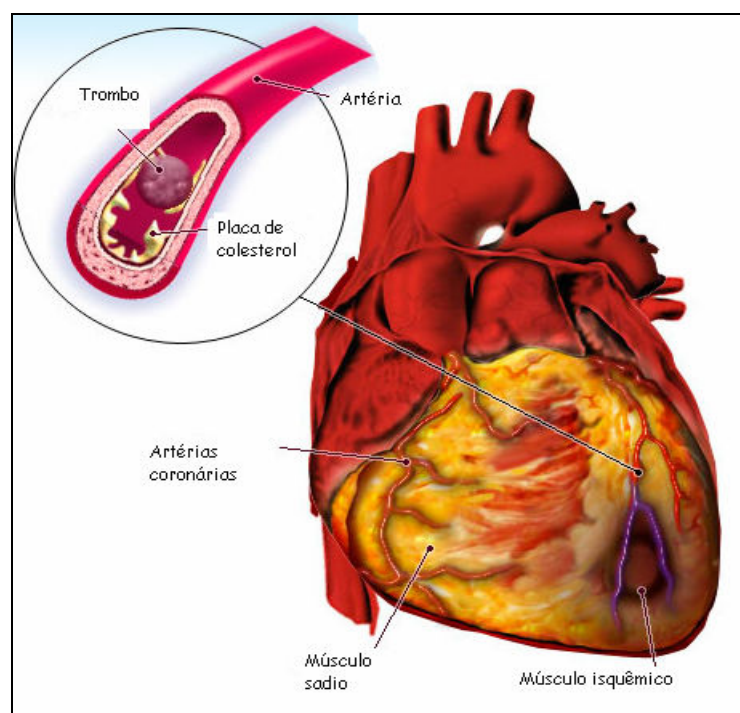


Figura 1 – Isquemia do miocárdio – <http://mvsdanatomy.wikispaces.com/Myocardial+Infarction>

O quadro clínico isquêmico poderá ter maiores ou menores consequências, dependendo da artéria ocluída, da intensidade da isquemia, do tempo de evolução do quadro isquêmico e da presença de circulação colateral (ROSS, 1993). A artéria coronária acometida torna-se ocluída por um trombo, contendo agregados plaquetários e filamentos de fibrina, que pode ocluir parcialmente ou totalmente a artéria (ZAGO, 2001). Ataques cardíacos são

divididos em dois tipos, STEMI (com elevação da supra ST) e NSTEMI (sem elevação da supra ST) de acordo com a sua gravidade. O STEMI é o tipo mais grave. Esse evento pode ser identificado por meio do eletrocardiograma (ECG) (Figura 2) onde as células isquêmicas e necróticas são incapazes de ter atividade elétrica normal, resultando em diversas mudanças no ECG (predominantemente anomalias ST). A elevação do segmento ST (IAM-STEMI) >1 mm em duas derivações contíguas determina o diagnóstico e correlaciona-se com a topografia do infarto (NICOLAU, 2001; VAN DE WERF F, 2003).

O diagnóstico de IAM é feito com base no quadro clínico, nas alterações eletrocardiográficas e na elevação dos marcadores bioquímicos de necrose troponinas I e T, creatinoquinase (CK), creatinoquinase isoenzima MB (CK-MB). O ECG é o principal instrumento diagnóstico e determinante da conduta. Os eletrocardiogramas seriados podem mostrar alterações persistentes no ECG (infradesnível do segmento ST, inversão da onda T) e confirmar o infarto. Sem esses, o diagnóstico é incerto (LEGATTI, 2012).

Para o tratamento do IAM são utilizados agentes antiplaquetários que inibem ativação da glicoproteína IIb/IIIa pelo ADP (PIEGAS, 2004).

Como o IAM-STEMI é uma das formas de Síndrome Coronariana Aguda (SCA) mais grave no qual a terapia de reperfusão deve ser instituída o mais rápido possível, essa diferenciação é fundamental para o tratamento imediato da SCA-STEMI (MONTALESCOT, 2007). Nas SCA sem elevação do segmento ST (IAM-NSTEMI), o trombo oclui parcialmente a artéria, sem levar a oclusão total e como resultado, apenas uma porção do músculo do coração a ser guarnecido pela artéria afetada fica necrosado, chamada de angina instável ou IAM sem supra ST (MS, 2012) (Figura 2).

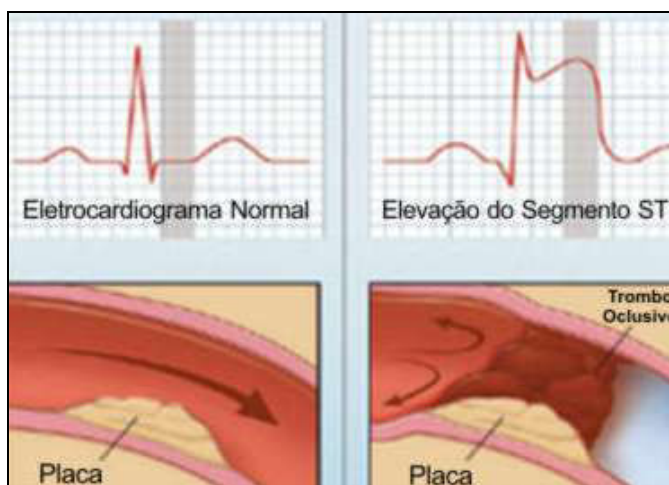


Figura 2- Eletrocardiograma representando elevação do segmento ST no IAM (Reproduzido com permissão de KEELEY e HILLIS, 2007, adaptado de Massachusetts Medical Society)

As estenoses de alto grau das artérias coronárias que progridem lentamente não costumam desencadear o infarto, graças ao desenvolvimento de uma extensa rede sanguínea colateral ao longo do tempo (ANTMAN, 2002). Em vez disso, o infarto ocorre quando o trombo arterial coronariano se desenvolve rapidamente no local da lesão vascular (HARRISON et al., 2006). A partir do dano vascular ocorre a expressão de moléculas que mediarão o processo inflamatório, e finalmente a formação da placa aterosclerótica (ROSS, 1999).

Além disso, a lesão vascular pode ser produzida ou facilitada por fatores de risco modificáveis como o tabagismo (LIBBY et al., 2010), a hipertensão e o acúmulo de lipídeos e também por fatores de risco não modificáveis como a hereditariedade, o gênero e a idade avançada (POLANCZYK, 2005; HERRMANN et al., 2006). Os fatores de risco para o IAM, no Brasil, se mostraram com um padrão de distribuição convencional (fumo, diabetes e obesidade central), com diferentes graus de associação (PIEGAS et al., 2003).

A composição do trombo pode variar em diferentes níveis, com presença de plaquetas, fibrina, eritrócitos e leucócitos. Os trombos iniciais, em geral, são pequenos, não oclusivos e são compostos quase que exclusivamente de plaquetas (ANTMAN, 2002). As plaquetas são pequenos fragmentos celulares anucleares que circulam numerosamente no sangue, com vida média de 10 dias (KRIZ et al., 2009). Possuem formato discóide e são produzidas a partir dos megacariócitos na medula óssea. Apresentam-se heterogêneas sob aspectos morfológicos como tamanho e densidade (AUSTIN, 2008). A membrana da plaqueta é rica em glicoproteínas, que servem como alvos para as reações de adesão, ou como receptores, desencadeando a ativação plaquetária (HEEMSKERK, 2005; YIP, 2005).

Na estrutura das plaquetas se distinguem três zonas: zona externa ou periférica que condiciona a propriedade de adesão, onde se encontram 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. Uma zona citosólica, portadora de microtúbulos e microfilamentos, responsável pelo esqueleto da plaqueta. Uma zona de organelas contendo corpúsculos densos de cálcio, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (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, após indução, são rapidamente envolvidas na resposta a lesão vascular.

Imediatamente após a injúria, as plaquetas interagem com os componentes da matriz extracelular da parede do vaso sanguíneo lesado e desse modo elas são responsáveis pela hemostasia primária. Esse processo interrompe o sangramento decorrente da injúria vascular através da formação de um tampão plaquetário. As três etapas principais da função plaquetária são: a adesão, a ativação e a agregação (VANNI, 2007).

A resposta do organismo à lesão vascular envolve dois processos interligados: a agregação plaquetária e a cascata da coagulação, que é ativada pela exposição do fator tecidual nas células endoteliais lesadas no local de ruptura da placa (ZAGO, 2001). Os fatores VII e X são ativados levando à conversão de protrombina em trombina, que então converte fibrinogênio em fibrina. A trombina participa de uma reação de auto amplificação que posteriormente ativa a cascata de coagulação (ZAGO, 2001).

Durante a circulação sanguínea, as plaquetas são reativas a vários estímulos e liberam substâncias ativas como o ADP e o ATP, que desempenham importante função na modulação de uma variedade de processos ligados à inflamação vascular, a trombose e a aterosclerose (ROSS, 1986; ALTMAN et al., 1995; ROBSON, 2004). É bem conhecido que concentrações micromolares de ADP são suficientes para induzir a agregação plaquetária e a ativação da cascata de coagulação, as quais levam à formação do trombo. Estes nucleotídeos tendem a acumular-se em fluídos do tecido e plasma, como consequência de uma resposta celular às citocinas pró-inflamatórias e como resposta ao dano tecidual e a morte celular (LUTHJE, 1989).

Nesse processo estão envolvidas as ectonucleotidases, que são ectoenzimas Ca^{2+} ou Mg^{2+} dependentes capazes de hidrolisar os nucleosídeos 5'-trifosfatos e 5'-difosfato (ZIMMERMANN, 1999 e YEGUTKIN, 2008). Dentre essas enzimas destacam-se as NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase), a família das E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase), Ecto-5'-Nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, Ecto-5'-NT, CD73) e a Adenosina Desaminase (ADA) (ROBSON et al., 2004; YEGUTKIN, 2008).

As NTPDases e a 5'-Nucleotidase estão amplamente distribuídas em células animais e vegetais, exercendo várias funções de acordo com sua localização tecidual e interação de seus produtos de hidrólise com os receptores específicos (KAWASHIMA et al., 2000).

A expressão e a atividade da NTPDase diminui a proliferação celular da musculatura esquelética lisa, prevenindo a estenose associada a angioplastia e outras doenças vasculares oclusivas, e é regulada pela sinalização por adenosina (KOSIAK et al., 2008).

As NTPDases são de uma classe de enzimas que inclui oito membros nomeados de

NTPDase 1-8 que se diferenciam de acordo com a especificidade por substratos, distribuição tecidual e localização na célula. A NTPDase 1 (CD39, EC 3.6.1.5) é uma enzima glicosilada ligada à membrana de plaquetas, que hidrolisa ATP e ADP para adenosina monofosfato (AMP). Ainda, exerce uma importante função no endotélio vascular, bloqueando a agregação plaquetária, através da regulação do catabolismo do ADP no sangue, mantendo assim a integridade celular (ENJYOJI, 1999; PINSKY et al., 2002; MARCUS, 2003; BAGATINI et al., 2008; YEGUTKIN, 2008) e agindo como um cardioprotetor nos períodos de isquemia (KÖHLER, 2007) no IAM. Essa enzima foi recentemente caracterizada por Leal et al. (2005) em linfócitos periféricos humanos e outras células.

O produto final da hidrólise realizada pela NTPDase é o AMP, que serve de substrato para a enzima Ecto-5'-NT, que é uma glicoproteína ligada a membrana via um glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. A Ecto 5'-NT hidrolisa o AMP, gerando adenosina extracelular e completando o metabolismo do ATP, secretado pelos diferentes tecidos do organismo (ELTZSCHIG et al., 2003, YEGUTKIN, 2008), como no tecido muscular cardíaco durante a diminuição da suplementação de oxigênio (LINDEN, 2001).

A adenosina (o produto final da hidrólise do ATP) e os derivados da adenina são moduladores do tônus vascular e da função plaquetária (COADE, 1989) e podem inibir a agregação plaquetária (BAKKER et al., 1994; ZIMMERMANN, 1999), sendo esse efeito modulado por fatores genéticos, por fatores metabólicos ou por drogas (RIKSEN et al., 2008). A hidrólise de AMP para adenosina é proeminente no início da isquemia e no segundo período isquêmico os nucleotídeos são conservados pela inibição da hidrólise do AMP (GUSTAFSON et al., 1999).

No entanto, o estresse oxidativo e os mediadores pró-inflamatórios inibem a ação da NTPDase1, provocando um aumento na concentração de nucleotídeos extracelulares, os quais desencadeiam a sinalização para eventos pró-trombóticos e para o aumento da proliferação do tecido da musculatura esquelética lisa (KACZMAREK et al., 1996 & KOSIAK et al., 2008).

Outra importante enzima, envolvida nesse processo é a ADA, que é amplamente distribuída em tecidos humanos e mostra maior atividade em tecidos linfóides, sendo um importante marcador enzimático para a avaliação da resposta imune na patogênese do IAM (JYOTHY et al., 2003). Esta enzima atua no metabolismo das purinas através da via de recuperação, catalisando a clivagem hidrolítica irreversível da adenosina para inosina e amônia (ADAMS et al., 1976).

Em humanos a ADA existe na forma de duas isoenzimas classificadas como: ADA1 e ADA2 (SHAROYAN et al., 2006). A ADA1 é encontrada em todo o organismo e é principalmente citosólica (TSUBOI et al., 1995). Também, pode estar ligada a membrana por uma glicoproteína conhecida como CD26 (YEGUTKIN, 2008), formando um complexo ADA-cp que é responsável pelo controle dos níveis de adenosina extracelular (FRANCO et al., 1997).

Durante a hipóxia e isquemia o organismo induz a expressão de CD26 nas células endoteliais aumentando a atividade da ADA e com isto permite a proteção das células contra a liberação de níveis elevados de adenosina que ocorre nestas condições. Um aumento agudo de adenosina é importante para contrabalancear a isquemia via propriedades de vasodilatação (ELTZSCHIG et al., 2004), inibição da atividade plaquetária (KOSZALKA, 2004) e anti-inflamatórias (BARANKIEWICZ et al., 1997), mas a elevação persistente da adenosina é citotóxica (ELTZSCHIG, 2006). No entanto, a atividade da ADA2 é menor que da ADA1 em tecidos, mas é abundante no plasma (IWAKI-EGAWA et al., 2006). As atividades destas isoenzimas estão aumentadas em pacientes com DAC e IAM (CHAVAN et al., 2007). A hipóxia é um potente estímulo para a liberação de ambos, adenosina e fatores angiogênicos, e também modula a expressão de receptores (A2B) de adenosina nas células musculares endoteliais e esqueléticas (FEOKTISTOV, 2004).

Posteriormente, a estimulação dos receptores de adenosina induz a vários efeitos cardiovasculares, tais como a vasodilatação, a inibição da inflamação diminuindo a adesão dos leucócitos polimorfonucleares ao endotélio vascular, a modulação da atividade do sistema nervoso simpático e ao aumento da tolerância do miocárdio contra a isquemia e a reperfusão, protegendo assim, os tecidos afetados (RIKSEN et al., 2008). As enzimas hidrolíticas dos leucócitos, principalmente a fosfatase ácida, a lisozima e a ADA mostraram-se mais ativas nos pacientes com DAC e IAM e podem contribuir para a inflamação relacionada com DAC (CHAVAN et al., 2007).

A adenosina aumenta a proteção tecidual contra as espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas a partir dos neutrófilos ativados e do endotélio, no miocárdio isquêmico, lesam diretamente a membrana celular endotelial, causando morte celular (VALKO et al., 2006). Vários estudos demonstraram um aumento nos níveis de EROS em patologias como: diabetes, hipertensão (LUNKES et al., 2003; LUNKES et al., 2008), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2007) e acidente vascular cerebral (CORREA et al., 2008).

O endotélio é um sistema orgânico complexo que controla a homeostase da

vasculatura pela integração de sinais entre a parede vascular e o lúmen do vaso. O dano aos fosfolípidios e proteínas provocados por EROS estão entre os principais efeitos da isquemia e reperfusão, que ocorre no IAM, causando a morte celular pela perda da seletividade da membrana celular (NAGESWARA et al., 2005).

As proteínas são as primeiras moléculas biológicas afetadas pelo estresse oxidativo nas células (Figura 10). Esse dano às proteínas pode ser mensurado pelo conteúdo de proteína carbonil e diversos estudos têm relatado níveis elevados em um número considerável de doenças, entre elas encontra-se o IAM (MAYNARD et al., 2009; BAGATINI et al., 2010).

Para inibir ou diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo existem compostos de natureza não enzimática como os tocoferóis (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C), e enzimáticos representados principalmente pelas enzimas catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (BARREIROS, 2006). A atividade antioxidante da CAT no IAM é maior nas primeiras horas após trombólise seguido de uma diminuição até o terceiro dia após-infarto (SIMIĆ, 2003).

A enzima SOD está presente em todos os organismos aeróbicos, no citoplasma celular e nos fluidos extracelulares, onde é secretada pelas células endoteliais (MCCORD & FRIDOVICH,1969; FARBER,1990). A sua atividade é dependente de cobre e zinco. A SOD catalisa a dismutação do radical O_2^- em H_2O_2 e seguindo-se a esta reação o H_2O_2 é degradado pela ação da enzima CAT resultando em água e O_2 (MCCORD & FRIDOVICH,1969; FARBER,1990).

A enzima CAT é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado e sua atividade é dependente de NADPH (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Por meio da atividade destas enzimas o organismo tenta manter o equilíbrio, diminuindo as quantidades do radical O_2^- e H_2O_2 , diminuindo a formação do radical hidroxil (BOVERIS & CADENAS, 1997).

Bagatini e colaboradores (2008, 2010) demonstraram um aumento nos níveis sorológicos de EROS como o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da proteína carbonil em pacientes com IAM, e a diminuição dos níveis de antioxidantes como a vitamina C e E, confirmando estudos anteriores que demonstraram um aumento de estresse oxidativo nas doenças cardíacas (VASCONCELOS et al., 2007) e a depressão do sistema antioxidante nesses pacientes (BAGATINI, 2010).

Portanto, muitas moléculas estão sendo estudadas, as quais podem ter um papel importante na fisiopatologia do IAM, como as substâncias antioxidantes (glutaciona reduzida),

enzimas antioxidantes (glutathiona peroxidase e superóxido dismutase), vitaminas antioxidantes (vitamina C e vitamina E), ADA e controle metabólico (glicose e perfil lipídico).

A albumina é uma molécula sintetizada no fígado, de 69.000 Da, e é a mais abundante dentre as proteínas plasmáticas, representando 50% do total de proteínas neste compartimento corporal (BOLDT, 2010). A meia vida dessa proteína é em média de 20 dias em pessoas saudáveis. No entanto, em pacientes que estejam em situações patológicas graves, esta meia vida diminui. Essa proteína atua como um tampão no equilíbrio ácido-básico e no transporte de várias moléculas fisiológicas e xenobióticos (SANTOS, 2004). A albumina também tem um possível efeito antioxidante e protetor contra apoptose (MENDEZ, 2005).

Após o IAM se inicia um processo de isquemia, hipóxia, acidose e formação de radicais livres, que podem alterar a habilidade da albumina humana de se ligar a metais (CHAN,1995). Desta forma, a IMA descoberta na década de 1990, tem sido um dos marcadores de escolha na avaliação da isquemia cardíaca (BAR-OR, 1999).

A IMA é formada a partir de condições isquêmicas no músculo cardíaco, resultante da queda absoluta ou relativa da oferta de oxigênio. No entanto, a formação da IMA, conforme descrito acima não é restrita a isquemia cardíaca, mas também pode ser detectado um pequeno aumento, como resultado de isquemia em outros tecidos (ZAPICO- MUNIZ, 2004; ROY, 2006).

Portanto, a combinação de IMA, eletrocardiograma e troponina permitem maior rapidez de diagnóstico aos pacientes sem doença isquêmica coronariana. Quando a medida da IMA foi adicionada ao protocolo dos pacientes com IAM junto com o eletrocardiograma ou às medidas de troponina (cTnT), ou ambos, a sensibilidade para o diagnóstico aumentou para 90%-95% (SINHA, 2004).

Após a ruptura de uma placa aterosclerótica ou na estenose, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio que reagem com a região N-terminal da proteína especialmente, resíduos de aminoácidos Asp-Ala-His da macromolécula albumina (BAR OR, 2001).

Embora este processo seja amplamente aceito, ele não está claramente definido e, portanto, mais variáveis podem influenciar na formação da IMA (BAR OR, 2008). A IMA é o melhor parâmetro a ser medido imediatamente após o início da isquemia cardíaca de 30 minutos até 3 horas (HJORTSORJ, 2009 e FENG, 2010), tendo um alto valor preditivo negativo e de sensibilidade, quando os níveis de troponina estão positivos ou negativos na amostra analisada (BAR OR, 2001). No entanto, seu aumento, não fornece informações, sobre

a extensão da isquemia cardíaca em pacientes com IAM, embora, a ausência de aumento nos níveis séricos de IMA, pode ser usada qualitativamente para afastar isquemia cardíaca (CHEK, 2011).

Também importante na fisiopatologia do IAM é a aterosclerose, que por muitos anos foi considerada somente um acúmulo de lipídios na parede arterial. No entanto, o desenvolvimento no campo da biologia vascular tem esclarecido que as lesões ateroscleróticas são de fato uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas e dinâmicas, essencialmente inflamatórias por natureza (SERRANO, 2001; ROCHA, 2009). O processo inflamatório não só causa disfunção endotelial como desencadeia proliferação e migração celulares, estresse oxidativo, apoptose, trombose e necrose celular (GOMES, 2010).

No IAM, a extensão da lesão no miocárdio está intimamente ligada ao prognóstico. O uso rotineiro de modalidades de imagem para avaliar o tamanho do IAM na prática clínica diária é limitada por custos e logística. Portanto, os marcadores bioquímicos troponinas cardíacas T e I, CK, CK-MB, permanecem os métodos mais usados atualmente, para a estimativa do tamanho do IAM e também para otimizar estratégias terapêuticas para esses pacientes. Desta forma a troponina é utilizada para o diagnóstico do IAM e pode fornecer informações úteis para a avaliação do risco, que é complementar à determinação da função cardíaca (HALLEN, 2012). Através da lesão vascular e isquemia tecidual do miocárdio as atividades das ectonucleotidases aumentam como mecanismo compensatório e outras enzimas (CAT e SOD) se ativam para auxiliar no equilíbrio redox de defesa contra a isquemia. Também neste processo se formam moléculas marcadoras de dano oxidativo como a IMA, TBARS e PC.

Em estudos no nosso laboratório (BAGATINI, 2008; 2010) foi observado que as atividades das enzimas ectonucleotidases estavam aumentadas e que o perfil oxidativo estava em desequilíbrio nos pacientes com IAM. No entanto, não foram comparados segundo a presença ou ausência da elevação do segmento ST. Como no IAM com elevação de supra ST os níveis de troponina são maiores que nos pacientes NSTEMI identificamos uma maior necrose tecidual e acredita-se que as atividades destas ectonucleotidases e do perfil oxidativo estariam diferentes entre os pacientes STEMI e NSTEMI. Desta forma, essas análises poderiam ser utilizadas como marcadores de prognóstico para diferenciar as duas condições, colaborando para um diagnóstico rápido e um tratamento mais específico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade de ectonucleotidases e perfil oxidativo em pacientes STEMI e NSTEMI.

2.2 Objetivos Específicos

Nos pacientes com elevação de supra ST, pacientes sem elevação da supra ST e controles:

- Analisar as atividades das enzimas NTPDase, 5'- Nucleotidase e adenosina desaminase em plaquetas e verificar a expressão da CD39 na superfície das mesmas.
- Analisar o perfil oxidativo através dos níveis de substância reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, Conteúdo de Proteína Carbonil e Albumina Modificada pela Isquemia.
- Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas através da atividade das enzimas Catalase e Superóxido Dismutase e verificar os níveis de antioxidantes não enzimáticos através da dosagem da Vitamina C.

3 MANUSCRITOS

Na sequência são apresentados os manuscritos que contém os resultados dos estudos realizados. São eles:

3.1 Manuscrito 1 - Extracellular hydrolysis of adenine nucleotides and nucleoside adenosine is higher in patients with ST elevation than non-ST elevation in acute myocardial infarction;

3.2 Manuscrito 2 - Oxidative profile of patients with ST segment elevation.

3.1 Manuscrito 1 - Extracellular hydrolysis of adenine nucleotides and nucleoside adenosine is higher in patients with ST elevation than non-ST elevation in acute myocardial infarction.

Extracellular hydrolysis of adenine nucleotides and nucleoside adenosine is higher in patients with ST elevation than non-ST elevation in acute myocardial infarction

Marinês Calegari Lavall^a, Margarete Dulce Bagatini^{b*}, Gustavo Roberto Thomé^a, Gabriela Bonfanti^c, Maria Beatriz Moretto^c, Liliane Zimmermann de Oliveira^d, Vera Maria Morsch^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{a*}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bCurso de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, Chapecó, SC, Brazil.

^cDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^dLaboratório de Imunofenotipagem, Serviço de Hematologia e Oncologia, HUSM, Santa Maria, RS, Brazil.

***Corresponding author:**

Dr. Margarete Dulce Bagatini

Curso de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, Avenida Getúlio Dorneles Vargas, 609 N, 89812-000, Chapecó, SC, Brazil.

Tel: +55 4999194832

E-mail: margaretebagatini@yahoo.com.br

Dr. Maria Rosa Chitolina Schetinger

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

Telephone number: + 55-55-3220-9557

Fax number: + 55-5532208978

E-mail address: mariachitolina@gmail.com

Running title: Hydrolysis of adenine nucleotides in ST elevation.

3.1.1 Abstract

The hydrolysis of adenine nucleotide membrane-bound platelets is changed in acute myocardial infarction (AMI) probably due to a greater arterial blockage and cell damage in patients with ST elevation (STEMI) than in those without ST segment elevation (NSTEMI). This study aimed to compare the extracellular hydrolysis of adenine nucleotides on the platelet surface of STEMI and NSTEMI patients. This study was carried out with 50 patients with AMI (STEMI and NSTEMI). The extracellular hydrolysis of adenine nucleotides and nucleoside adenosine as well as the expression of NTPDase were verified in platelets. The results demonstrated that STEMI patients had significantly higher extracellular hydrolysis of adenine nucleotides, ADA (adenosine deaminase) activity, as well as troponin levels when compared to NSTEMI patients. Findings suggest that the extracellular hydrolysis of adenine nucleotides and increase in the ADA activity are higher in patients with STEMI than in those NSTEMI probably because there was a blockage in this major arterial with a large area of damaged tissue.

Keywords: Acute myocardial infarction; Platelets; Adenine nucleotides; Nucleoside adenosine

3.1.2 Introduction

The acute myocardial infarction (AMI) is a public health problem and one of the major causes of death and disability worldwide. It is defined as cell death in heart muscle by prolonged myocardial ischemia (Thygesen *et al.*, 2007) from an abrupt reduction in coronary flow by the presence of a blocked coronary artery (Chesebro *et al.*, 1997). The diagnosis of AMI is performed by clinical evaluation which involves history of chest pain associated with increasing troponin levels and electrocardiogram (ECG) changes (Johanson *et al.*, 2003). Although ECG is important, it is not sufficient to achieve a global characterization of the risk profile of patients (Teixeira *et al.*, 2010). The ST segment elevation (STEMI) indicates that there have already been AMI, whereas the Non-ST elevation (NSTEMI) is considered an early marker of good prognosis in the medium term and is used as a variable in patients with acute coronary syndrome (ACS) (Dziewierz *et al.*, 2009). AMI patients are treated differently in terms of coronary reperfusion and also in terms of secondary prevention. NSTEMI is associated with more favorable prognosis than STEMI but the risk of in-hospital death is high (Montalescot *et al.*, 2007).

Ischemic events are related to the formation of fibrin formed at the site of rupture or plaque erosion. Moreover, they can lead to changes in the severity of stenosis, that is, the vessel may be partially or totally occluded (Ardissino *et al.*, 1997). When a vascular assault occurs, the cellular response is immediate on-site. Platelets migrate to the area of injury and secrete various mediators and cellular factors to form a procoagulant catalytic surface. The interaction of platelets, leukocytes, and other substances promote the formation of clot. The conditions of blood flow and the rate of platelet aggregation influence the formation of thrombi (Falati *et al.*, 2002 and 2003).

There is evidence indicating that the expression of NTPDase (CD39) enzyme on either endothelial or immune cells allows for homeostatic integration and control of vascular inflammatory process and immune cell reactions at sites of injury (Deaglio & Robson, 2011). CD39 plays an important role in platelet response and regulation of extracellular hydrolysis of adenine nucleotides, adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP), to adenosine monophosphate (AMP), which is subsequently converted into adenosine by 5'-nucleotidase (Pilla *et al.*, 1996). After periods of ischemia in AMI an increase of CD39 and 5'-nucleotidase (CD73) activities was observed. Adenosine is recognized as a thromboregulatory factor since it hydrolyzes ADP, a potent platelet agonist (Marcus *et al.*, 2003; Pinsky *et al.*, 2002). The adenosine deaminase (ADA), catalyzes the irreversible hydrolytic cleavage of adenosine to inosine and ammonia (Adams & Harkens, 1976).

Studies performed in our laboratory have already showed that the hydrolysis of adenine nucleotides linked to the membrane of the platelets is altered in AMI patients (Bagatini *et al.*, 2011). However, it was not related to a distinctive condition of AMI. The presence or absence of ST depression is a risk factor of ischemic events of death or damage. Through the determination of troponin levels it is known that such cell damage is much larger in patients with ST elevation (Hallén, 2012). Thus, we decided to explore whether there are differences in the hydrolysis of ATP, ADP and AMP in platelets of patients with AMI and ADA activity and expression of NTPDase in STEMI and NSTEMI groups.

3.1.3 Material and methods

AMI patients enrolled in this study were from the University Hospital of Santa Maria and blood analysis was realized at the Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria. We selected 50 AMI patients (NSTEMI and STEMI). The different sample number in each studied parameter was due to limited blood volume collection from each patient. Thus, in some cases we selected different parameters and the number of patients consequently was different. Blood samples were collected by venous puncture until 72 h after the beginning of attack, from January 2008 to March 2011. AMI patients were selected according to clinical criteria such as chest pain associated with clinical evidence of ischemia through a history of AMI and changes in serum concentrations of troponins. NSTEMI and STEMI patients were differentiated by electrocardiographic features. All AMI patients received standard therapy according to local routines. The exclusion criterion used for the patients was the presence of neoplasms and vitamin supplementation. The present study was approved by the Human Ethical Committee of the Federal University of Santa Maria, protocol number 009482.0.243.000-07 and was in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association. The informed consent was obtained from all participants before enrollment.

The platelet-rich plasma (PRP) was prepared following the methods of Pilla *et al.*, 1996 and Lunkes *et al.*, 2003. Briefly, blood was collected into 0.129 mol/L citrate and centrifuged at 160 g for 10 min. The PRP was separated, centrifuged at 1400 g for 15 min, and washed twice with 3.5 mM of Hepes isosmolar buffer. The washed platelets were resuspended in Hepes buffer and adjusted to 0.3-0.5 mg/mL of protein. The viability and integrity of platelets were confirmed by the measurement of lactate dehydrogenase activity using the enzymatic Vitros 950 (Ortho-Clinical Diagnostics; Johnson & Johnson).

The Measurement of hydrolysis in platelets for ATP and ADP hydrolysis 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. In the same way, 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 µL 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 KH₂PO₄ as standard. The same process was carried out in the control tubes to exclude non enzymatic hydrolysis, by adding twenty microliters of protein to the reaction medium after TCA. Results were expressed as nmol inorganic phosphate released/ minute/milligram of protein (nmol Pi released/min/mg protein).

The expression of CD39 was carried out in platelets. To the sample preparation, peripheral blood was incubated with monoclonal antibodies (MAb) conjugated to fluorescein isothiocyanate (anti-CD61 FITC) and phycoerythrin (anti-CD39 PE) by a double-staining combination. For the immunophenotypic studies stain samples and then lyse/wash technique was used. The erythrocyte lysis was carried out using FACS lysing solution (Becton Dickinson (BD), San Jose, CA, USA). Cells were washed with PBS (phosphate buffered

saline), resuspended in PBS buffer, and immediately after analyzed by FACS caliber cytometer (BD), using Cell Quest (BD) software program. Among the CD61+ population, the presence of CD39 in platelets was confirmed and results expressed in relative values.

The adenosine deaminase (ADA) activity was measured spectrophotometrically in platelets by the method of Giusti and Gakis (1971). The proteins were determined by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin (BSA) as standard (Bradford, 1976).

Troponin I was determined (Immulate, Los Angeles, CA, USA) upon arrival to the emergency room and at 8, 12, and every 24 h after the onset of pain until the maximum level was reached.

For statistical analysis was performed using Student's t-test to check significant differences among the groups and results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all analyses.

3.1.4 Results

The majority of patients presented STEMI (66 %) condition, whereas the remaining patients were diagnosed with NSTEMI (Table 1).

We found that STEMI patients had significantly higher troponin levels ($70.49 \text{ ng/mL} \pm 8.54$) ($p < 0.0001$) when compared to NSTEMI patients ($17.91 \pm 4.20 \text{ ng/mL}$).

The results of our study showed that the modifiable risk factors and especially smoking had a high prevalence in patients with STEMI (47%) when compared with NSTEMI, and 52.7% of these patients showed dyslipidemia. Prevalence of hypertension (82%) and diabetes mellitus (44%) in STEMI patients was also observed.

Student's t-test revealed that hydrolysis of ATP, ADP and AMP was significantly increased when comparing STEMI and NSTEMI patients ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively) (Fig. 1, 2, 3). The same was observed for ADA activity using adenosine as substrate ($p < 0.05$) (Fig. 4).

The expression of NTPDase (CD39) by statistical analysis the difference was not significant between the NSTEMI group and the STEMI group (Table 1) according to the Student's t-test when we observed the percentage of CD39-positive cells.

3.1.5 Discussion

Considering that patients with ST-segment elevation have severe arterial blockage and greater cell damage than those without ST segment elevation, we assume that ATP hydrolyzed and released from these damaged cells should be higher. Although there are other parameters that distinguish the two conditions of AMI, it is important to find new parameters to better understand the physiological mechanism of these conditions. This study verified the hypothesis of having differential hydrolysis of ATP, ADP and AMP in platelets of AMI in STEMI and NSTEMI conditions.

Bagatini *et al.* (2011) from our research team and Kohler *et al.* (2007) recently demonstrated higher hydrolysis of ATP, ADP and AMP in patients with AMI when compared to controls. Moreover, corroborating

the work by Hallén, (2012), we also observed that the troponin levels were higher in STEMI than NSTEMI conditions and that the presence or absence of ST depression may be a risk factor of death or ischemic events in AMI patients (Dziewierz *et al.*, 2009). Confirming these results, our study showed that the hydrolysis of ATP, ADP and AMP in platelets of patients with AMI as well as troponin levels were significantly higher when compared to the conditions STEMI and NSTEMI. These results suggest that the condition STEMI response to injury was higher and that ATP may have an important effect. We believe that this higher elevation of troponin and hydrolysis of ATP, ADP and AMP in STEMI patients is due to the damage of cardiac tissue cells promoted by tissue hypoxia where the artery is totally occluded. Moreover, it is well established that the level of troponin is a gold marker in AMI (Hallén, 2012) and has also been associated with a worse prognosis (Goodman *et al.*, 2006).

In this context, it can be inferred that patients with AMI/STEMI have greater cell damage in cardiac tissue with increased cellular release of adenine nucleotides and can also be associated with a worse prognosis. NSTEMI is associated with a better prognosis than STEMI prognosis and has a substantial amount of viable myocardial tissue; however it presents a vulnerable plaque (Montalescot *et al.*, 2007) to AMI.

According to the literature, the nucleotides ATP, ADP, AMP as well as derivatives of adenosine nucleosides are important signaling molecules in the vasculature able to influence vasomotor responses, inflammation, cardiac physiology and pathophysiology including myocardial ischemia and reactivity of platelets (Burstock, 2002). Microparticles released at the site of cellular damage appear to be associated with functional NTPDases, and the accumulation of these at sites of vascular injury can induce platelet- aggregation and mediate thrombosis, inflammation, cell apoptosis and necrosis (Atkinson *et al.*, 2006).

In accordance with other studies (Bagatini *et al.*, 20011; Buergler *et al.*, 2005), we can suggest that the hydrolysis of ATP, ADP and AMP would be enhanced by tissue hypoxia increasing thus the activity of enzymes and control platelet activation, thrombus size and stability by regulating phosphohydrolytic activity which hydrolyzes ADP (prothrombotic) preventing the hyperplasia of the arterial endothelial cells (Eltzschig *et al.*, 2004; Buergler *et al.*, 2005).

However, this study showed no difference in expression of CD39 between the different conditions in AMI, probably because the sample size is modest. Finally, a larger study is needed to assess these changes in expression of CD39 that can occur between the different conditions of AMI.

In addition, Kohler *et al.* (2007) showed an increase in ADA activity in patients with AMI compared with controls, and our results demonstrate that the ADA activity of platelets was greater in STEMI compared with NSTEMI conditions (Fig. 4). ADA catalyzes the irreversible hydrolytic cleavage of adenosine to inosine and ammonia (Berne, 1986) and that adenosine exerts a cardiovascular protective effect (Grenz *et al.*, 2011). In view of this, the increase of ADA activity irreversible hydrolysis of adenosine is higher in STEMI patients, these patients therefore the concentration of adenosine is decreased, thus obtaining minor cardiovascular protection.

In conclusion, these data suggest that the extracellular hydrolysis of adenine nucleotides is higher in patients with the ST segment elevation than in those without ST segment elevation probably because in these patients there was a blockage in this arterial with a large area of damaged tissue.

3.1.6 References

1. Adams, A. & Harkens, RA (1994) Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues. *Clin Exp Immunol* 26:647-649.
2. Ardissino D, Merlini PA, Ariens R, Coppola R, Bramucci E, Mannucci M (1997) Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 349: 769-771.
3. Atkinson B, Dwyer K, Enyoloji K, Simon C, Robson SC (2006) Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 36(2): 217–222.
4. Bagatini MD, Martins CC, Gasparetto D, Spanevello RM, Becker LV, Rosa CS, Battisti V, Bellé L, Gonçalves JF, Schetinger MR, Dos Santos RB, Oliveira LZ, Morsch VM (2011) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clin Chim Acta* 412:159-164.
5. Berne RM (1986) The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res* 47: 807–813.
6. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 218-254.
7. Buegler JM, Maliszewski CR, Broekman MJ, Kaluza GL, Schulz DG, Marcus AJ, Raizner AE, Kleiman NS, Ali NM (2005) Effects of SolCD39, a novel inhibitor of platelet aggregation, on platelet deposition and aggregation after PTCA in a porcine model. *J Thromb* 19:115–122.
8. Burstock G (2002) Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscl Throm* 22:364-372.
9. Chan K, Delfret D & Junges K (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺ ATPase activity. *Anal Biochem* 157: 375–380.
10. Chesebro JH, Rauch U, Fuster V, Badimon JJ (1997) Pathogenesis of thrombosis in coronary artery disease. *Haemostasis* 27:12-18.
11. Deaglio S, Robson SC (2011) Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv Pharmacol* 61:301-32.
12. Dziewierz A, Siudak Z, Dykla D, Rakowski T, Mielecki W, Dubiel JS, Dudek D (2009) Management and mortality in patients with non-ST-segment elevation vs. ST-segment elevation myocardial infarction. Data from the Malopolska Registry of Acute Coronary Syndromes. *Kardiol Pol* 67(2):115-20.
13. Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, Cotta RJ, Ibla JC, Robson SC, Colgan SP (2004) Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood* 104:3986-3992.
14. Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B (2002) Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* 8:1175-1181.

15. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B (2003) Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 197:1585–1598.
16. Giusti G, Gakis C (1971) Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 12: 417–425.
17. Goodman SG, Steg PG, Eagle KA, Fox KA, López-Sendón J, Montalescot G, Budaj A, Kennelly BM, Gore JM, Allegro J, Granger CB, Gurfinkel EP; GRACE Investigators (2006) The diagnostic and prognostic impact of the redefinition of acute myocardial infarction: lessons from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Am Heart J* 151: 654 – 660.
18. Grenz A, Homann D, Eltzschig HK (2011) Extracellular Adenosine: A Safety Signal That Dampens Hypoxia-Induced Inflammation During Ischemia. *Antioxid Redox Signal* [Epub ahead of print].
19. Hallén J (2012) Troponin for the Estimation of Infarct Size: What Have We Learned? *Cardiology* 121:204–212.
20. Köhler D, Eckle T, Faigle M, Grenz A, Mittelbronn M, Laucher S, Hart ML, Robson SC, Müller CE, Eltzschig HK (2007) CD39/ectonucleotidases triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 116:1784–94.
21. Johanson P, Wagner GS, Dellborg M, Krucoff MW (2003) ST-segment monitoring in patients with acute coronary syndromes. *Curr Cardiol Rep* 5:278–83.
22. Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch VM, Mazzanti CM, Schetinger MR (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 109: 189-194.
23. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R: Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, et al (2003) Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 1: 2497– 2509.
24. Montalescot G, Dallongeville J, Van Belle E, Rouanet S, Baulac C, Degrandart A, Vicaute A (2007) STEMI and NSTEMI: are they so different? 1 year outcomes in acute myocardial infarction as defined by the ESC/ACC definition (the OPERA registry). *Eur Heart J* 28:1409e17.
25. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ (1996) diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets* 7: 225–230.
26. Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES Jr, Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR (2002) Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* 109:1031-1040.

27. Teixeira R, Lourenço C, António N, Monteiro S, Baptista R, Jorge E, Ferreira MJ, Monteiro P, Freitas M, Providência LA (2010) A Importância de um ECG Normal em Síndromes Coronarianas Agudas sem Supradesnivelamento do Segmento ST. *Arq Bras Cardiol* 94:24-32.

Table

Table 1. Baseline characteristics in AMI patients according to the type of AMI.

| Parameter | AMI | |
|-----------------------|--------------|------------------|
| | STEMI | NSTEMI |
| Totals (%) | 66 | 34 |
| Sex (Male/Female %) | 68/32 | 57/43 |
| Age (years) | 59.4 ± 1.47 | 62.8 ± 2.51 |
| Family history (%) | 68 | 80 |
| Diabetes mellitus (%) | 44 | 54 |
| Dyslipidemia (%) | 44.77 | 62.85 |
| Hypertension (%) | 82 | 83 |
| Smoking (%) | 47 | 29 |
| Troponin (ng/mL) | 70.49 ± 8.54 | 17.91 ± 4.20 *** |
| CD39 (%) | 14.16 ± 1.80 | 14.14 ± 1.89 |

Data expressed as mean ± SEM.

***Significant difference (at 0.0001 level) by Student's t-test.

Legend of figures

Figure 1. ATP hydrolysis in platelets from Acute Myocardial Infarction (AMI) patients with STEMI and NSTEMI conditions. Data are presented as mean \pm S.E.M. The symbol * represents statistical difference from the control group (* p <0.05). Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Figure 2. ADP hydrolysis in platelets from Acute Myocardial Infarction (AMI) patients with STEMI and NSTEMI conditions. Data are presented as mean \pm S.E.M. The symbol * represents statistical difference from the control group (** p <0.01). Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Figure 3. AMP hydrolysis in platelets from Acute Myocardial Infarction (AMI) patients with STEMI and NSTEMI conditions. Data are presented as mean \pm S.E.M. The symbol * represents statistical difference from the control group (* p <0.05). Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Figure 4. Mean serum and platelet ADA levels estimated in AMI patients with STEMI and NSTEMI conditions. Data are presented as mean \pm S.E.M. (* p <0.05). The symbol* represents statistical difference from the control group. Enzyme specific activities are reported as U/L.

Figure 1.

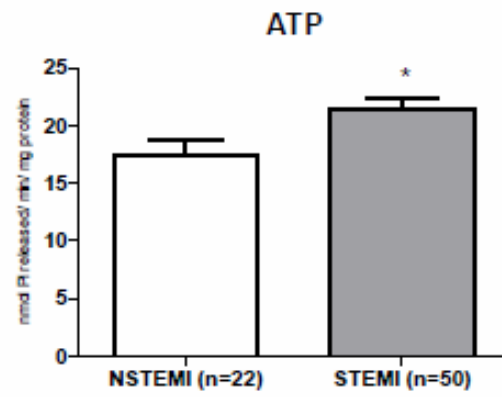


Figure 2.

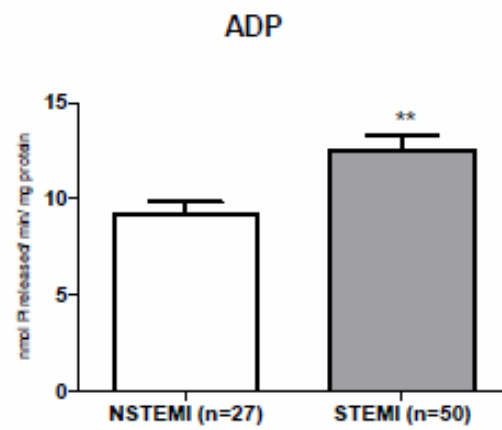


Figure 3.

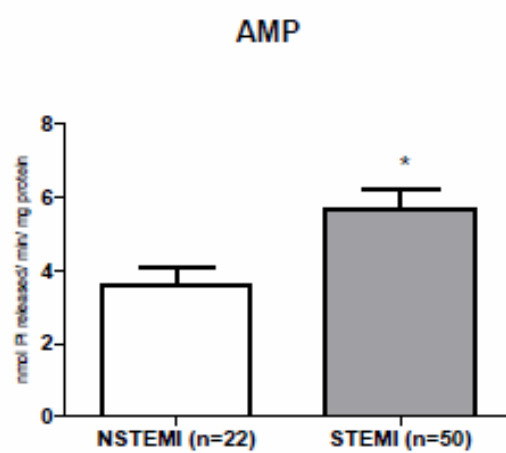
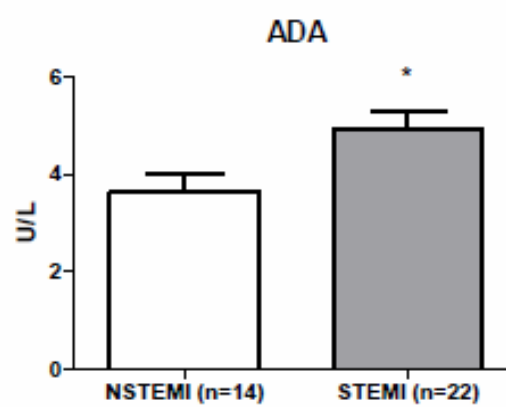


Figure 4.



3.2 MANUSCRITO 2 - OXIDATIVE PROFILE OF PATIENTS WITH ST SEGMENT ELEVATION

Oxidative profile of patients with ST segment elevation
Short title: Oxidative profile and ST-elevation

Marinês Calegari Lavall^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a, Gabriela Bonfanti^c, Ronize Bordignon Ceolin^c, Karen Lilian Schott^a, Thissiane de Lima Gonçalves^d, Rafael Noal Moresco^c, Vera Maria Morsch^a, Margarete Dulce Bagatini^{b*}

^aPostgraduate Program in Toxicological Biochemistry, Center of Naturais and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^bCurso de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, Chapecó, SC, Brazil.

^cPostgraduate Program in Pharmacology, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^dDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author:

Dr. Margarete Dulce Bagatini

Curso de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, Avenida Getúlio Dorneles Vargas, 609 N, 89812-000, Chapecó, SC, Brazil.

Tel: +55 4999194832

E-mail: margaretebagatini@yahoo.com.br

3.2.1 Abstract

Patients with ST-segment elevation (STEMI) have totally occluded vessels, while patients with non-ST-segment elevation (NSTEMI) present partial vessel occlusion, which may generate different levels of Reactive Oxygen Species (ROS).

Objectives: The aim of this study was to examine and compare the oxidative profile in acute myocardial infarction (AMI) patients with ST segment elevation (STEMI) and non-STEMI (NSTEMI) as well as in control subjects.

Design and Methods: This study was carried with 46 AMI patients divided into STEMI and NSTEMI. The control groups consisted of 40 healthy subjects. Oxidative stress profile was evaluated analyzing the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, vitamin C (VIT C) levels, carbonyl protein content, lipid peroxidation and serum ischemia-modified albumin (IMA). **Results:** CAT and SOD activities, plasma TBARS, serum protein carbonyl and serum IMA were significantly higher in STEMI and NSTEMI patients when compared with the control group. No difference to the IMA levels and oxidative stress parameters was observed between conditions of AMI. Only plasma VIT C in STEMI patients was significantly lower when compared with NSTEMI patients and control group.

Conclusions: Results suggest that the oxidative profile generated by STEMI and NSTEMI is similar regardless of the size of arterial occlusion generated by thrombus.

Keywords: Acute myocardial infarction; STEMI; NSTEMI; oxidative profile

3.2.2 Introduction

The endothelial cell in the vasculature is the site of signaling and injurious effects of reactive oxygen species (ROS) produced in ischemia. Acute myocardial infarction (AMI) patients have an inflammatory process and an increased production of ROS that are in imbalance with the antioxidant system (1). ROS generated by ischemia reduce the ability of albumin to bind metal ion, resulting in ischemia modified albumin (IMA) (2). Moreover, biomarkers of oxidation as thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and carbonyl protein represent indicators of tissue damage (3).

Concerning the antioxidant defense system enrolled in ischemic events, the superoxide dismutase enzyme (SOD) removes superoxide anion, a highly deleterious radical for all types of cells and tissues and the catalase (CAT) eliminates hydrogen peroxide as well as toxic hydroperoxides of unsaturated fatty acids (4). In addition, non enzymatic antioxidant mechanisms, such as vitamin C (VIT C), protect against oxidative stress (1, 3).

Studies performed in our laboratory have already showed that ROS and enzymatic antioxidant defenses are high in AMI patients (3); however, a comparison between STEMI and NSTEMI patients was not carried out. Taking this into account, the aim of this study was to evaluate the oxidative profile of STEMI and NSTEMI patients.

3.2.3 Materials and methods

The study population consisted of 46 patients (66% STEMI mean age 59 years old and 34% NSTEMI mean age 62 years old) with chest pain and final diagnosis of AMI presenting at the University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The patients were divided into two groups, namely, NSTEMI and STEMI according to the electrocardiogram that showed non-ST elevation and ST elevation, respectively. The control group was composed of 40 healthy persons (mean age 56.0 years old). The exclusion criterion used was the presence of neoplasms and vitamin supplementation. The present study was approved by the Human Ethical Committee of the Federal University of Santa Maria, protocol number 009482.0.243.000-07. The informed consent was obtained from all participants before enrollment. The serum IMA was measured by colorimetric assay previously described by Bar-Or et al. (2000) (6). The Lipid peroxidation was estimated in plasma by the measurement of TBARS (7). The levels of VIT C were estimated in according to Galley et al. (1996) (8) with some modifications by Jacques-Silva et al. (2001) (9), the content of carbonyl protein was determined according to the procedure of Levine et al. (1990) (10). CAT and SOD enzyme activities were estimated by method of Aebi H (1984) (11) and Misra (1972) (12), respectively.

Data were analyzed by the GraphPad Prism version 5.01. The statistical analysis was performed using one way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison post hoc test and expressed as mean \pm standard deviation of the mean (SD). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all analyses.

3.2.4 Results

The results obtained in the present study show that the parameters of oxidative stress were altered in STEMI and NSTEMI patients when compared with the control group (Table 1). We observed an increase in the carbonyl protein content ($p < 0.001$), TBARS ($p < 0.001$) and IMA ($p < 0.0001$) levels in STEMI patients. The same was observed to SOD ($p < 0.05$) and CAT ($p < 0.001$) antioxidant enzymes. However, VIT C levels were significantly lower in STEMI ($p < 0.001$) when compared with the control group and NSTEMI patients ($p < 0.001$).

In NSTEMI patients, the statistical analysis of the oxidative stress also revealed an increase in the levels of IMA ($p < 0.0001$) as well as the TBARS ($p < 0.001$) and SOD enzymes ($p < 0.05$) when compared with the control group. On the other hand, a significant reduction in VIT C levels in these patients was observed.

3.2.5 Discussion

The oxidative profile in several pathologies has been widely studied and is important for site advertising signage damaging effects of ROS produced by endothelial cells during ischemia in AMI. Studies performed in our laboratory showed that the oxidative profile is altered in AMI patients (3). In the current study we verified that there is an increase in the formation of TBARS, carbonyl protein content and IMA in STEMI and NSTEMI patients. Additionally, we also found that in NSTEMI and mainly in STEMI patients the defense by VIT C was decreased, which can contribute to the severity of AMI. Interestingly, in this study there was a significant increase in the CAT enzyme activities in STEMI and NSTEMI, which is probably a reaction to protect the body in reversing the process of oxidative stress. The increase of SOD and CAT activities contribute to a better prognosis to the patients as demonstrated in patients with successful reperfusion in the first hours after thrombolysis (13,14). These results suggest that the oxidative profile generated by both terms of AMI, STEMI and NSTEMI, is similar regardless of the size of arterial occlusion generated by thrombus.

3.2.6 References

1. Pasupathi P, Rao YY, Farook J, Saravanan G. Oxidative stress and cardiac biomarkers in patients with acute myocardial infarction. *Eur J Sci Res* 2009; 27: 275-285.
2. Mastella AK, Moresco RN, Bisognin da Silva D, Becker AM, Duarte MM, Giovelli LL, et al. Evaluation of ischemia-modified albumin in myocardial infarction and prostatic diseases. *Biomed Pharmacother* 2009; 63:762–766.
3. Bagatini MD, Martins CC, Battisti V, Gasparetto D, da Rosa CS, Spanevello RM, et al. Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. *Heart Vessels* 2011; 26:55-63.
4. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N: Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 446–56.
5. Toutouzias K, Karanasos A, Tsiamis E, Riga M, Drakopoulou M, Synetos A, et al. New insights by optical coherence tomography into the differences and similarities of culprit ruptured plaque

- morphology in non-ST-elevation myocardial infarction and ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J* 2011; 161: 1192-9.
6. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. *J Emerg Med* 2000; 19:311-315.
 7. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, et al. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:331–335
 8. Galley H, Davies MJ, Webster NR. Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:139–143.
 9. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, et al. Diphenyl diselenides and ascorbic acid changes deposition of selenium and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001; 88: 119–125.
 10. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186:464–78.
 11. Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 1984;105: 121–126.
 12. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170–3175.
 13. Béard T, Carrié D, Boyer MJ, Boudjemaa B, Ferrières J, Delay M, et al. Production of oxygen free radicals in myocardial infarction treated by thrombolysis. Analysis of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1994; 87(10):1289-96.
 14. Simić D, Mimić-Oka J, Pljesa M, Milanović D, Radojević S, Ivanović B, et al. Time course of erythrocyte antioxidant activity in patients treated by thrombolysis for acute myocardial infarction. *Jpn Heart J* 2003; 44(6):823-32.

Table 1. Oxidative profile in STEMI and NSTEMI conditions and in healthy individuals.

| Parameter | Healthy (n=40) | AMI | |
|--|----------------|--------------------|--------------------|
| | | STEMI (n=30) | NSTEMI (n=16) |
| Serum | | | |
| Serum protein carbonyl (nmol/mg protein) | 0.86 (± 0.12) | 1.07 (± 0.26) ** | 0.99 (± 0.15) |
| IMA (U/mL) | 0.49(± 0.11) | 0.69 (± 0.14) *** | 0.68 (± 0.13) *** |
| Plasma | | | |
| TBARS (nmol/mL) | 7.93 (± 1.74) | 10.55 (± 4.02) ** | 11.79 (± 3.66) ** |
| VIT C (µg/mL) | 49.89(± 8.48) | 19.79 (± 11.85) ** | 37.66 (±22.80) ##* |
| Erythrocytes | | | |
| CAT (µmol H ₂ O ₂ /mL/min) | 8.46 (± 0.86) | 10.19 (± 1.84) ** | 9.49 (± 1.87) |
| SOD (µmol H ₂ O ₂ /mL/min) | 24.89 (± 3.40) | 30.72 (± 5.42) * | 29.20 (± 4.08)* |

The symbol * represents statistical difference from STEMI and NSTEMI compared to control group (*p<0.05), (**p<0.001) and (**p<0.0001). The symbol # represents statistical difference between STEMI and NSTEMI condition (## p<0.001).

4 DISCUSSÃO

O STEMI e NSTEMI apresentam uma patogenia comum que é a lesão endotelial ou ruptura da placa aterosclerótica seguida pela formação do trombo, resultando em um fluxo coronariano arterial prejudicado (VIRMANI, 2000). No entanto, nos pacientes STEMI, a artéria coronária está completamente bloqueada por um coágulo de sangue, e como resultado praticamente todo o músculo do coração atendido pela artéria afetada fica necrosado. A formação desse trombo se inicia quando ocorre lesão nas células do endotélio vascular seguida de uma resposta celular imediata no local. As células endoteliais liberam ATP e ADP e estes se ligam aos receptores da membrana das plaquetas que migram para a área de lesão e secretam várias moléculas promovendo uma superfície catalítica procoagulante (VIRMANI, 2000 e GACHET, 2006). As condições de fluxo de sangue e a velocidade de agregação das plaquetas influenciam a formação dos trombos (FALATI, 2002 e 2003). O ATP também desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias colaborando no processo aterotrombótico (LANGSTON, 2003).

Existe uma clara relação entre o aumento das atividades das enzimas ectonucleotidases e o IAM (BAGATINI, 2008; 2011). Assim a partir deste estudo, ao comparar pacientes STEMI com NSTEMI verificamos uma maior atividade da NTPDase (ecto-CD39) e 5' nucleotidase (CD73) nas plaquetas dos pacientes STEMI, onde a lesão do miocárdio é maior que em NSTEMI. Portanto, sugerimos que quanto maior a lesão no miocárdio maior será as atividades das enzimas ectonucleotidases. Esse aumento poderia estar ocorrendo como uma resposta compensatória do organismo, objetivando proteger os tecidos afetados através do aumento da hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, resultando na formação de adenosina (BAKKER et al., 1994; ZIMMERMANN, 1999). A adenosina modula o tônus vascular, inibe a agregação plaquetária e aumenta a tolerância do miocárdio contra a isquemia e reperfusão (RIKSEN et al., 2008). Entretanto, não foi observado o aumento na expressão da enzima NTPDase, provavelmente pelo número reduzido de amostras analisadas.

No STEMI a artéria afetada bloqueia a passagem do sangue para uma grande extensão do miocárdio e conseqüentemente a hipóxia e isquemia tecidual é maior e estimula a liberação de ambos, adenosina e fatores angiogênicos, e também modula a expressão de receptores (A2B) de adenosina nas células endoteliais musculares esqueléticas (FEOKTISTOV, 2004). Neste estudo, observamos em pacientes STEMI uma maior atividade da ADA que nos pacientes NSTEMI, sugerindo que conseqüentemente esta havendo uma maior hidrólise de

adenosina nesses pacientes. Durante a hipóxia e a isquemia, o organismo induz o aumento do nível de adenosina extracelular que é importante para contrabalancear a isquemia via propriedades de vasodilatação e antiinflamatória (FEOKTISTOV, 2004). No entanto, uma elevação persistente de adenosina promove efeitos citotóxicos a vários tipos celulares (ELTZSCHIG et al., 2006), simultaneamente o organismo compensa as influências prejudiciais induzindo o aumento dos níveis da ADA que esta acoplada a superfície da membrana celular pela CD26, como parte de uma resposta adaptativa, eliminando a adenosina (ELTZSCHIG et al., 2006).

A hipóxia após o bloqueio arterial está relacionada à geração de EROS que são produzidos durante a fase de reperfusão/isquemia e exercem efeitos tóxicos para componentes celulares (ESPAT, 2000). Verificamos neste estudo que o perfil oxidante entre os grupos STEMI e NSTEMI não diferem entre si. Adicionalmente, estes dados estão de acordo com estudos anteriores, que verificaram o aumento de TBARS, IMA e da proteína carbonil nos pacientes STEMI quando comparados aos controles (PANTK, 1999, BAR-OR, 1999 & BAR-OR et al., 2000, MASTELA, 2009). O TBARS aumenta pela peroxidação lipídica (DREHER, 1996) que é uma consequência do estresse oxidativo, o qual ocorre quando o balanço dinâmico entre o mecanismo pró e antioxidante, está em desequilíbrio (LEOPOLD e LOSCALZO, 2009), demonstrando que o estresse oxidativo tem um papel central nesse processo.

Em condições fisiológicas normais, os níveis de EROS que são eliminados pelas enzimas SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase), que são antioxidantes enzimáticos, (BARREIROS, 2006) estão em equilíbrio. No entanto, na ocorrência do IAM o equilíbrio entre o sistema antioxidante e oxidante ficam alterados (BAGATINI, 2011). Neste estudo, encontramos uma diferença significativa da atividade enzimática de CAT e SOD entre os grupos STEMI quando comparados aos controles. Este processo pode ocorrer nas células submetidas ao estresse oxidativo do IAM onde a interrupção do fluxo sanguíneo normal atinge uma grande área do miocárdio, refletindo uma tentativa do organismo para eliminar os radicais de oxigênio e diminuir danos celulares por EROS. Adicionalmente, encontramos níveis menores de VIT C, que é um antioxidante não enzimático, nos pacientes STEMI comparando com os pacientes NSTEMI, e aos controles. Isto pode se dar em circunstâncias fisiopatológicas onde um excesso de oxidantes, pode sobrecarregar a capacidade de eliminação dos sistemas antioxidantes celulares, causando muitos processos patológicos, incluindo inflamação, disfunção celular e dano tecidual (LEOPOLD e LOSCALZO, 2009)

favorecendo ao desequilíbrio redox nestes pacientes.

As proteínas são as primeiras moléculas biológicas afetadas pelo estresse oxidativo e este dano pode ser medido pelo conteúdo de proteína carbonil e a IMA (MAYNARD et al., 2009; BAGATINI et al., 2010), que são produzidas por modificações na estrutura básica da proteína provocados por EROS que estão em desequilíbrio com o sistema antioxidante (PASUPATHI, 2009). As EROS geradas pela isquemia reduzem a habilidade da albumina de se ligar a metais, resultando na IMA (MASTELLA, 2009). No entanto, a IMA apresenta uma depuração rápida e uma janela de tempo estreita para o diagnóstico de IAM (HJORTSHØJ S, 2009), mas a ausência de níveis elevados de IMA pode ser útil para descartar qualitativamente isquemia cardíaca (CHEK, 2011).

De acordo com os resultados encontrados neste estudo verificamos que os níveis de IMA estavam aumentados nos pacientes STEMI e NSTEMI, confirmando a formação da IMA no processo isquêmico e inflamatório que ocorre no IAM (BAR OR, 2001; ROY, 2006). No entanto, a formação de IMA não pode ser utilizada para avaliar a extensão da isquemia (HJORTSHØJ S, 2010) porque não é específica para o tecido cardíaco, confirmada neste estudo pelo aumento da IMA em ambas as condições STEMI e NSTEMI. Portanto, não é útil para diferenciar STEMI do NSTEMI.

5 CONCLUSÃO

- Estes dados sugerem que os danos celulares em pacientes STEMI provocam um aumento mais pronunciado na atividade das enzimas ectonucleotidasas do que em pacientes NSTEMI, sugerindo que quanto maior a lesão do miocárdio maior é a atividade das enzimas ectonucleotidasas.
- Os resultados desse estudo demonstraram um aumento dos níveis de TBARS, proteína carbonil, IMA, nos pacientes STEMI, sugerindo que nesses pacientes a produção de EROS são maiores que nos controles. No entanto, quando comparamos STEMI com NSTEMI sugerimos que em ambos os casos está ocorrendo formação semelhante de EROS, independentemente do tamanho da lesão cardíaca, portanto não diferenciam a condição STEMI da condição NSTEMI.
- Verificamos que houve um aumento das atividades de CAT e SOD nos pacientes STEMI, sugerindo que nesses pacientes a tentativa do organismo de restabelecer o equilíbrio são maiores que nos controles.
- Os níveis de VIT C foram menores nos pacientes STEMI quando comparados com os pacientes NSTEMI e controles, sugerindo menor proteção para estes pacientes ou o esgotamento após cumprir sua função de defesa contra EROS.

6 REFERÊNCIAS

AARON, J. et al. Metabolic Control of Excessive Extracellular Nucleotide Accumulation by CD39/Ecto-Nucleotidase-1: Implications for Ischemic Vascular Diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.305, n.1, p.9-16, 2003.

ADAMS, A.; HARKENS, R. A. Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues. **Clinical Experimental Immunology**, v. 26, p. 647-649, 1976.

ALTMAN, R. et al. Thrombosis y hemostasia. **Revista Iberoamericana**, v.3, p. 20-21,1995.

ANTMAN, E. M.; BRAUNWALD, E. **Acute myocardial infarction – Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine**, 6th edition, HIE Saunders; 2002.

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

BAGATINI, M.D. et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1181-1185, 2008.

BAGATINI, M.D. et al. Oxidative stress versus antioxidant defenser in patients with acute myocardial infarction. **Heart Vessels**, DOI: 10.1007/s00380-010-0029-9, p. 93-101, 2010.

BARANKIEWICZ, J. et al. Regulation of adenosine concentration and cytoprotective effects of novel reversible adenosine deaminase inhibitors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, p. 1230–1238, 1997.

BAR-OR, D. et al. Reduction in the cobalt binding capacity of human albumin with myocardial ischemia. **Annals of Emergency Medicine**, v. 43, p.56, 1999.

BAR-OR, D.; Lau, E.; Winkler, J.V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. **New England Journal of Medicine**, v.19, p.311-5, 2000.

BAR-OR, D. et al. Characterization of the Co(2+) and Ni(2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n.1, p.42–47, 2001.

BAR-OR, D. et al. The cobalt-albumin binding assay: insights into its mode of action. **Clinica Chimica Acta**, v. 387, p.1–2, 2008.

BARREIROS, L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relacao entre geracao de especies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 1, p. 113-123, 2006.

BOLDT, J. Use of albumin: an update. **Brithish Journal of Anaesthesia**, v. 104, n. 4, p. 287-84, 2010.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady–state levels os reactive oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, gene expression and cellular function**. Marcel Decker: New York, v. 105, p. 1-25,1997.

BRASIL-Ministério da Saúde – Fonte: MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM - Dados preliminares. **Doenças do aparelho circulatório**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/consulta_cardio_062011.pdf>. Acesso em: 12 de janeiro de 2012.

BRASIL-Ministério da Saúde – Fonte: MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM - Dados preliminares. **Doenças do aparelho circulatório**. Situação da base nacional em 24/11/2011. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/pobt10uf.def>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2012.

CASTRO, et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CHAN, B. et al. Site-specific N-terminal auto-degradation of human serum albumin. **European Journal of Biochemistry**, v. 227, p. 524-528, 1995.

CHAVAN, V; PATIL, N; KARNIK, N.D. Study of leukocytic hydrolytic enzymes in patients with acute stage of coronary heart disease. **Indian Journal of Medical Science**, v. 61, n. 2, p.67-8, 2007.

CHEK, J, et al. Role of ischemia-modified albumin in estimating the extent and scope of cardiac ischemia in patients with ST elevation myocardial infarction. **Heart Vessels**, DOI 10.1007/s00380-010-0114-0, 2011.

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

CORREA, C. et al. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 317- 324, 2008.

DUARTE, M.M.F. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS Journal**, v. 274, p. 2707-2714, 2007.

ELTZSCHIG, H. K. et al. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium:role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v.198, p.783-796, 2003.

ELTZSCHIG, H. K. et al. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. **Blood**, v.104, p. 3986-3992, 2004.

ELTZSCHIG, H. K. et al. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. **Blood**, v. 108, p. 1602-1610, 2006.

ENJYOJI, K. et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v.5, p.1010 –1017, 1999.

ESPAT, N.J.; NELTON, W.S. Oxygen free radicals, oxidative stress, and antioxidants in critical illness. **Support Line**, v.22, p.11–20, 2000.

FALATI, S. et al. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. **Nature Medicine**, v. 8, p.1175-1181, 2002.

FALATI, S. et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p.1585–1598, 2003.

FARBER, J.L.; KYLE, M.E., COLEMANN, J.B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory Investigation**, v. 62, p. 670-678, 1990.

FENG, Y. et al. Prolonged pain to hospital time is associated with increased plasma advanced oxidation protein products and poor prognosis in patients with percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction. **Heart Vessels**, v. 25, p. 374–378, 2010.

FEOKTISTOV, I. et al. Hypoxia Modulates Adenosine Receptors in Human Endothelial and Smooth Muscle Cells Toward an A_{2B} Angiogenic Phenotype. **Hypertension**, v.44, p. 649-654, 2004.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v.52, p. 283-294, 1997.

GACHET, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.46, p. 277-300, 2006.

GASE, C. D. Ischemia Modified Albumin: a Novel Biomarker for the Detection of Cardiac Ischemia. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.24, n.4, p. 333–341, 2009.

GOMES, F. et al. Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.2, doi.org/10.1590/S0066-782X2010000200021, 2010.

GUAN, Z.; INSCHO, E. W. Role of Adenosine 5'-Triphosphate in Regulating Renal Microvascular Function and in Hypertension. **Hypertension**, v. 55, p.333-340, 2011.

GUSTAFSON, L.A. et al. Increased hypoxic stress decreases AMP hydrolysis in rabbit heart. **Cardiovascular Research**, v.44, n. 2, p.333-43, 1999.

HALLEN, J. Troponin for the Estimation of Infarct Size: What Have We Learned? **Cardiology**, v.121, p.204–212, 2012.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1685–95, 2005.

HARRISON **medicina interna**/ editores Dennis L. Kasper, et al. 16 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. Interamericana do Brasil Ltda. 2006.

HEADRICK, J. P.; HACK, B.; ASTHTON, K. J. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. **American Journal Physiology**, v. 285, p.H1797–H1818, 2003.

HEEMSKERK, J. W. *et al.* Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 15, n. 3, p. 86-92, 2005.

HERRMANN, J.L.V.; SOUZA, J.A.M. “Check-up” Cardiologico: avaliação clinica e fatores de risco. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 16, p. 127-137, 2006.

HJORTSOJ, S. *et al.* Kinetics of ischemia modified albumin during ongoing severe myocardial ischemia. **Clinical Chimica Acta**, v. 403, p.114–120, 2009.

HJORTSHØJ S, DETHLEFSEN C, KRISTENSEN SR, RAVKILDE J. Determinants of the release pattern of ischaemia-modified albumin in acute ST-elevation myocardial infarction treated with primary PCI. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**. v. 70,n. 4, p.244-51, 2010.

IWAKI-EGAWA, S.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. **Biological Chemistry**, v. 387; p. 319-321, 2006.

JYOTHY, A. *et al.* Serum Adenosine Deaminase Activity in Myocardial Infarction. **International Journal of Human Genetics**, v.3, n.1, p. 65-67, 2003.

KACZMAREK, E. *et al.* Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.51, p.33116-33122, 1996.

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

KEELEY, E.; HILLIS, D. Primary PCI for myocardial infarction with ST-segment elevation. **New England Journal of Medicine**, v. 356, p.47–54, 2007.

KÖHLER, D. *et al.* CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. **Circulation**, v.116, p.1784-1794, 2007.

KOSZALKA, P. et al. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. **Circulation Research**, v.95, p.814–821, 2004.

KOZIAK, K. et al. Overexpression of CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 decreases smooth muscle cell proliferation and prevents neointima formation after angioplasty. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, p.1191–7, 2008.

KRIZ, N.; RINDER, C. S.; RINDER, H.M. Physiology of Hemostasis: With Relevance to Current and Future Laboratory Testing. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 29, p. 159-174, 2009.

LANGSTON, H. P. et al. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal of Immunology**, v. 170, p.2962-2970, 2003.

LEAL, D.B.R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9– 15, 2005.

LEOPOLD, J.A; LOSCALZO, J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1673 – 1706, 2009.

LEGATTI, J. B. CURSO BÁSICO DE ELETROCARDIOGRAFIA EM 10 LIÇÕES. In: <http://www.oocities.org/edu043869/Eletrocardiografia.pdf>. Acesso in 28/04/2012.

LIBBY, P. **Braunwald – Tratado de doenças cardiovasculares**. Rio de Janeiro, Elsevier 2010. p.1003-1026.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection. **Annual Review of Pharmacology Toxicology**, v. 41, p. 775-787, 2001.

LORENZI, T.F. et al. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3^a ed., Ed. Medsi., Rio de Janeiro, 2003.

LUNKES, G. I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, **Thrombosis Research**, v. 109, p. 189– 94, 2003.

LUNKES, G. I. et al. Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.8, p. 351–357, 2008.

LUTHJE, J. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. **Klinische Wochenschrift**, v. 67, p. 317–27, 1989.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **Journal Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MARCUS, A. J. et al. Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, p. 2497– 2509, 2003.

MASTELLA, A.K. et al. Evaluation of ischemia-modified albumin in myocardial infarction and prostatic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 762e766, 2009.

MAYNARD, S. et al. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. **Carcinogenesis**, v. 30, n.1, p. 2-10, 2009.

MENDEZ, C. M.; MCCLAIN, C.J.; MARSANO, L.S. Albumin therapy in clinical practice. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 20, p.314-20, 2005.

MONTALESCOT, G. et al. STEMI and NSTEMI: are they so different? 1 year outcomes in acute myocardial infarction as defined by the ESC/ACC definition (the OPERA registry). **European Heart Journal**, v. 28, p.1409-17, 2007.

NAGESWARA, R. et al. Oxidative Stress and Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, p. 29-38, 2005.

NICOLAU, J.C; MARIN NETO, J.Á, editores. Síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis. São Paulo: Atheneu; 2001.

PANTKE, U. et al. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, n. 9-10, p.1080–1086, 1999.

PASUPATHI P, RAO YY, FAROOK J, et al. Oxidative stress and cardiac biomarkers in patients with acute myocardial infarction. **European Journal of Scientific Research**, v. 27, p. 275-285, 2009.

PIEGAS, L.S. et al. AFIRMAR study investigators. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. **American Heart Journal**, v.146, p.331-8, 2003.

PIEGAS, L.S. et al. III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.83, n.4, suppl. 4, p. 1-86, 2004.

PINSKY, D.J. et al. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. **Journal of Clinical Investigation**, v.109, p.1031–1040, 2002.

POLANCZYK, C.A. Cardiovascular risk factors in Brazil. The next 50 years! **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p. 199-201, 2005.

RIKSEN, N.P. et al. Human in vivo research on the vascular effects of adenosine. **European Journal of Pharmacology**, v.585, n. 2, p. 220-7, 2008.

ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, p. 189-197, 2004.

ROCHA, V.Z.; LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 399-409, 2009.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis—An update, **New England Journal of Medicine**, v.314, n. 8, p.488–500 (Review), 1986.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. **Nature**, v. 362, p. 801-9, 1993.

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v.340, p.115, 1999.

ROY, D. et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischemia modified albumin. **Heart**, v.92, p.113–114, 2006.

SANTOS, N.S.J. et al. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, n. 3, p.339-49, 2004.

SERRANO, C.V.; SOUZA, J.A.; PAIVA, M.S.M.O. Fatores desencadeantes da instabilização da placa aterosclerótica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 4, p. 724-32, 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.

SHUVAEV, V. V.; MUZYKANTOV, V. R.. Targeted modulation of reactive oxygen species in the vascular endothelium. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n.1, p. 56-63, 2011.

SIMIĆ, D. et al. Time course of erythrocyte antioxidant activity in patients treated by thrombolysis for acute myocardial infarction. **Japanese Heart Journal**, v. 44, n.6, p.823-32, 2003.

SINHA, M.K. et al. Role of "Ischemia Modified Albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia. **Emergency Medicine Journal**, v. 21, p. 29-34, 2004.

TORRES, B. B. Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

TSUBOI, I. et al. Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 and human immunodeficiency virus type 1 infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 1995.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical and Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANNI, D.S. et al. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 43, n.3, p. 181- 189, 2007.

VAN DE WERF F, ARDISSIMO D, BETRIU A, COKKINOS DV, FALK E, FOX KA, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. ESC task-force report. **European Heart Journal**. v. 24, p.28-66, 2003.

VIRMANI R, KOLODGIE FD, BURKE AP, FARB A, SCHWARTZ SM. Lessons from sudden coronary death: A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v.20, p. 1262–1275, 2000.

VASCONCELOS, L.M.S; et al. Espécies reativas de Oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

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

YIP, J. *et al.* Primary platelet adhesion receptors. **International Union of Biochemistry and Molecular Life**, v.57, n. 2, p. 103-8, 2005.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINE, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**, São Paulo, Ed. Atheneu. 2001.

ZAPICO-MUNIZ, E. Ischemia modified albumin during skeletal muscle ischemia. **Clinical Chemistry**, v.5, p.1063–1065, 2004.

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

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