

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NUCLEOTIDASES E
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES
COM ESCLEROSE MÚLTIPLA E EM MODELO EXPERIMENTAL
DE DESMIELINIZAÇÃO EM RATOS**

TESE DE DOUTORADO

ROSELIA MARIA SPANEVELLO

Porto Alegre, RS, Brasil

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NUCLEOTIDASES E PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA E
EM MODELO EXPERIMENTAL DE DESMIELINIZAÇÃO EM RATOS**

ROSELIA MARIA SPANEVELLO

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Henrique e Assunta Spanevello por serem a coisa mais importante da minha vida.....

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por sempre ter me dado força, coragem e determinação para trilhar meu caminho para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus pais Henrique e Assunta pessoas que eu sei que muitas vezes sempre abriram mão dos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus, não tenho palavras para agradecer o amor, o carinho, a compreensão e as novenas da mãe.

Aos meus irmãos Olmar, Rose, Mari e Marizete, vocês simplesmente são tudo para mim, obrigada pela força, atenção, carinho e ajuda, tenho certeza que no mundo não existem irmãos como vocês.

A minha orientadora Maria Rosa, muito obrigada não só pela contribuição neste trabalho, mas, também por ser esta pessoa maravilhosa sempre preocupada e atenciosa. Este espaço com certeza é pequeno demais para deixar todo o meu carinho e agradecimento.

A querida professora Vera, obrigada pelos seus ensinamentos, sua disposição e por estar do meu lado em mais uma etapa.

A Cíntia, minha irmã mineira, com certeza jamais conseguirei te agradecer por tudo que sempre fez por mim....mas quero te agradecer em especial pela grande contribuição que sempre fez em meus trabalhos e por estar sempre do meu lado, me apoiando sempre em todos os momentos da minha vida. Agradeço todos os dias por ter essa amizade tão maravilhosa.

Ao professor Alexandre Mazzanti, obrigada pelo auxílio na parte experimental deste trabalho.

Aos meus amigos queridos Roberta, Naiara e Jessié, nem preciso dizer o quanto a amizade de vocês significa para mim, muito obrigada mesmo por estarem sempre comigo e pelo grande auxílio na realização deste trabalho.

As farmacêuticas Margarete, Maísa e Viviane quero agradecer pela amizade e pela disponibilidade que sempre tiveram para a realização das coletas. E as minhas amigas Cíntia, Elisa e Adri obrigada por sempre estarem me dando apoio e principalmente por agüentar minhas “angústias bioquímicas”; e aos demais amigos e colegas do Laboratório de Enzimologia Toxicológica, Lara, Jeandre, Jamile, Rosilene, André, Gustavo, Caroline, Jucimara, muito obrigada por todo o carinho e ajuda.

À UFRGS e ao curso de Doutorado em Bioquímica pela oportunidade e a CAPES pela bolsa concedida.

Aos professores Lisiane Porciúncula, Vânia Lúcia Loro e Juliano Ferreira obrigada por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese.

Quero agradecer de uma forma muito especial aos portadores de Esclerose Múltipla. Primeiramente obrigada pela grande contribuição de vocês neste trabalho, mas, além disso, tenho que agradecer também todos os ensinamentos que tive durante nosso tempo de convivência. Vocês se tornaram para mim um exemplo de vida e de determinação e me fazem lembrar todos os dias que os problemas que temos são muito insignificantes perto do dom maravilhoso que a vida. Hoje muitos de vocês são meus grandes amigos e ocupam um lugar imenso no meu coração. Espero poder estar sempre junto de vocês lutando por ideais que acreditamos que irá melhorar a qualidade de vida de pessoas que sofrem com esta doença chamada Esclerose Múltipla.

"Seria maravilhoso não ter que encontrar dificuldades, no entanto da mesma forma que os exames estimulam os estudos de uma pessoa, sem as dificuldades não pode haver progresso ou desenvolvimento. Não agir pelo bem é o mesmo que corresponder ao mal. Não avançar é o mesmo que retroceder. Fugir perante a luta é o mesmo que abandonar a fé. Enquanto mantiverem a esperança, enquanto empreenderem ações corajosas para lutar, podem estar certos de que a primavera irá chegar novamente"

(Daisaku Ikeda)

Apresentação

Este trabalho consiste na tese de doutorado intitulada “Avaliação da atividade de nucleotidasas e parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com esclerose múltipla e em modelo experimental de desmielinização em ratos”. O trabalho apresenta-se estruturado em três partes como se segue: resumo, introdução e objetivos (parte I); manuscrito e artigos (parte II); discussão, conclusões, referências e anexos (parte III).

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de manuscrito e artigos e os itens discussão e conclusão apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito e os artigos contidos neste trabalho.

As referências bibliográficas referem-se somente as citações que aparecem nos itens introdução e discussão dessa tese.

Nos anexos encontram-se a carta de aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Santa Maria, bem como o termo de consentimento utilizado na realização dos trabalhos envolvendo os portadores de Esclerose Múltipla.

ÍNDICE

PARTE I

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
LISTA DE ABREVIATURAS	03
1. INTRODUÇÃO.....	04
1.1 Esclerose Múltipla	04
1.1.1 Histórico	04
1.1.2 Conceito e Etiologia	05
1.1.3 Epidemiologia	06
1.1.4 Sintomatologia	06
1.1.5 Formas de Esclerose Múltipla	07
1.1.6 Diagnóstico	08
1.1.7 Tratamento	09
1.1.8 Modelos Experimentas de Desmielinização	11
1.1.8.1 Modelo Experimental de Desmielinização pelo Brometo de Etídio	11
1.2 Esclerose Múltipla e o Sistema Imune e Nervoso.....	12
1.3 Esclerose Múltipla e o Sistema Vascular	14
1.4 Sistema Purinérgico	15
1.4.1 Nucleotídeos e Nucleosídeos de Adenina	16
1.4.2 Receptores Purinérgicos	17
1.4.3 Enzimas que Degradam Nucleotídeos e Nucleosídeos de Adenina	18
1.4.3.1 NTPDase e 5'-Nucleotidase.....	19
1.4.3.2 Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP)	21

1.4.3.3 Adenosina deaminase (ADA)	23
1.5 Estresse Oxidativo.....	24
1.5.1 Radicais Livres e defesas antioxidantes.....	24
1.5.2 Estresse oxidativo e a Esclerose Múltipla.....	26
OBJETIVOS.....	29
PARTE II	
CAPÍTULO 1.....	31
CAPÍTULO 2.....	58
CAPÍTULO 3.....	66
PARTE III	
DISCUSSÃO	74
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	86

Resumo

A esclerose múltipla (EM) é a principal doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), sendo considerada a principal causa de incapacidade neurológica em adultos jovens. Além das alterações imunes, neurológicas e vasculares que são encontradas na EM, tem sido postulado que o estresse oxidativo pode estar envolvido na patogênese desta doença. Os nucleotídeos ATP, ADP e o nucleosídeo adenosina são importantes moléculas capazes de modular vários processos biológicos incluindo trombo-regulação, inflamação e neurotransmissão. O controle dos níveis extracelulares destas moléculas e a conseqüente sinalização purinérgica por elas induzida é realizada por uma variedade de enzimas como as NTPDases (Nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolase), E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases), 5'-nucleotidase e a adenosina deaminase (ADA). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade destas ectoenzimas em linfócitos e plaquetas de pacientes com a forma surto remissão da EM (SREM) e o papel da NTPDase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas e plaquetas bem como a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em ratos submetidos à desmielinização experimental pelo brometo de etídio (BE) e tratados com vitamina E. Os resultados obtidos demonstraram alterações na atividade das ectoenzimas em linfócitos e plaquetas de pacientes com SREM. Em linfócitos foi observado um aumento na atividade e expressão da NTPDase e uma diminuição na atividade da ADA em pacientes com SREM quando comparados com o grupo controle. Uma diminuição na atividade e expressão da NTPDase, bem como uma diminuição na atividade das enzimas E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA foi observada em plaquetas de pacientes com SREM quando comparadas com indivíduos saudáveis. Em relação ao modelo experimental os resultados demonstraram que em ratos submetidos à desmielinização por BE ocorreu um aumento na atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase tanto em sinaptossomas quanto em plaquetas. Quando ratos desmielinizados foram tratados com vitamina E este composto foi capaz de reverter o aumento da NTPDase, entretanto a atividade da 5'-nucleotidase permaneceu aumentada em sinaptossomas e plaquetas quando comparado com o grupo controle. Além disso, foi observado também que parâmetros de estresse oxidativo como o conteúdo de TBARS e tióis não protéicos foram encontrados aumentados e a atividade da catalase estava diminuída em ratos desmielinizados pelo BE, sendo que o tratamento com vitamina E foi capaz de reverter estas alterações ao nível do grupo controle. Os resultados descritos aqui sugerem que as ectoenzimas estão envolvidas na modulação de respostas imunes, vasculares e neurológicas possuindo assim um papel relevante tanto na EM quanto em modelos experimentais de desmielinização. Além disso, a vitamina E pode interferir com a hidrólise dos nucleotídeos de adenina bem como o estresse oxidativo durante um evento desmielinizante sugerindo assim, que este composto pode ser importante no tratamento de patologias desmielinizantes com a EM.

Palavras chave: esclerose múltipla, ectoenzimas, linfócitos, plaquetas, desmielinização, vitamina E.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is the main demyelinating disease of the central nervous system (CNS). It is the most common cause of neurological disability among young adults. Immune, neurological and vascular alterations are found in MS and it has been postulated that oxidative stress may be involved in the pathogenesis of this disease. The nucleotides ATP, ADP and nucleoside adenosine are important molecules that modulate several biological processes including thromboregulation, inflammation and neurotransmission. The control of extracellular levels of these molecules and consequent purinergic signaling induced by them is controlled by a variety of enzymes such as NTPDases (Nucleotide Triphosphates Diphosphohydrolase), E-NPPs (Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterases), 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA). Therefore, the objective of this study was to evaluate the activity of these ectoenzymes in lymphocytes and platelets of patients with the relapsing - remitting form of MS (RRMS) as well as the role of NTPDase and 5'-nucleotidase in synaptosomes and platelets and oxidative stress parameters in rats subjected to experimental demyelination with ethidium bromide (EB) and treated with vitamin E. The results showed changes in ectoenzyme activities in lymphocytes and platelets of RRMS patients. In lymphocytes, an increase in NTPDase activity and expression along with a decrease in ADA activity was observed in patients with RRMS when compared with the control group. A decrease in NTPDase activity and expression and a decrease in E-NPP, 5'-nucleotidase and ADA activities was observed in platelets of RRMS patients when compared with healthy subjects. As for the experimental model, the results showed that rats subjected to demyelination by EB demonstrated increased NTPDase and 5'-nucleotidase activities in both synaptosomes and platelets. When demyelinated rats were treated with vitamin E this increase in NTPDase was reversed, however 5'-nucleotidase activity remained increased in synaptosomes and platelets when compared with the control group. Furthermore, we observed that oxidative stress parameters such as TBARS content and non-protein thiols were increased and catalase activity was decreased in demyelinated rats and that treatment with vitamin E reversed these changes in the control group. The results reported here suggest that ectoenzymes are involved in the modulation of immune, vascular and neurological responses, thus having an important role both in MS and in experimental models of demyelination. Moreover, vitamin E may interfere with the hydrolysis of adenine nucleotides and oxidative stress during a demyelinating event which suggests that this compound could be important in the treatment of demyelinating diseases such as MS.

Key words: multiple sclerosis, ectoenzymes, lymphocytes, platelets, demyelination, vitamin E.

Lista de abreviaturas

- ADA** - adenosina deaminase
- ADP** - adenosina difosfato
- AMP** - adenosina monofosfato
- ATP** - adenosina trifosfato
- BE** - brometo de etídio
- EM** - esclerose múltipla
- E-NPP** - ecto -nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases
- NTPDases** - nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases
- ERNs** - espécies reativas de nitrogênio
- EROs** - espécies reativas de oxigênio
- IFN γ** - interferon gama
- IFN β** - interferon beta
- IFN- β 1a** - interferon beta 1a
- IFN- β 1b** - interferon beta 1b
- IL2** - interleucina 2
- OPCs** - células progenitoras de oligodendrócitos
- PPEM** - forma progressiva primária da esclerose múltipla
- PSEM** - forma progressiva secundária da esclerose múltipla
- SNC** - sistema nervoso central
- SREM** - forma surto-remissão da esclerose múltipla
- TNF α** - fator de necrose tumoral alfa
- TBARS** - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

1. Introdução

1.1 Esclerose Múltipla

1.1.1 Histórico

A história oficial da Esclerose Múltipla (EM) iniciou-se em meados do século XIX, quando Robert Carswell e Jean Cruveilhier iniciaram seus primeiros relatos sobre uma nova doença. Em 1837, Carswell durante um exame post mortem, encontrou estranhas lesões na medula espinhal de um indivíduo e em 1838, Cruveilhier publicou quatro casos associando os achados histopatológicos e clínicos dos pacientes e já chamando a atenção para a característica intermitente da doença (Compston et al., 2005).

Em 1868, o mérito das descrições clínicas e anatômicas detalhadas da doença foi atribuído ao neurologista Jean Charcot que foi o primeiro a estabelecer ligações definitivas entre a sintomatologia e as alterações patológicas do sistema nervoso observadas nas amostras post mortem. A condição clínica foi descrita por Charcot como "esclerose em placas" e a EM reconhecida como doença distinta para a medicina (Compston et al., 2005).

Em 1884, Pierre Marie proporcionou o próximo grande passo na história da EM ao sugerir pela primeira vez que a doença poderia ser causada por um agente infeccioso. Esta observação foi reforçada em 1935 por Thomas Rivers mediante a produção de um modelo experimental denominado encefalomielite alérgica experimental e por Elvin Kab em 1949, o qual demonstrou um aumento de imunoglobulina no líquido de pacientes com EM, confirmando assim, um componente imunológico nesta patologia (Moreira et al., 2002).

Ao longo do século XX até a atualidade as pesquisas realizadas buscam ainda compreender por que o sistema imunológico gera essa resposta

inadequada na EM levando à desmielinização. Neste contexto, pode-se concluir que a história da EM revela em seu curso muitas incertezas, erros e frustrações. Sua riqueza, no entanto, se destaca pela genialidade de alguns, pela capacidade científica de outros e principalmente, pelo ímpeto de trabalho de muitos para diminuir o sofrimento do próximo (Moreira et al., 2002). Atualmente, a EM é uma das doenças neurológicas de maior pesquisa científica em todo o mundo e o progresso obtido em seu conhecimento e tratamento nos últimos anos justificam grande otimismo.

1.1.2 Conceito e Etiologia

A EM é uma doença inflamatória do sistema nervoso central (SNC) caracterizada pela localização de múltiplas placas de desmielinização na substância branca encefálica e medular (Compston & Coles, 2008; Trapp & Nave, 2008; Hart et al., 2009). Estas lesões à bainha de mielina levam a deficiência ou completa perda da transmissão do impulso nervoso causando assim sinais e sintomas neurológicos intermitentes que com a evolução da doença podem agravar-se progressivamente (Kalb, 2000; Fox et al., 2006).

Os aspectos etiológicos da EM ainda constituem o alvo principal de exaustivos estudos, entretanto a hipótese patogênica mais aceita é que a EM seja fruto de uma predisposição genética associada a um fator ambiental desconhecido que, ao se apresentarem num mesmo indivíduo originariam uma disfunção no sistema imune (Moreira et al., 2000; Compston & Coles, 2008). Esta disfunção mantém células T ativadas, as quais atravessam a barreira hematoencefálica e desenvolvem uma ação lesiva contra a mielina e os oligodendrócitos ocasionando uma deficiência na condução do impulso nervoso com conseqüente aparecimento dos sintomas (Kalb, 2000).

1.1.3 Epidemiologia

A EM afeta adultos jovens na faixa etária de 20 - 40 anos sendo a incidência maior no sexo feminino e na raça branca (Kalb, 2000). É considerada rara entre orientais, negros e índios; entretanto, alguns trabalhos demonstraram uma porcentagem significativa da presença de EM em indivíduos de etnia negra (Moreira et al., 2000; Grzesiuk, 2006).

Geograficamente a EM incide com maior prevalência em populações localizadas em zonas de clima temperado sendo considerada áreas de alta prevalência aquelas com número de casos acima de 30/100000 habitantes, média prevalência com números de casos entre 5 a 30/100000 habitantes e baixa prevalência com números de casos inferior a 5/100000 habitantes (Reipert, 2004). O Brasil é considerado um país de baixa prevalência da EM, entretanto estudos apontam que casos desta doença são observados na quase totalidade do território brasileiro (Moreira et al., 2000; Arruda et al., 2001; Ferreira et al., 2004, Cardoso et al., 2006; Grzesiuk, 2006). Por ser uma doença que afeta adultos jovens a EM, traz consigo, uma grande sobrecarga econômica à sociedade devido a perda da força de trabalho e do elevado custo de tratamento, além do sofrimento individual e familiar associado ao curso prolongado desta doença.

1.1.4 Sintomatologia

Os sintomas da EM variam muito dependendo de quais regiões do SNC são afetadas pela desmielinização (Reipert, 2004). Os sintomas mais comuns compreendem distúrbios visuais como visão embaçada e diplopia; distúrbios relacionados a perda de equilíbrio e coordenação e parestesias descritas como “formigamento” ou “adormecimento” podendo estar acompanhadas de

hipoestesia de um dos membros (Kalb, 2000; Fox et al., 2006). Além disso, a fadiga também é considerada um dos sintomas mais comuns e costuma ser excessiva, sobretudo no calor (Oliveira & Souza, 1998). Outros sintomas que podem estar presentes na EM incluem o comprometimento esfinteriano que apresenta-se na forma de incontinência ou retenção urinária e fecal, disfunção sexual e alterações cognitivas (Kalb, 2000). Entretanto, o surgimento e a severidade de todos estes sintomas descritos podem variar de acordo com o curso clínico da doença (Kalb, 2000; Oliveira & Souza, 1998).

1.1.5 Formas de Esclerose Múltipla

O curso clínico da EM pode assumir três formas principais: surto remissão (SREM), progressiva secundária (PSEM) e progressiva primária (PPEM) (Wakerley et al., 2008). A maioria dos pacientes com EM (85%) inicia o seu quadro clínico com a forma SREM a qual é caracterizada por uma série de relapsos seguido pelo completo ou parcial desaparecimento dos sintomas. Denomina-se surto ou relapso a ocorrência aguda de sintomas como resultado de episódios de inflamação no SNC, com a duração de pelo menos 24 horas, podendo ocorrer separados por semanas, meses ou anos (Reipert, 2004).

Com o passar do tempo à forma SREM evolui para a forma PSEM onde a recuperação dos sintomas torna-se incompleta, originando uma deterioração progressiva da condição física ao longo do tempo (Reipert, 2004). A forma menos comum é a PPEM que atinge cerca de 10 a 20% dos pacientes que é caracterizada desde o início pela gradual progressão da doença sem surtos ou remissões, envolvendo um declínio das habilidades físicas dos pacientes ao longo do tempo (Reipert, 2004; Wakerley et al., 2008) (Figura 1).

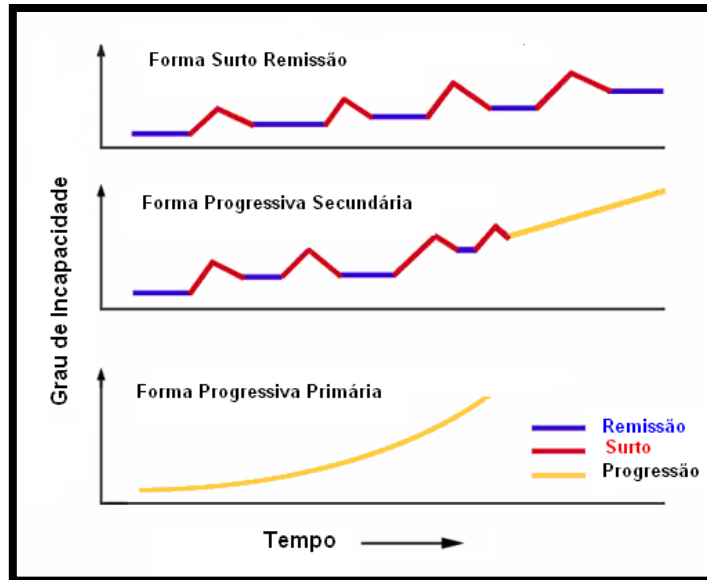


Figura 1- Formas da Esclerose Múltipla (<http://library.med.utah.edu/kw/ms>).

1.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico das formas clínicas da EM é realizado com base no histórico do paciente e com o suporte dos exames de líquido, potencial evocado visual, auditivo e somatosensorial, ressonância magnética de crânio e medula, excluindo-se outras doenças de natureza inflamatória (Walkerley et al., 2008).

Primeiramente o neurologista faz um levantamento do histórico do paciente incluindo queixas passadas e presentes e história familiar. Além disso, o médico pode realizar também testes simples para avaliar fraqueza, coordenação motora e alterações sensoriais (Kalb, 2000). No entanto, para a confirmação do diagnóstico de EM o exame realizado é a ressonância magnética, a qual fornece evidência clara de lesões na substância branca no SNC (Minguetti, 2001). Outros exames utilizados para o diagnóstico incluem os potenciais evocados, os quais medem a velocidade em que diferentes estímulos sensitivos ou sensoriais resultam em uma resposta mensurável no cérebro (Santos et al., 2003); e a análise do líquido cefalorraquidiano que permite detectar se ocorre uma elevação na imunoglobulina a qual é um indicativo de anormalidades no sistema imune (Puccioni - Sohler et al., 2001).

Vários critérios para o diagnóstico foram propostos destacando-se principalmente os descritos por Poser et al. (1983) e McDonald et al. (2001). Esses critérios têm como objetivo demonstrar a disseminação das lesões no espaço e no tempo característicos desta doença. Os critérios de Poser são fundamentados nas alterações dos potenciais evocados e no exame de líquido cefalorraquidiano para estabelecer o diagnóstico. Devido a algumas falhas e limitações dos critérios de Poser em 2001 foram estabelecidos novos critérios de acordo com McDonald. Esses critérios se baseiam nos de Poser, mas foram expandidos para abranger o uso da ressonância magnética (Polman et al., 2005; Mallan & Scolding, 2009). Os critérios de McDonald são hoje em dia o padrão para os estudos clínicos, e provavelmente continuarão a evoluir à medida que melhorar o conhecimento, compreensão e o tratamento desta patologia desmielinizante.

1.1.7 Tratamento

A terapia realizada na EM tem três objetivos principais: tratamento de surtos, prevenção de futuras exarcebações e consequente progressão da doença e tratamento das complicações da EM (Wakerley et al., 2008).

Os glicocorticóides constituem a primeira linha de tratamento na fase de surtos da EM e seus mecanismos de ação são diversos, podendo inibir a proliferação de células T e a produção de citocinas. A conduta recomendada é a administração intravenosa na dose de 1g/dia durante três a cinco dias, sendo o tratamento crônico contra indicado uma vez que estes medicamentos não alteram o número de surtos podendo contribuir para a piora do quadro (Souza & Oliveira, 1999; Moreira et al., 2002; Neuhaus et al., 2003).

Evidências indicando que o sistema imune está envolvido na patogênese da EM fizeram com que a partir de 1993 os imunomoduladores se tornassem parte do arsenal terapêutico oferecendo real possibilidade de modificação do curso e da progressão da doença. Os medicamentos imunomoduladores atualmente utilizados são: o interferon β 1a (IFN- β 1a) o interferon β 1b (IFN- β 1b) e o acetato de glatirâmer (Tilbery et al., 2000).

Os IFNs- β 1a são preparações recombinantes glicosiladas que têm a cadeia de aminoácidos idêntica a do IFN- β natural humano. Estão disponíveis duas formulações: REBIF e AVONEX, sendo que o REBIF utilizado por via subcutânea três vezes por semana enquanto que AVONEX é administrado por injeção intramuscular uma vez por semana (Tilbery et al., 2000). O IFN- β 1b também é recombinante, porém produzido por bactérias e não glicosilado. O único medicamento disponível deste grupo é o BETAFERON sendo administrado por via subcutânea em dias alternados (Tilbery et al., 2000; Neuhaus et al., 2003; Fox et al., 2006).

O acetato de glatirâmer (COPAXONE) é outro imunomodulador formado por polipeptídeos sintéticos compostos por quatro aminoácidos (alanina, glutamina, lisina e tirosina), sendo administrado por injeção subcutânea diária (Farina et al., 2005). Tanto o COPAXONE, quanto REBIF, AVONEX e BETAFERON têm demonstrado grande eficácia na redução do número e severidade de surtos, além de reduzir também a formação de novas lesões cerebrais nas diferentes formas de EM (Tilbery et al., 2000, Moreira et al., 2002).

Embora ainda distantes de uma abordagem curativa, os avanços recentes permitem oferecer tratamento relativamente efetivo para os portadores de EM. Sem dúvida os estudos laboratoriais e os modelos

experimentais contribuem para que as fronteiras terapêuticas se ampliem buscando assim novos agentes que possam controlar fases específicas da resposta imunológica.

1.1.8 Modelos Experimentais de Desmielinização

Devido aos mecanismos complexos e ainda pouco conhecidos em relação ao processo de desmielinização da EM numerosos modelos experimentais que mimetizam esta condição patológica têm sido desenvolvidos (Stangel & Hartung, 2002). Tais modelos vêm sendo utilizados com o objetivo de permitir o conhecimento dos eventos celulares envolvidos, bem como sugerir formas de intervenção terapêutica para restaurar a função neurofisiológica na EM.

Os principais modelos empregados para o estudo de eventos desmielinizantes incluem a indução de reações imunológicas (Lavrnja et al., 2009) e a administração de substâncias tóxicas como o cuprizone (Stangel & Hartung, 2002), a lisolecitina (Lovas et al., 2000) e o brometo de etídio (BE) (Bondan et al., 2000; Guazzo, 2005).

1.1.8.1 Modelo Experimental de Desmielinização pelo Brometo de Etídio

O BE (3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenatridina) é um composto púrpura fluorescente, cuja molécula possui propriedades que permitem sua intercalação entre os pares de bases do DNA, causando desta forma uma alteração conformacional da dupla hélice e, assim, impedindo sua replicação e transcrição (Luedtke & Tor, 2003; Guazzo, 2005). O BE é considerado uma droga indutora de desmielinização por destruir seletivamente células gliais: astrócitos e oligodendrócitos (Bondan, 1997; Graça et al., 2001).

O modelo experimental de desmielinização pelo BE vem sendo estudado desde a década de 80, e é considerado atualmente um dos modelos mais utilizados para explorar a capacidade reparativa do sistema nervoso em relação às lesões na bainha de mielina (Graça & Blakemore, 1986; Stangel & Hartung, 2002). O BE tem sido empregado para avaliar os eventos relacionados à desmielinização e remielinização na medula espinhal (Fushini & Shirabe, 2002), nervo óptico (Guazzo, 2005) e tronco encefálico (Bondan et al., 2000; 2002).

As análises histológicas têm demonstrado que a injeção intracisternal de BE causa mudanças degenerativas nos oligodendrócitos e astrócitos após 72 horas da indução. Os axônios desmielinizados aparecem após o sexto dia da injeção e os primeiros sinais de remielinização são evidentes a partir dos 12 dias, apresentando-se num estágio mais avançado nos 30 dias pós-injeção (Bondan, 1997; Bondan et al., 2000; Graça et al., 2001).

Embora este modelo seja de natureza tóxica e, portanto não mimetize uma reação auto - imune como ocorre na EM, ele tem sido amplamente utilizado por apresentar boa reprodutibilidade de desmielinização e remielinização podendo ser muito útil no estudo de fatores celulares e moleculares envolvidos nestes eventos. Sendo assim, este modelo experimental pode ser muito importante para avaliar, por exemplo, o papel da sinalização purinérgica bem como o envolvimento do estresse oxidativo na patologia desmielinizante.

1.2 Esclerose Múltipla e o Sistema Imune e Nervoso

Postula-se que EM é uma doença auto-imune direcionada contra a mielina e oligodendrócitos do SNC, afetando predominantemente o nervo óptico, a

medula espinhal, o tronco cerebral e a substância branca periventricular (Oliveira & Souza, 1998). Embora o fator inicial bem como os antígenos alvos desta doença ainda não são conhecidos, tem sido demonstrado que células T ($CD4^+$ e $CD8^+$), células B, anticorpos, macrófagos e citocinas participam na patogênese da EM (Markovic - Plese & McFarland, 2001).

Acredita-se que a doença tenha início com a ativação periférica de células T $CD4^+$ (Th1), as quais uma vez ativadas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica por induzirem a expressão de moléculas de adesão e enzimas proteolíticas (Dhib-Jalbut et al., 2006). No SNC estas células ao serem expostas novamente a um auto - antígeno iniciam uma reação inflamatória com a secreção de citocinas como interferon γ ($IFN-\gamma$) e interleucina 2 ($IL-2$), as quais ativam macrófagos, células T e B (Neuhaus et al., 2003). Os macrófagos e células T atacam a bainha de mielina liberando mediadores citotóxicos como fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, enquanto que células B secretam anticorpos contra a mielina e oligodendrócitos (Neuhaus et al., 2003). Como consequência ocorre a perda das bainhas de mielina (desmielinização) e alterações na transmissão do impulso nervoso (Figura 2).

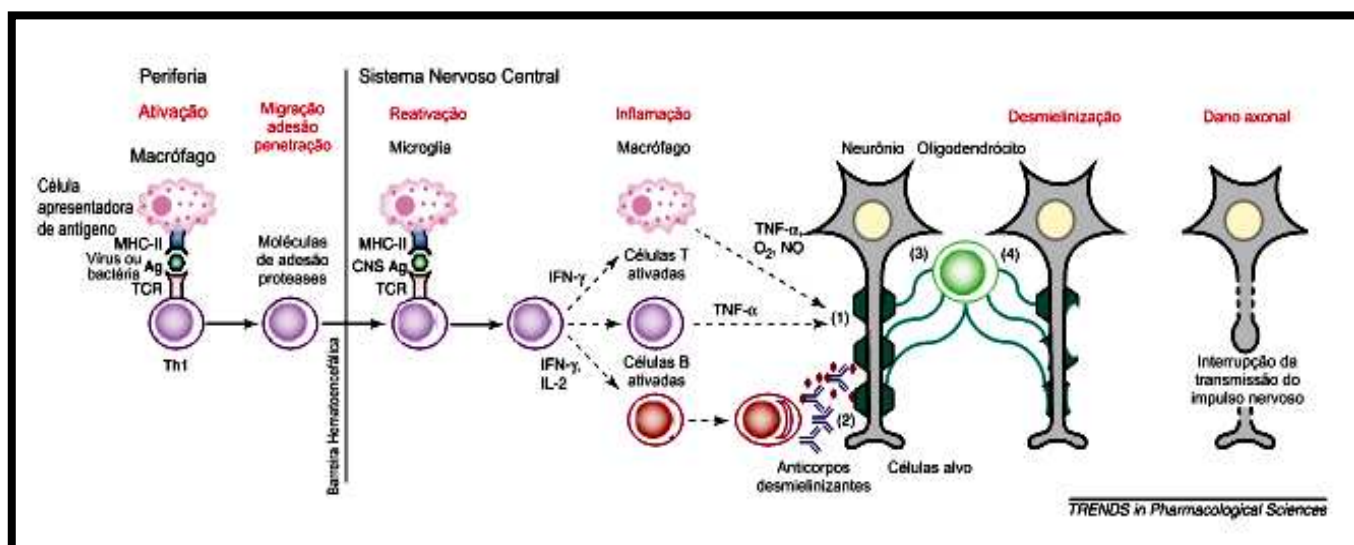


Figura 2 - Mecanismos imunes e inflamatórios envolvidos na desmielinização da EM. Adaptado de Neuhaus et al. (2003).

Nos estágios iniciais da doença, essa lesão desmielinizante pode evoluir para uma remielinização pelos oligodendrócitos sobreviventes preservando assim a integridade axonal (Reipert, 2004). Entretanto, com o passar do tempo a remielinização torna-se menos freqüente frente aos episódios agudos de inflamação levando ao comprometimento axonal e a neurodegeneração (Reipert, 2004). Além disso, em regiões onde ocorre desmielinização os astrócitos podem proliferar e preencher parte do espaço vago deixado pela mielina e oligodendrócitos formando uma cicatriz que recebeu o nome de esclerose e que deu, portanto o nome a doença (Markovic-Please & McFarland, 2001).

Em síntese pode-se concluir que os principais eventos envolvidos na formação das lesões na EM incluem o rompimento da barreira hematoencefálica, inflamação, desmielinização, morte de oligodendrócitos, gliose reativa e degeneração axonal (Markovic-Please & McFarland, 2001), sendo que dependendo da região do SNC que é afetada estes eventos alterarão a funcionalidade de diferentes órgãos e sistemas.

1.3 Esclerose Múltipla e o Sistema Vascular

Em 1935 Putnam formulou a hipótese vascular da EM baseado na observação que placas desmielinizantes tinham uma distribuição perivascular e que ocorria trombose nas veias cerebrais situadas no centro destas placas (Putnam, 1935). A partir da década de 60 numerosos trabalhos foram publicados sugerindo que as plaquetas seriam as responsáveis pela formação de trombos nas veias cerebrais e, portanto teriam um envolvimento na etiologia da EM (Millar et al., 1966; Neu et al., 1982; Cananzi et al., 1987).

Os trabalhos realizados neste período demonstraram que plaquetas de pacientes com EM apresentavam um aumento na adesão, na agregação plaquetária induzida por ADP e reduzida síntese de prostaglandinas (Millar et al., 1966; Neu et al., 1982). Estas alterações foram associadas ao fato que o processo desmielinizante liberaria a proteína básica de mielina na circulação, a qual poderia alterar a membrana das plaquetas, alterando assim as suas funções (Chiang et al.; 1982; Neu et al., 1982). Além disso, esse aumento na adesão e agregação poderia levar a trombose de pequenas veias cerebrais e acelerar o processo desmielinizante (Neu et al., 1982).

Estudos mais recentes também têm evidenciado a ocorrência de trombose venosa cerebral em pacientes com EM (Wakefield et al., 1994; Bunyan & Ogunniyi, 1997; Vandenberg et al., 2003). Além disso, níveis elevados de dímeros D, homocisteína, colesterol e proteína C reativa foram observados em pacientes com EM, demonstrando que parâmetros de coagulação e bioquímicos estão alterados nesta patologia (Aksungar et al., 2008). Os marcadores de ativação plaquetária tem sido também encontrados por estarem aumentados em pacientes com EM, sugerindo que esta ativação pode ser consequência do processo da doença, possivelmente devido à injúria endotelial (Sheremata et al., 2008). Embora todos estes estudos demonstrem que ocorrem alterações em parâmetros de coagulação e na função plaquetária os mecanismos envolvidos e o significado disso para a patogênese da doença ainda não são conhecidos.

1.4 Sistema Purinérgico

A sinalização purinérgica constitui-se atualmente um importante alvo de estudos devido ao seu papel em modular uma variedade de processos

biológicos incluindo tromboregulação, inflamação e neurotransmissão (Burnstock, 2006; Robson et al., 2006; Di Virgilio, 2007; Schetinger et al., 2007).

O sistema purinérgico envolve três componentes principais: os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, os receptores através dos quais estes nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos e as ectoenzimas responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas (Yegutkin, 2008).

1.4.1 Nucleosídeos e Nucleotídeos de Adenina

Os nucleosídeos são moléculas resultantes da união de uma base púrica ou pirimidica a uma pentose. Exemplos destas moléculas incluem a citidina, a uridina, a guanosina, a timina, a inosina e a adenosina. Quando estes nucleosídeos são fosforilados por quinases específicas formam moléculas denominadas de nucleotídeos (Atkinson et al., 2006).

Os nucleotídeos de adenina ATP, ADP e AMP e seu correspondente nucleosídeo adenosina são considerados importantes moléculas sinalizadoras em vários tecidos (Yegutkin, 2008). Tem sido demonstrado que o ATP, o ADP e a adenosina regulam processos relacionados à tromboregulação, modulam respostas imunes e sinalizam vias que são cruciais para o funcionamento e desenvolvimento do sistema nervoso (Burnstock, 2002).

No sistema vascular estas moléculas têm o potencial de influenciar funções cardíacas, participar de respostas vasomotoras e controlar as funções plaquetárias (Atkinson et al., 2006). O ADP constitui-se no principal agonista envolvido no recrutamento e agregação das plaquetas em locais de injúria vascular (Remijn et al., 2002), enquanto que o ATP em altas concentrações é inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP (Soslau & Youngprapakorn,

1997). Além disso, a adenosina é um potente inibidor da agregação plaquetária e também atua como modulador do tônus vascular (Anfossi et al., 2002).

O ATP e a adenosina também estão envolvidos na regulação de muitas respostas imunes e inflamatórias (Bours et al., 2006). O ATP é uma molécula que possui funções pró-inflamatórias como a estimulação e a proliferação de linfócitos sendo essencial para a liberação de citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e o interferon γ (IFN- γ) (Langston et al., 2003; Bours et al., 2006). Por outro lado, a adenosina tem potentes atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras por inibir a proliferação de células T através da ativação de receptores A_{2A} e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Gessi et al., 2007).

O papel do ATP e da adenosina na neurotransmissão e na neuromodulação do sistema nervoso também tem sido bem estabelecido. O ATP é um neurotransmissor excitatório nas sinapses nervosas purinérgicas, podendo ser também co-liberado juntamente com outros neurotransmissores como a acetilcolina e a noradrenalina (Gibb & Halliday, 1996; Burnstock, 2006); enquanto que adenosina age na neuromodulação regulando a liberação de vários neurotransmissores (Dunwiddie & Masino, 2001). Além disso, tem sido demonstrado que estas moléculas também estão envolvidas na sinaptogênese, na plasticidade neuronal, na proliferação de células gliais e na diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) (Rathone et al., 1999; Neary & Zimmermann, 2009).

1.4.2 Receptores Purinérgicos

Todas as funções dos nucleotídeos são mediadas através de receptores purinérgicos localizados na superfície de vários tipos de células (Yegutkin, 2008). Esses receptores dividem-se em dois grupos: P2X e P2Y. P2X são

receptores acoplados a canais iônicos com seus domínios carboxi e aminoterminal voltados para o meio intracelular e compreendem sete subtipos nomeados de P2X₁₋₇ (Di Virgilio et al., 2001). P2Y são receptores acoplados a proteína G apresentando sete regiões transmembrana com a porção aminoterminal voltada para meio extracelular e a porção carboxiterminal voltada para o meio citoplasmático compreendendo 14 subtipos os quais foram nomeados de P2Y₁₋₁₄ (Yegutkin, 2008). Os receptores para adenosina incluem quatro tipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, os quais são proteínas transmembrana acoplados a proteína G (Figura 3) (Haskó et al., 2008; Yegutkin, 2008).

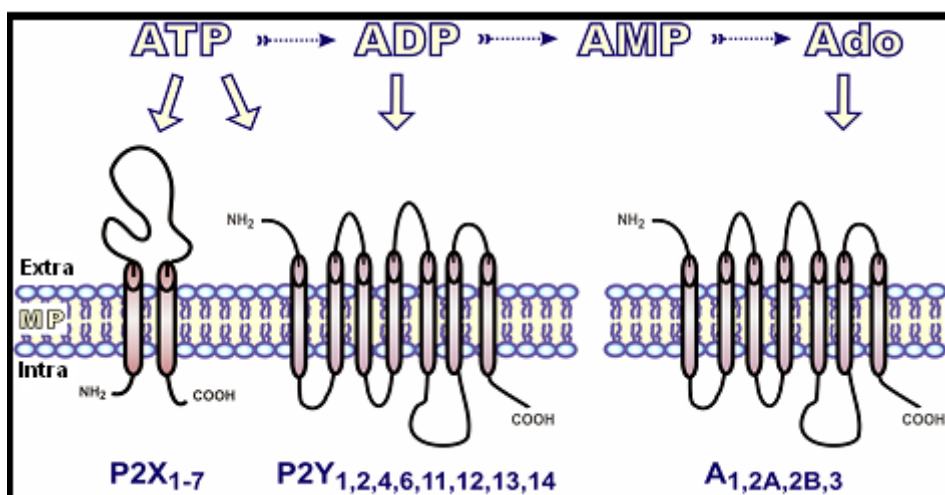


Figura 3 - Tipos de receptores para nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.

(Yegutkin, 2008).

1.4.3 Enzimas que Degradam Nucleotídeos e Nucleosídeos de Adenina

O controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e a consequente sinalização purinérgica por eles induzida através dos receptores, é realizada por uma variedade de enzimas ancoradas na membrana celular ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel (Zimmermann et al., 2007). Dentre estas enzimas pode-se destacar as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase), a família das E-NPPs

(Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases), 5'-nucleotidase e a adenosina deaminase (ADA) (Robson et al., 2006; Yegutkin, 2008).

Estas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise de ATP e do ADP formando AMP (Zimmermann et al., 2007). A seguir a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula de AMP formando adenosina, a qual posteriormente é degradada pela ação da ADA gerando inosina (Figura 4) (Yegutkin, 2008).

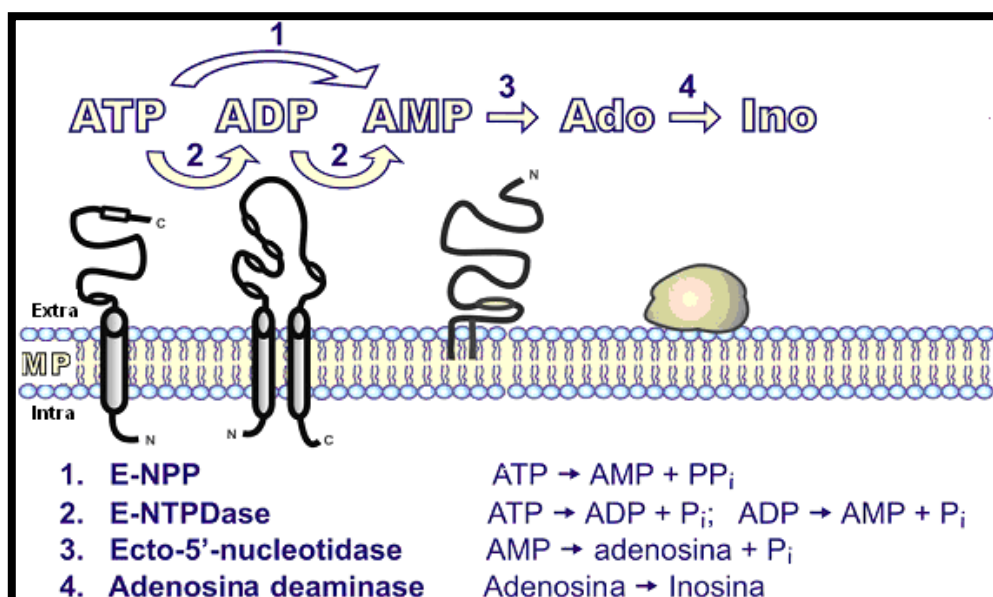


Figura 4 - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Adaptado de Yegutkin (2008).

1.4.3.1 NTPDases e 5'- Nucleotidase

As NTPDases são uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (Zimmermann et al., 2007). Esta classe de enzimas inclui oito membros nomeados de NTPDase 1-8 que diferem quanto a especificidade por substratos, distribuição tecidual e localização celular. Quatro destas enzimas estão localizadas na membrana celular com seu sítio catalítico

voltado para o meio extracelular (NTPDase 1, 2, 3 e 8) e quatro delas exibem localização intracelular (NTPDase 4, 5, 6 e 7) (Figura 5) (Robson et al., 2006).

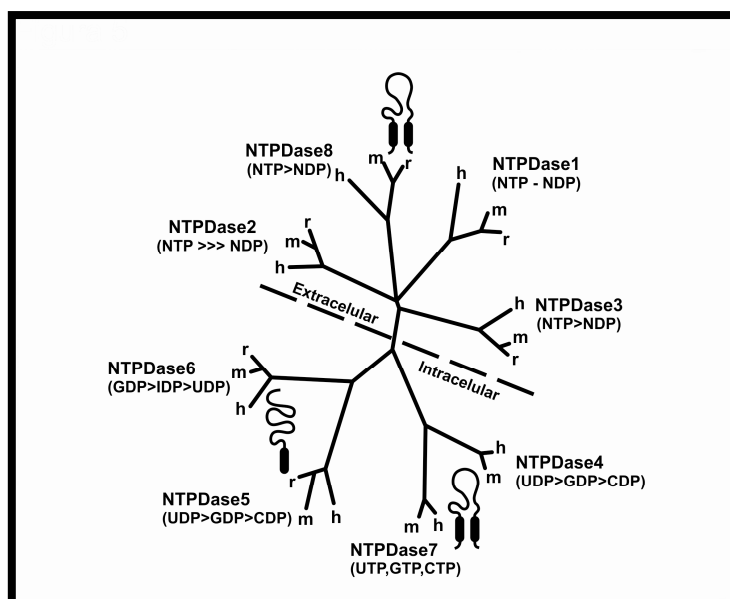


Figura 5 - Membros da família da NTPDase (Robson et al., 2006).

A NTPDase 1 está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal sendo capaz de hidrolisar tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (Robson et al., 2006). Esta enzima foi primeiramente identificada como um marcador de ativação de linfócitos B (Dwyer et al., 2007), entretanto trabalhos demonstraram que ela é expressa também em uma variedade de outras células, por exemplo, células neuronais (Wang & Guidotti, 1998) e plaquetas (Pilla et al., 2006).

A ecto-5'-nucleotidase é uma glicoproteína ligada à membrana via um glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular sendo responsável pela hidrólise de AMP gerando adenosina (Sträter, 2006). Esta enzima é amplamente encontrada em uma variedade de

tecidos como rins, fígado, encéfalo, pulmão, endotélio vascular, plaquetas e células do sistema imune (Colgan et al., 2006).

A função geral da NTPDase e da 5'-nucleotidase tem sido principalmente atribuída à hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP e a geração de adenosina, portanto dependendo da localização tecidual a atividade enzimática possui diferentes papéis fisiológicos. Sendo assim, nos últimos anos o papel destas enzimas tem sido avaliado em várias condições patológicas como o câncer (Araújo et al., 2005), o diabetes (Lunkes et al., 2003), o infarto agudo do miocárdio (Bagatini et al., 2008) e na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Leal et al., 2005). Além disso, em modelos experimentais de desmielinização tem sido demonstrado que a atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase encontraram-se aumentadas no SNC, possivelmente funcionando como um mecanismo compensatório para gerar adenosina, uma molécula com funções neuroprotetoras e imunossupressoras (Spanevello et al., 2006; Lavrnja et al., 2009).

1.4.3.2 Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP)

A família das E-NPPs é constituída por sete enzimas nomeadas de NPP1 até NPP7, sendo numeradas de acordo com sua ordem de descoberta (Yegutkin, 2008). Com exceção a NPP2, que é secretada no meio extracelular, todos os demais membros são ligados à membrana por um único domínio transmembrana. As NPP1 e 3 têm uma orientação transmembrana do tipo II, com sua porção aminoterminal voltada para o meio intracelular, enquanto que as NPPs 4-7 têm uma orientação do tipo I com sua porção aminoterminal voltada para o meio extracelular (Figura 6) (Stefan et al., 2006).

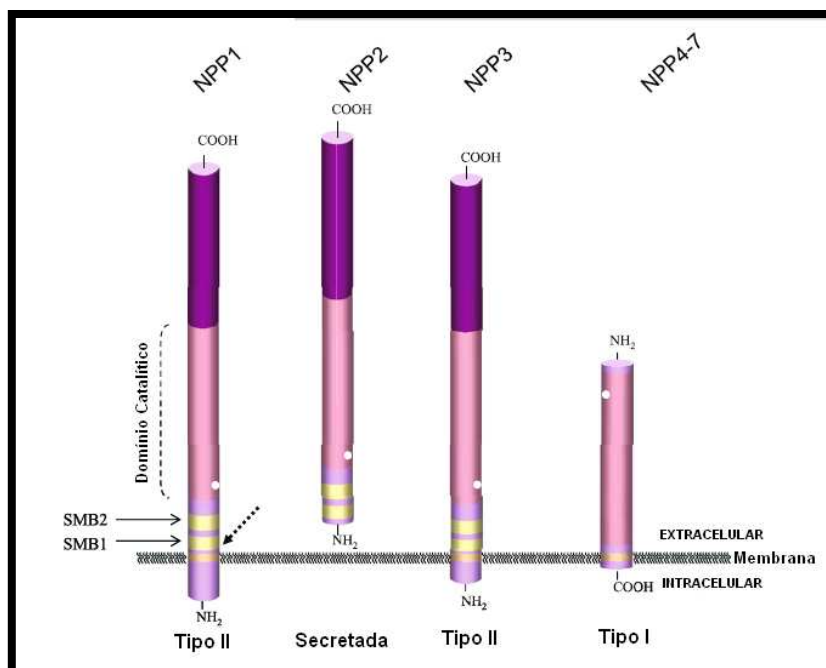


Figura 6 - Estrutura das enzimas da família da Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP) (Stefan et al., 2006).

A família das E-NPPs possuem uma ampla especificidade por substratos e são capazes de hidrolisar ligações pirofosfato e fosfodiéster de nucleotídeos, ácidos nucléicos, nucleotídeos de açúcar bem como de fosfodiésteres de colina (Stefan et al., 2005). Entretanto somente as NPP1-3 são capazes de hidrolisar nucleotídeos e são, portanto relevantes no contexto da cascata de sinalização purinérgica (Stefan et al., 2006; Yegutkin, 2008).

As E-NPPs possuem uma ampla distribuição tecidual o que lhe confere múltiplos papéis biológicos, incluindo reciclagem de nucleotídeos, modulação da sinalização purinérgica, regulação dos níveis de pirofosfato extracelular, proliferação e motilidade celular (Stefan et al., 2005; 2006). Além disso, alterações na atividade e expressão das E-NPPs tem sido observadas em várias patologias incluindo disfunções na mineralização óssea, câncer e diabetes, contudo os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente elucidados (Stefan et al., 2005; Terkeltaub, 2006; Maldonado et al., 2008).

1.4.3.3 Adenosina Deaminase (ADA)

A enzima ADA também faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação seqüencial dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (Yegutkin, 2008). A ADA é responsável pela deaminação da adenosina com a conseqüente produção de inosina regulando assim, as concentrações extracelulares deste nucleosídeo (Franco et al., 1997).

Estudos têm demonstrado que pelo menos duas proteínas são responsáveis pelo ancoramento da ecto-ADA na membrana celular. A primeira a ser identificada foi a CD26, uma proteína de membrana, e a segunda é o receptor de adenosina A₁ (Yegutkin, 2008). Além da sua propriedade catalítica, têm sido relatado que ecto-ADA ao interagir com as proteínas CD26 e A₁ pode ser importante no contato entre diferentes tipos de células e assim possuir um papel relevante para o desenvolvimento do sistema nervoso e imune (Franco et al., 1997).

O interesse pela ADA iniciou com a observação que pacientes com uma deficiência nesta enzima apresentavam imunodeficiência combinada, a qual é caracterizada por linfopenia, anormalidades pulmonares e neurológicas (Aldrich et al., 2000). A base metabólica desta imunodeficiência é relatada a sensibilidade dos linfócitos à acumulação dos substratos adenosina e deoxiadenosina. Ambos os mecanismos imunes celular e humoral diminuem devido ao baixo número de linfócitos no sangue e conseqüentemente, pacientes sem tratamento morrem por várias infecções oportunistas (Aldrich et al., 2000). Estes estudos associados a outras evidências demonstram que a ADA possui um papel importante na diferenciação e proliferação de linfócitos, sendo assim ela tem sido usada para monitorar várias patologias na qual o

sistema imune está envolvido e alterações em sua atividade têm sido considerada um indicador de distúrbios imunológicos (Hitoglou et al., 2001; Poursharifi et al., 2008).

1.5 Estresse Oxidativo

1.5.1 Radicais Livres e Defesas Antioxidantes

Os radicais livres são definidos como qualquer átomo, molécula ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (Ferreira & Matsubara, 1997). Esta configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia vida muito curta e quimicamente muito reativos (Barreiros & David, 2006).

Os radicais derivados do metabolismo do oxigênio e nitrogênio representam a classe mais importante de espécies radicais geradas nos sistemas biológicos. Exemplos destes radicais incluem: radical hidroxila (OH^{\bullet}), ânion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO^{\bullet}) (Barreiros & David, 2006). Existem, entretanto, compostos igualmente tão reativos quanto os radicais livres que não apresentam elétrons desemparelhados na sua última camada e, portanto não podem ser classificados como radicais livres (Ferreira & Matsubara, 1997). Essas substâncias são nomeadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas do nitrogênio (ERNs) para incluir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) e o peroxinitrito (ONOO^-) (Halliwell, 2006).

Essas espécies reativas são continuamente produzidas no organismo durante o metabolismo celular e podem desempenhar funções fisiológicas importantes quando em concentrações baixas ou moderadas, incluindo a regulação do tônus vascular e fagocitose (Bianchi & Antunes, 1999; Dröge,

2002). Entretanto, quando em excesso no organismo são prejudiciais causando sérios danos às macromoléculas biológicas, como lipídeos, proteínas e DNA (Barreiros & David, 2006).

A produção contínua de espécies reativas durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante nos organismos para limitar os níveis destas espécies e proteger as células contra os efeitos da oxidação de macromoléculas (Ferreira & Matsubara, 1997). Esses agentes que protegem as células contra o efeito dos radicais podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os enzimáticos destacam-se a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase, enquanto que os não enzimáticos incluem a vitamina C, a vitamina E e a glutatona reduzida (Vanucchi et al., 1998; Bianchi & Antunes, 1999).

Sob condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre a formação de espécies reativas e a sua eliminação pelo sistema antioxidante. Denomina-se estresse oxidativo a situação em que há um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e prooxidantes, com o predomínio destes últimos. Isso pode acontecer devido à diminuição dos sistemas de defesa antioxidante, ou o aumento da geração de espécies reativas, podendo resultar assim em danos em macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparados, alterarão a funcionalidade de tecidos e órgãos (Barreiros & David, 2006). Atualmente, o estresse oxidativo tem sido relacionado à etiologia de várias doenças incluindo desordens neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e EM (Porto, 2001; Emerit et al., 2004; Gilgun-Sherki et al., 2004).

1.5.2 Estresse Oxidativo e a Esclerose Múltipla

As espécies reativas geradas em excesso durante a ativação de células inflamatórias têm sido implicadas como mediadoras de desmielinização e dano axonal na EM (Gilgun-Sherki et al., 2004).

Estudos realizados com portadores de EM tem demonstrado um aumento nos níveis de moléculas oxidantes bem como uma diminuição nos sistemas de defesa antioxidantes. Produtos resultantes da peroxidação lipídica encontram-se aumentados em soro e plasma tanto durante os surtos quanto durante a fase de remissão e progressiva, indicando que a peroxidação ocorre na EM e pode contribuir para os danos a lipídios na bainha de mielina (Toshniwal & Zarling, 1992; Koch et al., 2006; 2007). Níveis aumentados de proteína carbonil também foram detectados na substância branca e cinzenta em amostras post mortem de pacientes com EM sugerindo que a oxidação de proteínas também está envolvida no dano tecidual (Bizzozero et al., 2005). Além disso, uma diminuição na atividade da superóxido dismutase em eritrócitos também foi descrita nesta patologia (Kopff et al., 1993).

Devido aos vários trabalhos que abordam a relação do estresse oxidativo com a EM, nos últimos anos este tema tem adquirido relevância clínica (Schreibelt et al., 2007) e o uso de antioxidantes vem sendo avaliado como uma importante estratégia terapêutica para impedir a desmielinização (Gilgun-Sherki et al., 2004). Entretanto, o desenvolvimento de antioxidantes bem como seus efeitos no sistema nervoso esbarra na necessidade de um maior entendimento sobre a estrutura e processos de transporte através da barreira hematoencefálica (Gilgun-Sherki et al., 2004). Sendo assim, poucos estudos foram realizados para avaliar os efeitos de antioxidantes em pacientes

com EM sendo a maioria dos resultados obtidos restritos a modelos experimentais de desmielinização (Lehmann et al.,1994; Moriya et al., 2008, Mazzanti et al., 2009).

Nos últimos anos tem sido bem estabelecido o papel da vitamina E como um importante antioxidante (Traber & Atkinson, 2007). Este fato juntamente com as evidências indicando que processos neurodegenerativos estão associados com o estresse oxidativo, levaram a idéia que muitas desordens neurológicas poderiam ser prevenidas pela propriedade antioxidante da vitamina E (Ricciarelli et al., 2007). Entretanto, poucos são os estudos que demonstram o papel antioxidante da vitamina E in vivo e os testes clínicos realizados apresentam resultados controversos em relação à desordens do SNC (Vatassery et al.,1999; Ricciarelli et al., 2007).

Os efeitos da vitamina E em patologias desmielinizantes ainda são pouco conhecidos. Odinak et al. (2002) demonstraram que pacientes com EM tratados com um complexo de antioxidantes contendo vitamina E tiveram uma redução no número de surtos, entretanto os mecanismos pelos quais isso ocorre não está ainda bem determinado. É importante considerar que além do papel antioxidante várias outras propriedades da vitamina E tem sido descritas nos últimos anos, como ação antiinflamatória (Grammas et al., 2004), neuroprotetora (Navarro et al., 2005), antiagregante (Freedman & Keaney, 2001) atuando também na regulação da transdução de sinal e expressão de genes (Brigelius-Flohé, 2009). Todas essas propriedades podem contribuir para os efeitos benéficos da vitamina E e podem ser importantes para o tratamento de várias patologias incluindo a EM.

Sendo assim, torna-se importante avaliar os efeitos da vitamina E em um modelo experimental de desmielinização com o objetivo de contribuir para um melhor entendimento dos efeitos deste composto frente a episódios de desmielinização.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA em linfócitos e plaquetas de pacientes com a forma surto remissão da EM, bem como em um modelo experimental de desmielinização associado ao tratamento com vitamina E.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade e expressão da NTPDase, bem como a atividade da ADA em linfócitos de pacientes com a forma surto remissão da EM.

- Analisar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA em plaquetas e o perfil de agregação plaquetária em pacientes com a forma surto remissão da EM.

- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas e plaquetas e parâmetros de estresse oxidativo em ratos submetidos a desmielinização subcortical pelo BE associado ao tratamento com vitamina E. Além disso, verificar também os efeitos neuroprotetores da vitamina E através de métodos histológicos, imunohistoquímicos e análise morfométrica das lesões desmielinizantes.

3. Metodologia e Resultados

Os resultados desta tese estão apresentados na forma de um manuscrito e dois artigos científicos, os quais foram divididos em capítulos 1, 2 e 3 respectivamente. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e artigos e representam a íntegra deste estudo. O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para a qual foi submetido.

A carta de aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que permitiram a realização de estudos envolvendo portadores de Esclerose Múltipla encontram-se nos Anexos I e II, respectivamente.

Capítulo 1

Manuscrito

The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients

Roselia M. Spanevello, Cinthia M. Mazzanti, Roberta Schmatz, Gustavo Thomé,
Margarete Bagatini, Maisa Correa, Luziane Bellé, Maria B. Moretto, Liliane
Oliveira, Vera M. Morsch, Maria R. C. Schetinger

Submetido à Revista Clinica Chimica Acta

The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients

Roselia M. Spanevello^a, Cinthia M. Mazzanti^b, Roberta Schmatz^b, Gustavo Thomé^b, Margarete Bagatini^b, Maisa Correa^b, Luziane Bellé^c, Maria B. Moretto^c, Liliane Oliveira^d, Vera M. Morsch^b, Maria R. C. Schetinger^{b*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

^c Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

^d Serviço de Hematologia e Oncologia, Hospital Universitário, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

* Corresponding author

Address correspondence and reprint requests to:

Maria Rosa Chitolina Schetinger (mariaschetinger@gmail.com) Tel/Fax: + 55-55-220-9557

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating neurological disease, which is presumed to be a consequence of infiltrating lymphocytes that are autoreactive to myelin proteins. ATP and adenosine contribute to fine-tuning immune responses and NTPDase (CD39) and adenosine deaminase (ADA) are important enzymes in the control the extracellular levels of these molecules at the site of inflammation. The aim of the present study was to evaluate the activity and expression of NTPDase and adenosine deaminase (ADA) activity in lymphocytes from patients with the relapsing – remitting form of MS (RRMS).

Methods: This study was realized on 22 patients with RRMS and 22 healthy subjects as a control group. The lymphocytes were isolated from human blood collected with EDTA and separated on ficoll density gradients and after isolation the NTPDase and ADA activities were determined.

Results: The results obtained show that NTPDase activity and expression were increased in lymphocytes from RRMS patients when compared with the control group ($p < 0.05$). In addition, a decrease in ADA activity was observed in lymphocytes from these patients when compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusions: These findings suggest that the regulation of ATP and adenosine levels by NTPDase and ADA activities may be important to preserve cellular integrity and to modulate the immune response in MS.

Key words: multiple sclerosis, lymphocytes, NTPDase, adenosine deaminase

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic demyelinating disease of the central nervous system (CNS) and predominantly affects young adults, leading to permanent disability in a large proportion of patients [1,2]. It is now well accepted that MS is an immunologically mediated disease directed against CNS myelin or oligodendrocytes and that both cell and humoral immune mechanisms may contribute to demyelination and axonal damage [3,4]. However, the importance of these findings in the understanding of the pathogenesis and mechanisms involved in MS remains under investigation.

Over the last decade, it has been established that purinergic signaling contributes to the fine-tuning of inflammatory and immune responses [5,6]. The overwhelming evidence indicates that extracellular ATP acting through specific cell surface receptors is involved in proinflammatory functions such as stimulation and proliferation of lymphocytes and cytokine release [5,7]. On the contrary, its breakdown product, adenosine, exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive action by inhibiting proliferation of T cells and secretion of cytokines [8 -10].

Extracellular ATP and adenosine levels and the ensuing purinergic signaling can be dynamically controlled during inflammation by the action of enzymes expressed in immune cells [5]. NTPDase (CD39) is the membrane - bound enzyme involved in the breakdown of ATP and ADP to AMP which is sequentially hydrolyzed by 5'-nucleotidase to adenosine [11-13]. CD39 was first described as a B lymphocyte activation marker, however this ectonucleotidase is also expressed on natural killer (NK) cells, monocytes and activated T cells [5,14]. CD39 has powerful functions in the immune system including cytokine

expression, cell-cell adhesion and cell proliferation and apoptosis via modulation of ATP levels [15]. Most importantly, alterations in the activity of this enzyme can be very important in immune diseases [16].

Adenosine deaminase (ADA) is considered to be a key enzyme in purine metabolism, catalyzing the irreversible deamination of adenosine and deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine respectively, closely regulating extracellular adenosine concentrations [17]. ADA is present in all cell types, but high ADA activity is present in the thymus, lymphoid tissues and peripheral lymphocytes. It has been demonstrated that this enzyme plays an important role in lymphocyte function and is essential for the normal growth, differentiation and proliferation of T lymphocytes [17,18]. The observation that ADA deficiency leads to severe combined immunodeficiency syndrome points to the physiological importance of controlling extracellular adenosine levels in the immune system [19].

Due to the fact that NTPDase and ADA control the levels of two potent and counteractive immunomodulatory molecules, ATP and adenosine, and that abnormal level of these enzymes may be associated with an autoimmune pathology; the aim of the present study was to evaluate NTPDase and ADA activities in lymphocytes from patients with the relapsing – remitting form of MS (RRMS).

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Nucleotides and Trizma base were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ficcoll - Histopaque (Lymphoprep TM) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Antibodies for the flow cytometry analysis, R-

Phycoerythrin (R-PE) – conjugated mouse anti-human monoclonal antibody against CD39 and fluorescein isothiocyanate (FITC) – conjugated mouse anti-human monoclonal antibody against CD45, were purchased from BD PharMingen Technical Data Sheet (San Jose, CA, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and the highest purity.

2.2. Patients

The sample consisted of 22 MS patients and 22 healthy subjects as a control group. The diagnosis of MS was based on the McDonald criteria [20] and all patients had the RRMS form. All patients were receiving current immunosuppressive therapy or other medications. The general characteristics of the patients are shown in Table I. All subjects gave written informed consent to participate in this study and the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 23081.007854/2007-44. Twelve milliliters of blood were obtained from each patient and used for lymphocyte preparation and other biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group.

2.3. Isolation of lymphocytes from human blood

Lymphocytes were isolated from human blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [21].

2.4. NTPDase enzyme assays

After lymphocyte isolation, NTPDase activity was determined as described by Leal et al. [22] where the reaction medium contained 0.5 mM CaCl₂, 120 mM

NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM the Tris HCl buffer pH 8.0, at a final volume of 200 μ l. Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution were added to the reaction medium (2-4 μ g of protein) and pre-incubated for 10 min at 37⁰ C and incubation proceeded for 70 minutes. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mM and stopped with 200 μ l of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [23] using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as mol Pi released/min/mg of protein.

2.5. Flow cytometry analysis for CD39

Peripheral blood cells were incubated with anti CD39 and anti CD45 (20 μ L/ 10⁶ cells) for 25 min, lysed with reagent FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter) lysis and incubated again for 15 min in the dark. Cells were washed twice in PBS buffer (pH 7.4) containing 0.02% (W/V) sodium azide and 0.2% (W/v) BSA. The cells were then resuspended in PBS buffer (pH 7.4) and immediately analyzed by FACScalibur flow cytometer using Cell quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) without fixation.

2.6. ADA enzyme assay

Adenosine deaminase activity was measured spectrophotometrically in lymphocytes by the method of Giusti and Gakis [24]. The ammonia produced was measured using the colorimetric technique of the Berthelot reaction.

Briefly, ammonia reacts in the presence of the catalyst sodium nitrosylpentacyanoferrate (III) with hypochlorite and phenol, under alkaline conditions, to form the intense blue indophenol. The ammonia concentration is directly proportional to the absorption of indophenol at 650nm. The reaction catalyzed by ADA is interrupted at the end of the incubation period (60 min/37°C) by the addition of a nitroprusside and phenol solution. The specific activity is reported as U/L.

2.7. Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [25] using serum albumin as standard.

2.8. In vitro effects of drugs used in the treatment of patients with acute MS on NTPDase and ADA activities

The in vitro effects of interferon β , paracetamol and clonazepam on NTPDase and ADA activities were evaluated. Isolated lymphocytes from healthy subjects were incubated with different concentrations of these drugs in the medium reaction as previously described. All concentrations of interferon β , paracetamol and clonazepam used in vitro were based on the mean plasma values of the medications [26-29].

2.9. Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the Student's t-test for independent samples and one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Correlation was evaluated by Pearson's test. $P < 0.05$ was considered to

represent a significant difference in all analyses used. All data were expressed as mean \pm SEM.

3. Results

Table I presents general characteristics of the patients. We observed that MS affected woman more than men and the onset of MS tended to be earlier in women (age 26) than in men (age 39). All the patients evaluated had the RRSM form and the treatment used for the majority of the patients was interferon- β .

The results obtained in the present study show that both NTPDase activity and expression were altered in lymphocytes from MS patients. As can be observed in Figure 1, ATP and ADP hydrolysis were significantly increased in lymphocytes from RRMS patients when compared with the control group ($p < 0.05$). Statistical analysis of the content of CD39 - positive cells by flow cytometry using labeled antibodies against NTPDase revealed that lymphocytes from RRMS patients also had a significant increase in NTPDase expression when compared with healthy individuals, $p < 0.05$ (Figure 2). In addition, a statistically significant positive correlation was found between NTPDase expression and lymphocyte ATP and ADP hydrolysis, $p < 0.05$ (Figure 3).

Alterations in ADA activity were also observed. Figure 4 shows a significant decrease in lymphocyte ADA activity in RRMS patients when compared to the control group ($p < 0.05$).

The next set of experiments was performed to evaluate the direct effect of the drugs used in the treatment of RRMS on NTPDase and ADA activities in lymphocytes. In vitro concentrations ranging from zero to 100 UI/ml for interferon β , from zero to 150 μ M for paracetamol and from zero to 10 μ M for

clonazepam were not capable of altering NTPDase and ADA activities in lymphocytes of healthy subjects (Table II).

4. Discussion

MS is an incurable and seriously disabling demyelinating disease, running a RRMS course which eventually becomes progressive (SPMS) [30]. In the RRMS form patients experience a series of relapses followed by complete or partial disappearance of the symptoms (remissions) while the SPMS form is characterized by a gradual progression of the disease involving a decline in the patient's physical abilities [2,30]. Although the etiology and pathogenesis remain unclear, it has been shown that autoimmune T cells targeting myelin components play a crucial role in mediating the inflammatory process, particularly in the early stages of RRMS [1, 31, 32].

Several studies have demonstrated that NTPDase (CD39) and ADA have significant roles in immune response and alterations in their activities have been observed in many diseases in which immunity is altered [16, 33-35]. In line with this, in the present study we evaluated the role of NTPDase and ADA in lymphocytes of RRMS patients in order to contribute to the understanding of the pathogenesis of this disease.

The results of the present study demonstrate that both NTPDase activity and expression were increased in lymphocytes from RRMS patients when compared with the control group (Figure 1 and 2). On the other hand, ADA activity was found to be significantly decreased in lymphocytes from these patients when compared with healthy subjects (Figure 4). These findings confirm previous reports that immune diseases induce alterations in the metabolism of extracellular adenine nucleotide [16,34] and suggest that

NTPDase and ADA enzymes may also have important functions in the modulation of immune and inflammatory responses in MS.

It is believed that the complex pathogenesis of MS involves the breakdown of the blood - brain barrier, massive infiltration of CD4⁺, CD8⁺, B cells and macrophages in the CNS and the concomitant release of proinflammatory molecules, including cytokines and adhesion molecules, resulting in demyelinating and axonal damage [31,32]. Among the molecules released as a result of inflammation and demyelination are adenine nucleotides such as ATP and adenosine, which have important functions in the interaction between immune components during activation, controlling the course and resolution of the inflammatory and immune responses [5,10].

ATP is involved in proinflammatory functions such as stimulation and proliferation of lymphocytes and cytokine release [36]. Most importantly, ATP appears to be necessary for cytokine secretion in Th1 cells such as interferon γ , which, once released, activates other subsets of lymphocytes or macrophages [7]. The enzyme NTPDase is expressed in numerous types of immune cells and is responsible for the hydrolysis of extracellular ATP [14]. It has been demonstrated that NTPDase is important in the control of lymphocyte function, including antigen recognition and or activation of cytotoxic T cells [15]. The observation that NTPDase expression is up-regulated in T-lymphocytes upon activation [14] and that CD39 null mice developed features of autoimmune disease [15] suggests that this enzyme has an important function in immune response modulation [37]. In this context, based on our results we can suggest that there is an increase of ATP released in the extracellular medium through the demyelinating process and that the up-regulation of NTPDase activity and

expression in lymphocytes from RRMS patients represents a compensatory mechanism that helps to reduce inflammation and might contribute to recovery of neural tissue in this disease phase.

In addition, we also observed in this study that ADA activity was decreased in lymphocytes from RRMS patients (Figure 4). This finding confirms previous studies that demonstrated that ADA activity was significantly decreased in lymphocytes from RRSM and SPMS patients [34]. ADA is other important enzyme in the immune system and is considered essential for the differentiation, normal growth and proliferation of lymphocytes [19]. ADA catalyzes deamination adenosine to inosine and closely regulates extracellular adenosine concentrations [17]. Adenosine plays a central and direct role in the regulation of inflammatory responses by inhibiting lymphocyte activation through A_2 receptor stimulation and secretion of proinflammatory cytokines [10,38]. Thus, adenosine acts as a negative feedback signal to counteract ATP-mediated immune stimulation, preventing uncontrolled inflammation and lessening the collateral damage to healthy tissues [10]. In line with this, it is important to note that in lymphocytes of RRMS patients the up-regulation of NTPDase activity degrades ATP, a proinflammatory molecule, and the inhibition of ADA activity may increase levels of adenosine, a molecule with immunosuppressive actions. Therefore, we can propose that NTPDase and ADA alterations represent an important compensatory mechanism to decrease inflammation and immune response in MS.

In the last set of experiments, we evaluated the role of the drugs used in RRMS treatment on NTPDase and ADA activities in lymphocytes from healthy subjects. Currently there is no therapy that alters the progression of physical

disabilities associated with MS and the accepted standard treatment consists of medications for disease symptoms. Interferon β has been approved for use in the treatment of RRMS. This drug reduces the frequency of clinical exacerbations, however side effects such as fever and general discomfort have been documented and these symptoms have been preventively treated with paracetamol [39,40]. In addition, clonazepam is indicated for the treatment of spasticity, tremors and anxiety associated with MS [41]. Our results demonstrate that these drugs did not alter NTPDase and ADA activities (Table II). Consequently, we believe that the enzyme inhibition observed in the present study was not affected by the medications used by the patients. In this context, these findings support the argument that it is the pathological condition that generates the alterations of enzyme activities.

In conclusion, we have demonstrated that NTPDase and ADA activities were altered in lymphocytes from RRMS patients, suggesting that these alterations are very important in reducing the inflammatory process in this disease. The importance of NTPDase and ADA from clinical and therapeutic points of view should be investigated in future research and may help devise novel strategies for the treatment of autoimmune diseases.

Acknowledgments

The authors wish to thank the neurologist Juarez Lopes and the MS patients and healthy subjects that contributed to this study. We also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support.

References

- [1] Winquist R, Kwong A, Ramachandran R, Jain J. The complex etiology of multiple sclerosis. *Biochem Pharmacol* 2007; 74:1321-1329.
- [2] Trapp B, Nave K. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev of Neurosci* 2008; 31:247-269.
- [3] Peterson L, Fujinami R. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006; 184:37-44.
- [4] Franciotto D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7:852-858.
- [5] Bours M, Swennen E, Di Virgilio F, Cronstein B, Dagnelie P. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 112:358-404.
- [6] Di Virgilio F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signal* 2007; 3:1-3.
- [7] Langston H, Ke Y, Gewirtz A, Dombrowski K, Kapp J. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 2003; 170:2962-2970.
- [8] Linden J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* 2006; 116:1835-1837.

[9] Deaglio S, Dwyer K, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V, Strom T, Robson S. Adenosine generation catalysed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; 204:1257-1265.

[10] Gessi S, Varani K, Merighi S, Fogli E, Sacchetto V, Benini A, Leung E, Mac-Lennan S, Borea P. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal* 2007; 3:109-116.

[11] Robson S, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; 2:409-430.

[12] Zimmermann H, Mishra S, Shukla V, Langer D, Gampe K, Grimm I, Delic J, Braun N. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *An R Acad Nac Farm* 2007; 73:537-566.

[13] Yegutkin G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 673-694.

[14] Pulte E, Broekman M, Olson K, Drosopoulos J, Kizer J, Islam N, Marcus A. CD39/NTPDase – 1 activity and expression in normal leucocytes. *Thromb Res* 2007; 121:309-317.

[15] Dwyer K, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom T, Robson S. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 2007; 3:171-180.

[16] Leal D, Streher C, Bertoncheli C, Carli L, Leal C, Silva J, Morsch V, Schetinger MR. HIV infection is associated with increased NTPDase activity correlates with CD39-positive lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1746: 129-134.

[17] Franco R, Casadó V, Ciruela F, Laura C, Mallol J, Canela E, Lluís C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 1997; 52:283-292.

[18] Codero O, Salgado F, Fernández-Alonso C, Herrera C, Lluís C, Franco R, Nogueira M. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leucocyte Biol* 2001; 70:920-930.

[19] Aldrich M, Blackburn M, Kellems R. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. *Biochem Biophys Res* 2000; 272:311-335.

[20] McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H, Lublin F, McFarland F, Paty D, Reingold S, Sandberg-Wollheim M, William Sibley W, Thompson A, Noort S, Weinshenker B, Wolinsky J. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-127

[21] Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest 1968; 97:77-89.

[22] Leal D, Streher C, Neu T, Bittencourt F, Leal C, Silva J, Morsch V, Scheringer M. Characterization of NTPDase (NTPDase 1: ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. Biochim Biophys Acta 2005; 1721:9-11.

[23] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} - ATPase activity. Anal Biochem 1986; 157:375-378.

[24] Giusti G, Gakis C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. Enzyme 1971; 12:417-425.

[25] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254.

[26] Munafo A, Lugan-Trinchard I, Nguyen T, Buraglio M. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human interferon beta 1a after intramuscular and subcutaneous administration. Eur J Neurol 1998; 5:187-193.

[27] Buchwalder P, Buclin T, Trincharid I, Munafo A, Biollaz J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of IFN- β in healthy volunteers. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 857-866.

[28] Crevoisier C., Delisle MC, Joseph I, Foletti G. Comparative single - dose pharmacokinetics of clonazepam following intravenous, intramuscular and oral administration to healthy volunteers. *Eur Neurol* 2003; 49:173-177.

[29] Wang A, Sun J, Feng H, Gao S, He Z. Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in human plasma by LC-ESI-MS. *Chromatografia* 2007; 67:281-285.

[30] Fox R, Bethoux F, Goldman M, Cohen J. Multiple sclerosis: advances in understanding, diagnosing and treating the underlying disease. *Clin J Med* 2006; 73:91-102.

[31] Lassmann H. Mechanisms of inflammation induced tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2008; 274:45-47.

[32] Dhib-Jalbut S, Arnold D, Cleveland D, Fisher M, Friedlander R, Mouradian M, Przedoborski S, Trapp B, Wyss-Coray T, Yong V. Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* 2006; 176:198-215.

[33] Hitoglu S, Hatzistilianou M, Gougoustamou D, Athanassiadou F, Kotsis A, Catriu D. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients

with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythemathosus. Clin Rheumatol 2001; 20:411-416.

[34] Vivekanandhan S, Soundararajan C, Tripathi M, Maheshwari M. Adenosine deaminase and 5'-nucleotidase activities in peripheral blood T cells of multiple sclerosis patients. Neurochem Res 2005; 30:453-456.

[35] Poursharifi P, Saghiri R, Ebrahimi-Rad M, Nazem H, Pourpak Z, Moin M, Shams S. Adenosina deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: The analysis of serum ADA1 and ADA2 activities. Clin Biochem 2008; in press.

[36] Trautmann A. Extracellular ATP in immune system: more than a just a danger signal. Sci Signal 2009; 2:1-3.

[37] Kannan S. E-NTPDase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation. Med Hypothesis 2002; 58:527-528.

[38] Haskó G, Kuhel D, Chen J, Schwarzschild M, Deitch E, Mabley J, Marton A, Szabó C. Adenosine inhibits IL-12 and TFN- α production via adenosine A2a receptor - dependent and independent mechanisms. FASEB J 2000; 14:2065-2074.

[39] Reeb J., Hass J., Gabriel K., Fuhbrott A, Fiola M. Both paracetamol and ibuprofen are equally effective in managing flu-like symptoms in relapsing-remitting multiple sclerosis patients during interferon beta-1a (AVONEX®) therapy. Mult Scler 2002; 8:15-18.

[40] Tourbah A, Lyon-Caen O. Interferons in multiple sclerosis: Ten year's experience. *Biochimie* 2007; 89:899-902.

[41] Toosy A, Thompson A. Multiple sclerosis - the disease and its treatment. *Pharm J* 2000; 264:694-700.

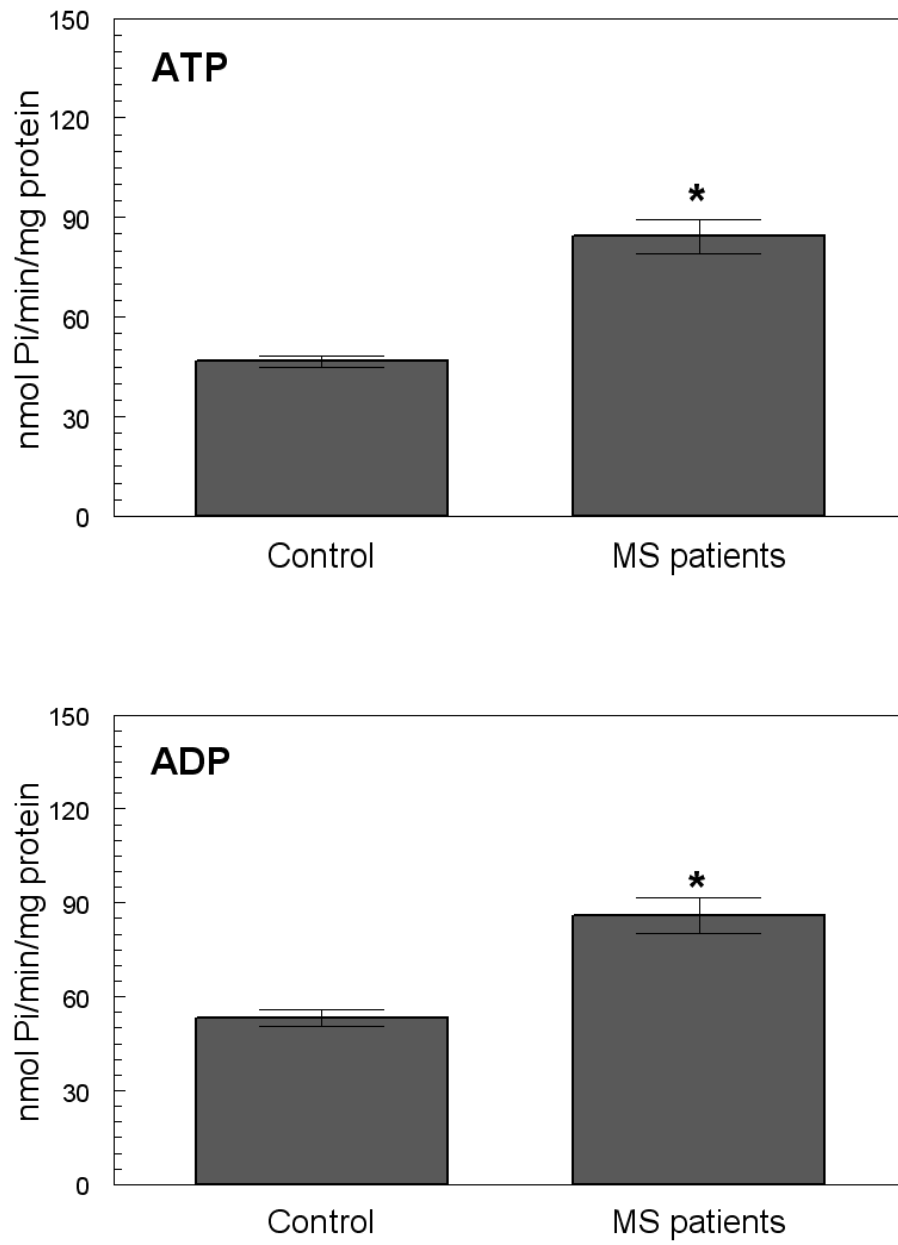


Figure 1

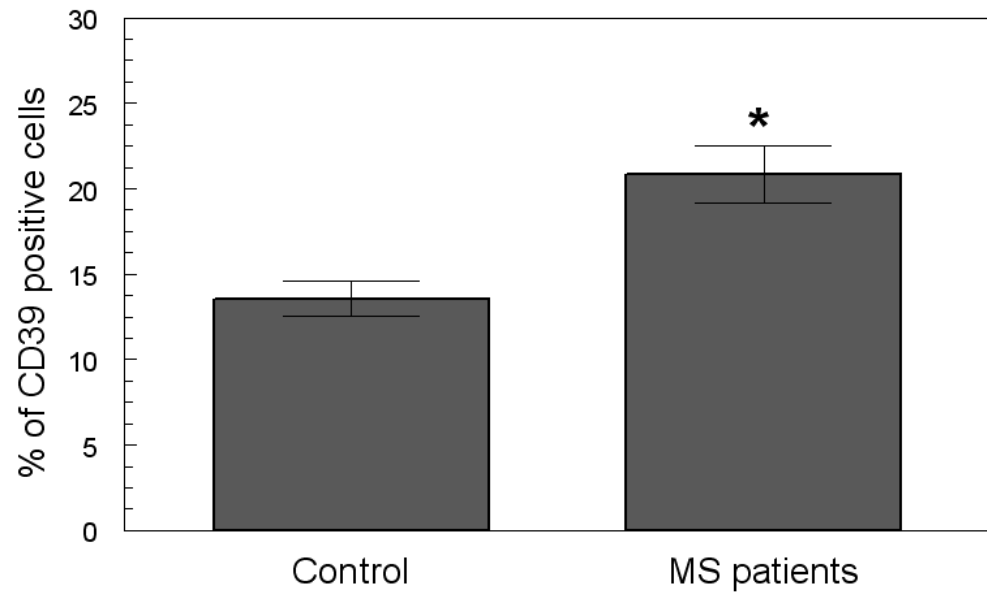
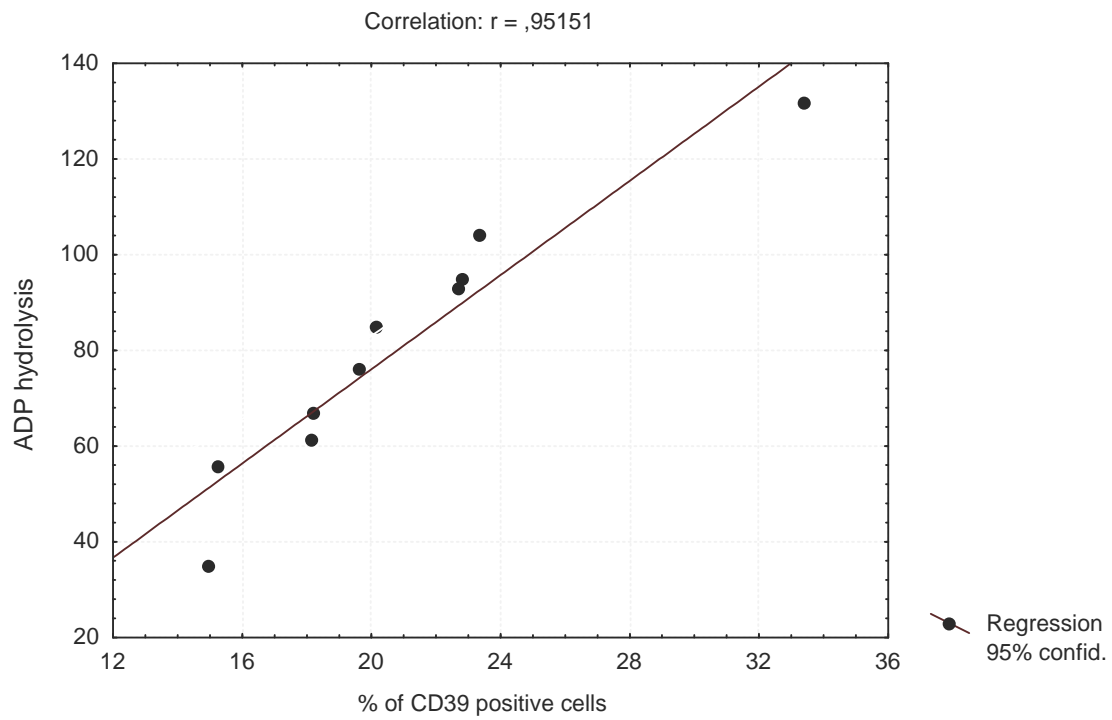
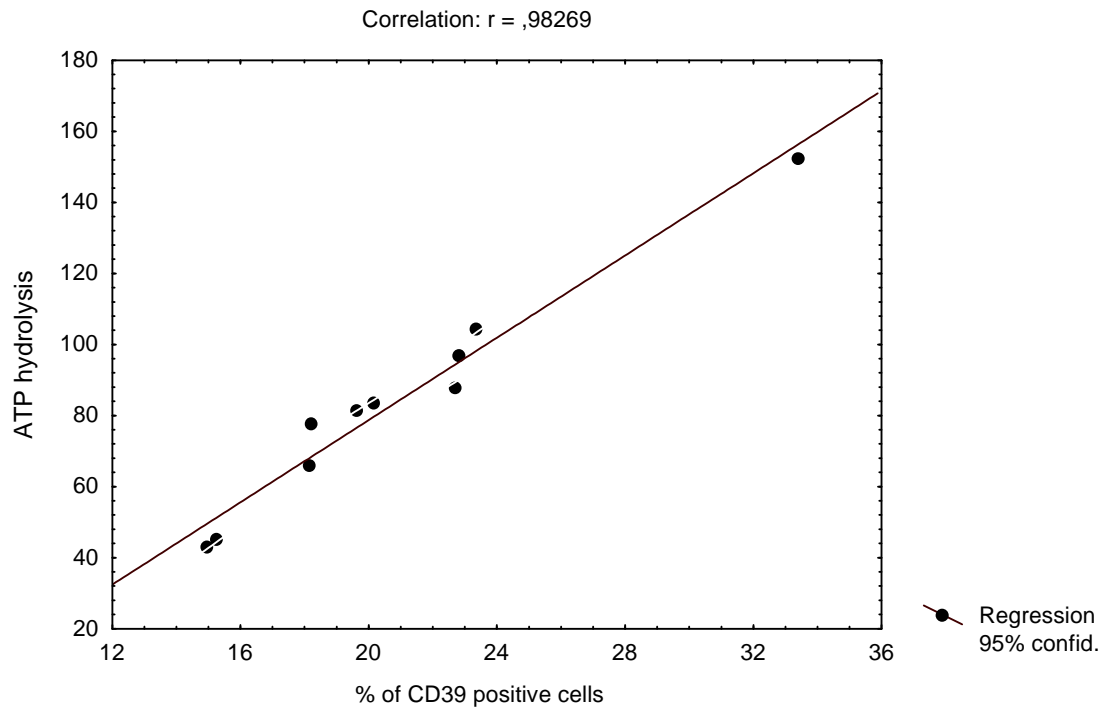


Figure 2

**Figure 3**

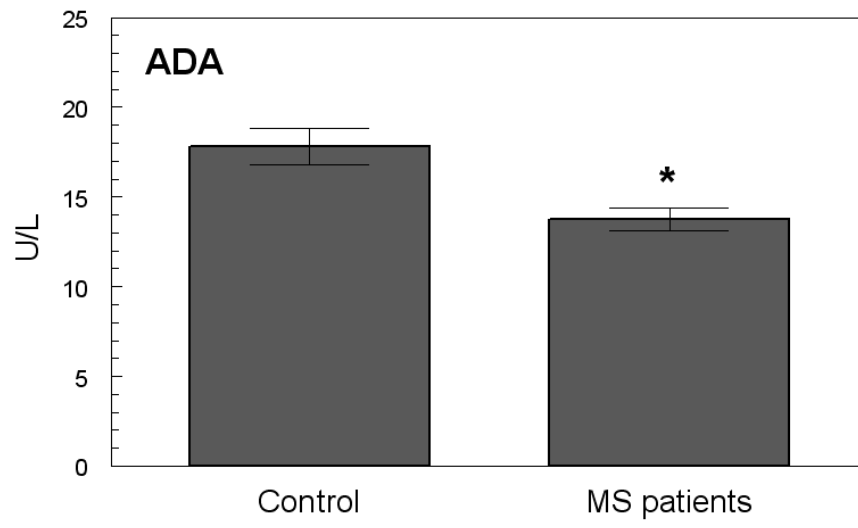


Figure 4

Table I – General characteristics of MS patients and healthy subjects.

	Control	MS patients
N	22	22
Women	17	18
Men	5	4
Age women (median,range)	40.6±1.9, 28-51	45.6 ± 2.1, 26-57
Age men (median,range)	41.6±3.8, 32-52	53.7±5.7, 39-67
Disease duration (years)	-	5.89±1.0
Use of interferon β (n)	-	17

Variables such as age and duration of disease are presented as mean \pm SEM.

Table II – In vitro effect of interferon β , paracetamol, clonazepam on NTPDase and ADA activities in lymphocytes of healthy subjects.

Drugs	NTPDase (ATP)	NTPDase (ADP)	ADA
<i>Interferon β</i>			
<i>0 UI/ml</i>	52.10 \pm 6.51	55.45 \pm 5.86	19.23 \pm 0.98
<i>10 UI/ml</i>	54.75 \pm 5.13	61.33 \pm 5.39	18.09 \pm 2.98
<i>50 UI/ml</i>	55.41 \pm 4.33	53.48 \pm 8.79	17.88 \pm 3.22
<i>100 UI/mL</i>	64.71 \pm 7.46	73.36 \pm 7.72	18.79 \pm 2.01
<i>Paracetamol</i>			
<i>0 μM</i>	37.86 \pm 4.63	46.01 \pm 6.81	19.23 \pm 0.98
<i>50 μM</i>	40.35 \pm 4.68	43.70 \pm 7.89	20.58 \pm 2.96
<i>100μM</i>	42.45 \pm 4.38	50.99 \pm 8.52	17.37 \pm 1.71
<i>150 μM</i>	43.57 \pm 3.07	57.63 \pm 6.01	17.42 \pm 1.79
<i>Clonazepam</i>			
<i>0 μM</i>	38.88 \pm 4.27	48.82 \pm 6.50	19.23 \pm 0.98
<i>1 μM</i>	37.98 \pm 3.41	47.33 \pm 5.66	17.62 \pm 3.66
<i>5 μM</i>	41.00 \pm 4.40	51.92 \pm 6.54	17.63 \pm 0.90
<i>10 μM</i>	40.26 \pm 4.39	54.02 \pm 2.00	18.74 \pm 3.01

Values represent mean \pm SEM of specific activity for NTPDase (nmol Pi released/min/mg of protein) and ADA (U/L). Data were evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (n= 4-5).

LEGENDS

Figure 1: NTPDase activity using ATP and ADP substrates in lymphocytes of MS patients. Bars represent means \pm SEM. * Represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$ n = 22).

Figure 2: CD39 expression in lymphocytes of MS patients and healthy subjects (control) analyzed by flow cytometry (see Material and Methods). Data represent the mean \pm SEM of 10 individuals. *Represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$).

Figure 3: Pearson's correlation analysis between % of CD39 positive cells and ATP and ADP hydrolysis ($P < 0.05$ n=22)

Figure 4: ADA activity in lymphocytes of MS patients. Bars represent means \pm SEM. * Represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$ n = 15).

Capítulo 2

Artigo I

Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients

Roselia Maria Spanevello, Cinthia Melazzo Mazzanti, Margarete Bagatini,
Maisa Correa, Roberta Schmatz, Naiara Stefanello, Gustavo Thomé, Vera
Maria Morsch, Lara Becker, Luziane Bellé, Liliane de Oliveira, Maria Rosa
Chitolina Schetinger

Publicado na Revista Journal of Neurology

Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients

Roselia Maria Spanevello · Cinthia Melazzo Mazzanti · Margarete Bagatini · Maisa Correa · Roberta Schmatz · Naiara Stefanello · Gustavo Thomé · Vera Maria Morsch · Lara Becker · Luziane Bellé · Liliane de Oliveira · Maria Rosa Chitolina Schetinger

Received: 1 April 2009 / Revised: 27 June 2009 / Accepted: 8 July 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic disabling neurological disease in young adults. Alterations in platelet function have been observed in MS; however, the mechanism and the relevance of this blood cell disorder with regard to MS pathogenesis are not yet understood. The aim of this study was to evaluate activities of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase, CD39), ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP), 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) in platelets from patients with the relapsing–remitting form of MS (RRMS), as well as to analyze platelet aggregation and expression of NTPDase. The results obtained show that NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities were decreased in platelets of

RRMS patients when compared with the control group ($p < 0.05$). In addition, NTPDase expression in platelets was also decreased in these patients ($p < 0.05$); however, no differences were observed in platelet aggregation between RRMS patients and the control group. Our results suggest that the alterations in NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase and ADA may have contributed to the alterations in platelet function in MS by altering the levels of nucleotides and nucleosides in the circulation.

Keywords Multiple sclerosis · Platelet · Ectonucleotidases · Adenine nucleotides · Blood

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) and is the most common cause of neurological disability in young adults [1]. MS can be present in different forms, such as primary progressive (PPMS), secondary progressive (SPMS) and relapsing–remitting (RRMS) [2]. RRMS is the most prevalent form (80%), and its clinical manifestation is characterized by recurrent episodes of neurological deficits followed by partial recovery [1, 2].

Vascular complications have received little attention in comparison with other complications associated with demyelination. The few reports in the literature have described abnormalities in the cerebral microvasculature in acute MS [3], alterations in the coagulation status [4] and the occurrence of cerebral venous thrombosis [5, 6], which may be associated with anomalous platelet behavior in MS patients [7, 8].

Platelets are one of the most important components of blood, participating in the maintenance of vascular

R. M. Spanevello
Department of Biochemistry,
Institute of Basic Sciences for Health,
Federal University of Rio Grande do Sul,
Rua Ramiro Barcellos 2600,
Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

C. M. Mazzanti · M. Bagatini · M. Correa · R. Schmatz ·
N. Stefanello · G. Thomé · V. M. Morsch · L. Becker ·
M. R. C. Schetinger (✉)
Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences,
Federal University of Santa Maria, Camobi,
Santa Maria, RS 97105-900, Brazil
e-mail: mariachitolina@gmail.com

L. Bellé
Department of Clinical and Toxicological Analysis,
Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria,
Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

L. de Oliveira
Department of Hematology and Oncology,
University Hospital, Federal University of Santa Maria,
Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

integrity via adhesion, aggregation and subsequent thrombus formation at the site of vascular damage [9]. Studies have demonstrated altered platelet morphology and function in MS patients, such as a greater tendency to spontaneous aggregation, high hypersensitivity in the presence of ADP and reduced synthesis of prostaglandins [7, 8, 10]. However, the importance of these findings to the pathogenesis of MS and the mechanisms involved remain vague.

Extracellular adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their nucleoside derivative, adenosine, have become clearly recognized for their important role in modulating processes linked to vascular inflammation and thrombosis, exerting various effects on platelets [11]. ADP is recognized as the main promoter of platelet aggregation [12], whereas adenosine is a potent inhibitor of this aggregation and an important modulator of vascular tonus [13]. Moreover, studies have suggested that ATP has a complex role in the regulation of platelet aggregation [14, 15].

The extracellular concentration of nucleotides and nucleosides is tightly regulated by the action of enzymes such as ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase (E-NPPs), 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) [16]. NTPDase hydrolyzes the extracellular nucleotides tri- and diphosphate (ATP and ADP) to adenosine monophosphate (AMP), while E-NPPs are responsible for hydrolyzing 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives, resulting in the production of monophosphate nucleotides [17, 18]. AMP produced from action of NTPDase and E-NPP is subsequently hydrolyzed to adenosine by the action of 5'-nucleotidase [19]. The resulting adenosine can be directly inactivated through the action of ADA, which catalyzes the irreversible deamination of adenosine [20]. These enzymes play an important role in the maintenance of adequate vascular hemostasis and thrombogenesis, mainly by regulating the platelet aggregation status [21, 22].

Therefore, considering that platelet function is altered in MS patients and that adenine nucleotides are very important in the regulation of platelet aggregation, we have examined platelet aggregation and the potential role of enzymes that participate in the hydrolysis of ATP, ADP and AMP as well as adenosine in platelets from patients with RRMS.

Methods

Patients

The experimental group consisted of 20 patients with MS (15 females, aged 26–57 years, mean 43.94 ± 2.18 ; 5

males, aged 39–67 years, mean 51.80 ± 4.85), and the control group consisted of 20 healthy subjects (14 females, aged 28–58, mean 41.92 ± 3.06 ; 6 males aged 34–67 years, mean 47.75 ± 9.51). The diagnosis of MS was based on the McDonald criteria [23], and all patients had the relapsing–remitting form (RRMS). The mean duration of the disease was 6.0 ± 4.62 years, and all patients were receiving current immunosuppressive therapy. Ten milliliters of blood was obtained from each patient and used for platelet-rich plasma preparation and other biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group. All the subjects gave written informed consent to participate in this study, and the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of the Santa Maria approved the protocol under number 23081.007854/2007-44.

Platelet separation

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by the method of Pilla et al. [24] modified by Lunkes et al. [25]. Total blood was collected into 0.120 M sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at $160 \times g$ for 10 min. After this, the PRP was centrifuged at $1,400 \times g$ for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activities.

NTPDase and 5'-nucleotidase assays

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 , 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 Lunkes et al. [25]. Since NTPDase and 5'-nucleotidase activities depend on millimolar concentrations of divalent cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively, for AMP hydrolysis, the medium reaction was used as previously described except that 5 mM CaCl_2 was replaced by 10 mM MgCl_2 .

Twenty microliters of the enzyme preparation (8–12 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 AMP at a final concentration of 2 mM. The incubation time was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 μl of 10% trichloroacetic acid (TCA). Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [26] using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

E-NPP activity determination

The E-NPP activity from platelets was assessed using *p*-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Fürstenau et al. [27]. The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM CaCl₂ and pH 8.9 was preincubated with approximately 20 µg per tube of platelet protein for 10 min at 37°C to a final volume of 200 µl. The enzyme reaction was started by the addition of *p*-Nph-5'-TMP at a final concentration of 0.5 mM. After 80 min of incubation, 200 µl NaOH 0.2 N was added to the medium to stop the reaction. The amount of *p*-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of $18.8 \times 10^{-3}/(\text{M cm})$. Enzyme activity was expressed as nmol *p*-nitrophenol released/min/mg protein.

Adenosine deaminase (ADA) determination

ADA from platelets was determined according to Guisti and Galanti [28]. Briefly, 50 µl of platelets reacted with 21 mmol/l of adenosine, pH 6.5, incubated at 37°C for 60 min. Results were expressed in units per liter (U/l).

Protein determination

Protein content was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford [29], using bovine serum albumin as the standard. This assay is based on the binding of the dye Coomassie Blue G-250 to protein, and this binding is accompanied by measuring the absorbance maximum of the solution at 595 nm.

Flow cytometry analysis for CD39

Peripheral blood cells were incubated with anti-CD39 and anti-CD61 (20 µl/10⁶ cells) for 25 min, lysed with reagent FACS (fluorescent activated cell sorter) and incubated again for 15 min in the dark. Cells were washed twice in PBS buffer (pH 7.4) containing 0.02% (W/V) sodium azide and 0.2% (W/v) BSA. The cells were then resuspended in PBS buffer (pH 7.4) and immediately analyzed by FAC-Scalibur flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA) without fixation.

Platelet aggregation

The platelet aggregation profile was evaluated by the method of Born and Cross (1963) by measuring turbidity with a Chrono-log optical aggregometer (AGGRO/LINK[®] model 810-CA software for Windows version 5.1) using

ADP at concentrations of 3, 5 and 10 µM as agonist. The results were expressed as percentage of aggregation.

Effects in vitro of drugs used in the treatment of patients with MS on the activity of enzymes that degraded adenine nucleotides and nucleosides

The in vitro effects of interferon β, paracetamol and clonazepam on NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities were evaluated. Isolated platelets from healthy subjects were incubated with different concentrations of these drugs in the medium reaction as previously described. All concentrations of interferon β, paracetamol and clonazepam used in vitro represent approximately the mean plasma values of the medications [30–32].

Statistical analysis

The data obtained for the enzyme activities in platelets from patients were analyzed statistically by the Student's *t* test for independent samples. The in vitro effects of the drugs upon ectoenzymes activities were evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Correlation was evaluated by Pearson's test. *P* < 0.05 was considered to represent a significant difference in all analyses used. All data were expressed as mean ± SEM.

Results

The results obtained for NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets are shown in Fig. 1. As can be observed, ATP, ADP and AMP hydrolysis was significantly decreased in RRMS patients when compared with the control group (Fig. 1 (ATP), *p* = 0.001; Fig. 1 (ADP), *p* = 0.012; Fig. 1 (AMP), *p* = 0.001). Similarly, E-NPP and ADA activities were also decreased in RRMS patients when compared with the control group (Fig. 2, *p* = 0.001; Fig. 3, *p* = 0.023, respectively).

Statistical analysis of the content of CD39-positive cells by flow cytometry using labeled antibody against NTPDase revealed that RRMS patients had a significant decrease in NTPDase expression when compared with healthy individuals (Fig. 4, *p* = 0.040). In addition, a statistically significant positive correlation was found between CD39 expression and platelet ATP and ADP hydrolysis (Fig. 5, *p* < 0.05).

Figure 6 presents the results obtained for platelet aggregation. As can be observed, no differences were found in platelet aggregation between RRMS patients and the control group using different concentrations of ADP as agonist.

The direct effect of the drugs used in the treatment of MS upon ectonucleotidase activities was tested. In vitro

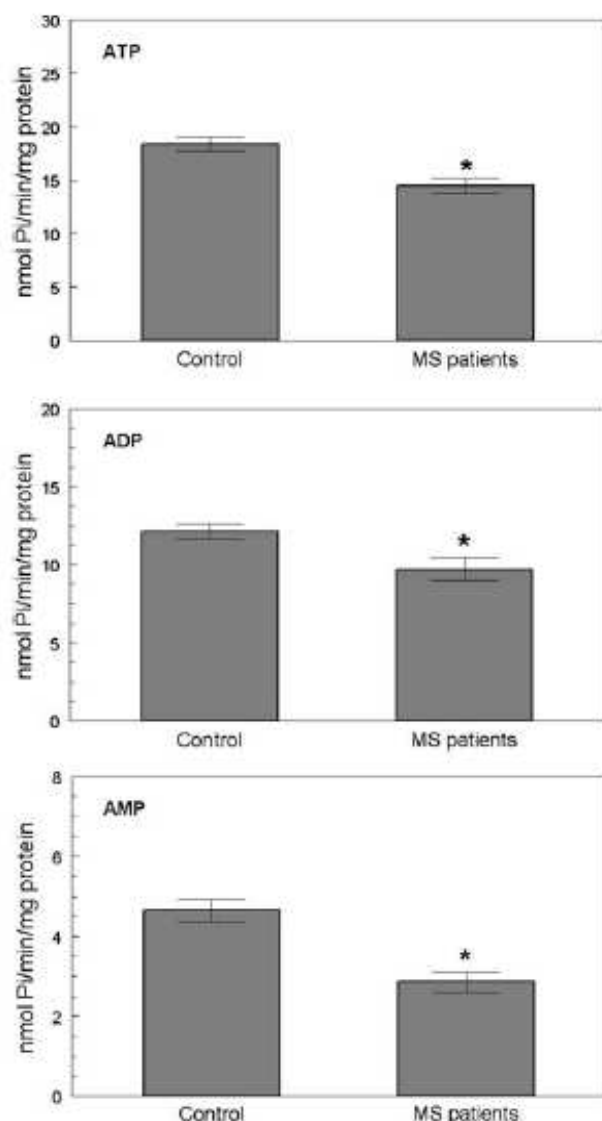


Fig. 1 NTPDase (ATP and ADP) and 5'-nucleotidase (AMP) activities in platelets of MS patients. *Bars* represent means \pm SEM. *Represents statistical difference from the control group (Student's *t* test, $p < 0.05$ $n = 20$)

concentrations ranging from 0 to 100 UI/ml for interferon β , from 0 to 150 μ M for paracetamol and from 0 to 10 μ M for clonazepam were used. The results obtained demonstrate that interferon β , paracetamol and clonazepam were not capable of altering NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities at any concentration tested (data not show).

Discussion

Several studies from our laboratory have demonstrated that NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA are enzymes

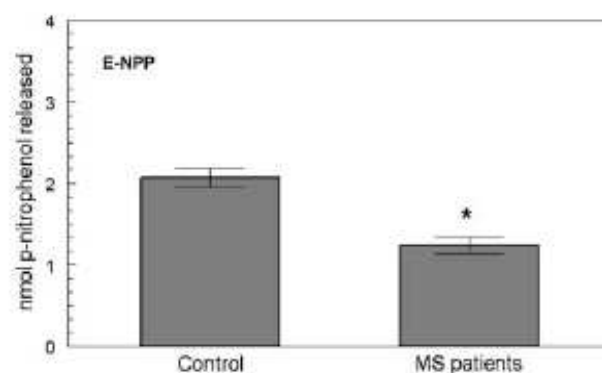


Fig. 2 E-NPP activity in platelets of MS patients. *Bars* represent means \pm SEM. *Represents statistical difference from the control group (Student's *t* test, $p < 0.05$ $n = 20$)

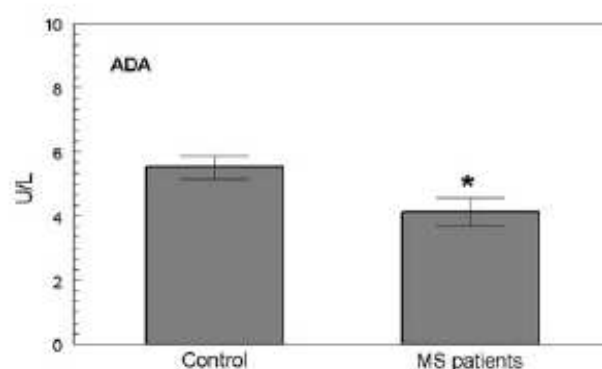


Fig. 3 ADA activity in platelets of MS patients. *Bars* represent means \pm SEM. *Represents statistical difference from the control group (Student's *t* test, $p < 0.05$ $n = 15$)

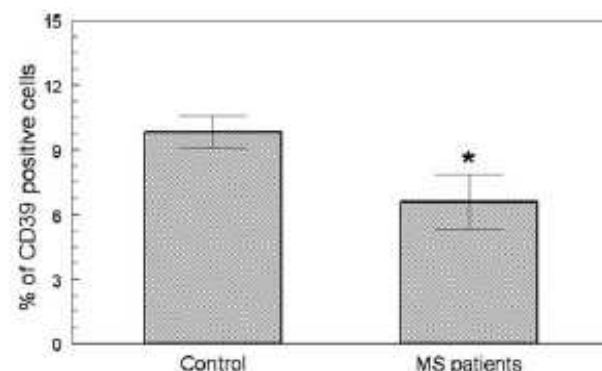


Fig. 4 CD39 expression in platelets of MS patients and healthy subjects (control) analyzed by flow cytometry (see Experimental Procedure). Data represent the mean \pm SEM of eight individuals. *Represents statistical difference from the control group (Student's *t* test, $p < 0.05$)

that play an important role in thromboregulation mechanisms, and alterations in their activities have been observed in various diseases, suggesting that they could be important physiological and pathological parameters [33, 34].

Fig. 5 Pearson's correlation analysis between % of CD39 positive cells and ATP (a) and ADP (b) hydrolysis ($p < 0.05$)

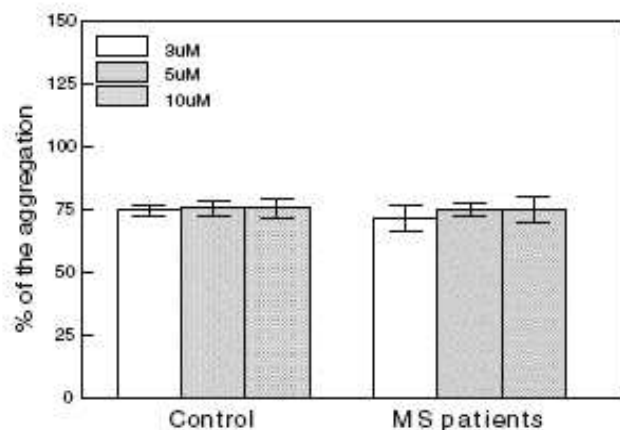
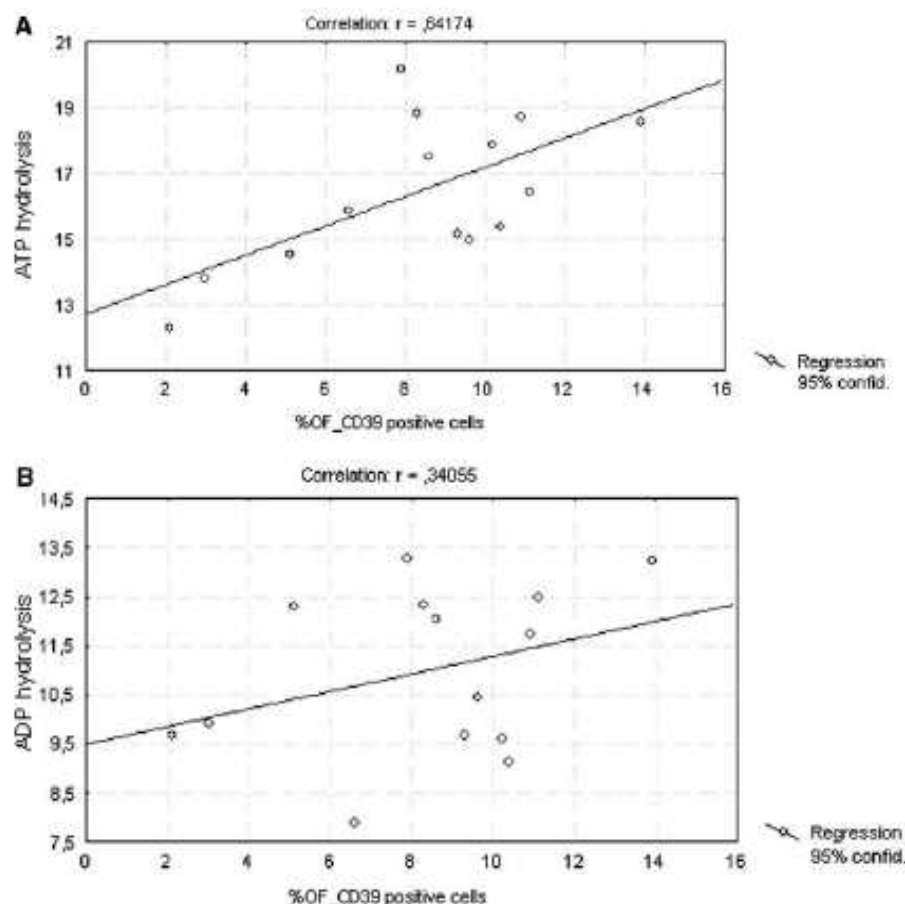


Fig. 6 Platelet aggregation profile in MS patients and healthy subjects (control). Platelet aggregation was evaluated by using ADP as agonist at concentrations of 3, 5 and 10 μM . The results are expressed as percentage of aggregation ($n = 10$)

In this study the NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities were decreased in the platelets of MS patients (Figs. 1, 2, 3). Similar results were obtained in the experimental study, which demonstrated that the NTPDase activity in platelets also was decreased in rats experimentally demyelinated [35]. Taken together, these findings indicate that demyelination may alter coagulation

parameters by interfering in nucleotide and nucleoside levels in the circulation.

The action of the ectonucleotidases is one the most important factors involved in the modulation of the nucleotides/nucleosides relation and, thus, in the effect on different platelet receptors [16]. In this scenario, the coordinated action of NTPDase, E-NPP and 5'-nucleotidase activities tends to rapidly inactivate the released ATP/ADP/AMP with respective generation of adenosine, representing the main effector system for the termination of proinflammatory and prothrombotic responses in the cardiovascular system [17, 21, 22]. In this context, and in light of our results, we can suggest that inhibition of NTPDase, E-NPP and 5'-nucleotidase activities in platelets of RRMS patients could result in augmented platelet activation and aggregation, since ADP may accumulate in the extracellular milieu, and AMP hydrolysis is decreased, leading to decreased adenosine production. Taken together, these alterations could explain, as least in part, the development of vascular complications observed in MS patients.

Of particular interest, we have also shown in this study that NTPDase (CD39) expression in platelet membranes was decreased in RRMS patients (Fig. 4) and that there was a positive correlation between ATP and ADP hydrolysis and NTPDase expression in platelets (Fig. 5).

Considering the established function of NTPDase as well as the fact that soluble forms of this enzyme are potential therapeutic agents in the inhibition of platelet-mediated thrombotic diseases [36, 37], it can be hypothesized that alterations in extracellular nucleotide levels caused by changes in CD39 expression in MS may represent an important factor in the alteration of coagulation parameters in this disease.

On the other hand, one important aspect to be discussed is that the ADA activity was also inhibited in RRMS patients (Fig. 3). ADA is an important enzyme that degrades adenosine to inosine, tightly regulating local extracellular concentrations of adenosine [20]. We speculate that the decreased activity of this enzyme could represent a compensatory mechanism leading to increased adenosine in the circulation in order to avoid platelet aggregation and atherosclerosis development.

Reinforcing this line of reasoning, we have shown that the use of different concentrations of ADP as agonist did not lead to differences in platelet aggregation between RRMS patients and the control group (Fig. 6). Although this finding differs from previous studies that found significantly increased ADP-induced platelet aggregation in MS patients [7], we must consider the fact that these differences may be attributed to the phase and severity of the disease. For example, sensitivity to ADP is much more pronounced in the progressive phase and during or shortly after acute relapse [7]. In this sense, it is important to consider that in the present study all the patients evaluated were in a stable phase (remission) and also that the number of the subjects evaluated was small.

Finally, in order to exclude the possibility of a direct effect of drugs commonly used in the treatment of MS, we investigated the influence of interferon β , paracetamol and clonazepam on NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities in platelets. Interferon β has been approved for use in the treatment of RRMS; however, side effects such as fever and general discomfort have been documented, and these symptoms have been preventively treated with paracetamol [38, 39]. In addition, clonazepam is indicated for the treatment of the spasticity, tremors and anxiety associated with MS [39]. Our results demonstrate that these drugs did not alter NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities (data not show). Consequently, we believe that the enzyme inhibition observed in the present study was not affected by the medications used by the patients.

In conclusion, we report, for the first time, that the purinergic enzymatic cascade in platelets is altered in RRMS patients. This finding supports the hypothesis that enzymatic alterations may contribute to modifications in coagulation parameters in this disease. We hope that this will contribute to better understanding the ethiopathogenesis

and clinical characteristics of MS, and we believe that additional studies are necessary to further comprehend the involvement of nucleotide hydrolyzing enzymes and their usefulness as a possible therapeutic window in demyelinating diseases such as MS.

Acknowledgments The authors wish to thank the neurologist Juarez Lopes and the MS patients who contributed to this study, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

1. Fox R, Bethoux F, Goldman M, Cohen J (2006) Multiple sclerosis: advances in understanding diagnosing and treating the underlying disease. *Clin J Med* 73:91–102
2. Reipert B (2004) Multiple sclerosis: a short review of the disease and its differences between men and women. *J Mens Health Gend* 4:334–340
3. Wakefield A, More L, Difford J, McLaughlin J (1994) Immunohistochemical study of vascular injury in acute multiple sclerosis. *J Clin Pathol* 47:129–133
4. Aksungar F, Topkaya A, Yildiz Z, Sahin S, Turk U (2008) Coagulation status and biochemical and inflammatory markers of multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 15:393–397
5. Bunyan M, Ogunniyi A (1997) Incidental cerebral venous thrombosis in a patient with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 149:191–194
6. Vandenberghe N, Debouverie M, Anxionnat R, Clavelou P, Bouly S, Weber M (2003) Cerebral venous thrombosis in four patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 10:63–66
7. Neu I, Prosiogel M, Pfaffenrath V (1982) Platelet aggregation and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 66:497–504
8. Sheremata W, Iy W, Horstman L, Ahan Y, Alexander S, Minagar A (2008) Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *J Neuroinflamm* 5:1–6
9. Wagner D, Burger P (2003) Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2131–2137
10. Millar J, Merrett J, Dalby A (1966) Platelet stickiness in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 29:187–189
11. Zimmermann H (1999) Nucleotides and cd39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. *Nature* 5:987–988
12. Wolfe D, Yang J, Brass L (2001) ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest* 107:1503–1505
13. Anfossi G, Russo I, Massucco P, Mattiello L, Cavalot F, Balbo A, Trovati M (2002) Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. *Thromb Res* 105:71–78
14. Soslau G, Youngprapakorn D (1997) A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1355:131–140
15. Birk A, Broekman J, Gladek E, Robertson H, Drosopoulos J, Marcus A, Szeto H (2002) Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J Lab Clin Med* 140:166–175
16. Yegutkin G (2008) Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783:673–694
17. Robson S, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–430

18. Stefan C, Jansen S, Bollen M (2006) Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal* 2:361–370
19. Colgan S, Etlzsching H, Eckle T, Thompson L (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2:351–360
20. Franco R, Casadó V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela E, Lluís C (1997) Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 52:283–294
21. Zimmermann H, Mishra S, Shukla V, Langer D, Gampe K, Grimm I, Delic J, Braun N (2007) Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *An R Acad Nac Farm* 73:537–566
22. Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K, Robson R (2006) Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 36:217–222
23. McDonald W, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H, Lublin F, McFarland F, Paty D, Polman C, Reingold S, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, Noort S, Weinshenker B, Wolinsky J (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121–127
24. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis J (1996) ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E.C. 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7:225–230
25. Lunkes G, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch V, Mazzanti C, Schetinger M (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 109:189–194
26. Chan K, Delfert D, Junger D (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–378
27. Flürstenau C, Trentin D, Barreto-Chaves M, Sarkis J (2006) Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as a part of multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 17:84–91
28. Guisti G, Galanti B (1984) Colorimetric method. In: Bergemeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*. VerlagChemie, Weinheim, pp 315–323
29. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
30. Buchwalder P, Buclin T, Trinchard I, Munafo A, Biollaz J (2000) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of IFN- β in healthy volunteers. *J Interferon Cytokine Res* 20:857–866
31. Crevoisier C, Delisle MC, Joseph I, Foletti G (2003) Comparative single-dose pharmacokinetics of clonazepam following intravenous, intramuscular and oral administration to healthy volunteers. *Eur Neurol* 49:173–177
32. Wang A, Sun J, Feng H, Gao S, He Z (2007) Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in human plasma by LC-ESI-MS. *Chromatografia* 67:281–285
33. Maldonado P, Corrêa M, Becker L, Flores C, Moretto B, Morsch V, Schetinger M (2006) Ectonucleotidase Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. *Clin Biochem* 41:400–406
34. Schetinger M, Morsch V, Bonan C, Wyse A (2007) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 31:77–98
35. Spanevello R, Mazzanti C, Maldonado P, Zanin R, Morsch A, Hannel L, Mazzanti A, Festugatto R, Graça D, Schmatz R, Loro V, Schetinger M, Morsch V (2007) Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon- β . *Life Sci* 80:1109–1114
36. Gayle R, Maliszewski C, Gimpel S, Schoenborn M, Caspary G, Richards C, Brasel K, Price V, Drosopoulos J, Islam N, Alyoncheva T, Broekman M, Marcus A (1998) Inhibition of platelet function by recombinant soluble Ecto-ADPase/CD39. *J Clin Invest* 101:1851–1859
37. Enjyoji K, Sévigni J, Lin Y, Frenette P, Christie P, Esch J, Imai M, Edelberg J, Rayburn H, Lech M, Boeler D, Ciszmadia E, Wagner D, Robson S, Rosenberg R (1999) Target disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature* 5:1010–1017
38. Reeb J, Hass J, Gabriel K, Fuhbrott A, Fiola M (2002) Both paracetamol and ibuprofen are equally effective in managing flu-like symptoms in relapsing-remitting multiple sclerosis patients during interferon beta-1a (AVONEX®) therapy. *Mult Scler* 8:15–18
39. Wakerley B, Nicholas R, Malik O (2008) Multiple sclerosis. *Medicine* 36:625–629

Capítulo 3

Artigo II

Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated

Roselia Spanevello, Cinthia M. Mazzanti, Roberta Schamtz, Maragarete
Bagatini, Naiara Stefanello, Maisa Correa, Rosilene Kaizer, Paula Maldonado,
Alexandre Mazzanti, Dominguita L. Graça, Tessie B. Martins, Cristiane Danesi,
Vera M. Morsch, Maria Rosa C. Schetinger

Publicado na Revista Brain Research Bulletin



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainresbull

Research report

Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated

Roselia Spanevello^a, Cinthia M. Mazzanti^b, Roberta Schmatz^b, Margarete Bagatini^b, Naiara Stefanello^b, Maisa Correa^b, Rosilene Kaizer^b, Paula Maldonado^b, Alexandre Mazzanti^c, Dominguita L. Graça^d, Tessie B. Martins^d, Cristiane Danesi^d, Vera M. Morsch^b, Maria Rosa C. Schetinger^{b,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, 91005-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Laboratório de Cirurgia Experimental, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^d Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2009

Received in revised form 24 April 2009

Accepted 13 May 2009

Available online 20 May 2009

Keywords:

Ectonucleotidases

Platelets

Synaptosomes

Oxidative stress

Vitamin E

Demyelination

ABSTRACT

NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes and platelets and oxidative stress parameters, such as TBARS levels, non-protein thiols and catalase activity were analyzed in rats submitted to demyelination by ethidium bromide (EB) and treated with vitamin E. The following groups were studied: I control (saline); II (canola oil); III (vitamin E); IV (EB) and V (EB and vitamin E). 2 mg/kg of vitamin E were injected intraperitoneally in animals from groups III and V for seven days. After this time, the animals were submitted to euthanasia and samples were collected for biochemical assays. The results showed that NTPDase and 5'-nucleotidase activities were significantly increased in synaptosomes and platelets of rats from group IV when compared with the groups I, II, III and V ($p < 0.05$). When demyelinated rats were treated with vitamin E (group V), NTPDase activity in synaptosomes and platelets was reduced to control level, while 5'-nucleotidase activity was significantly increased in relation to the control group ($p < 0.05$). TBARS levels and non-protein thiols were significantly increased in group IV ($p < 0.05$), while catalase activity was significantly decreased in this group when compared with the control group ($p < 0.05$). No differences in TBARS levels, non-protein thiols and catalase activity were observed in groups I, II, III and V. These findings demonstrate that ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and some parameters of oxidative stress were altered after a demyelinating event on the nervous system and that treatment with vitamin E modulated adenine nucleotide hydrolysis and altered oxidative stress parameters in this experimental condition.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Extracellular adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their nucleoside derivative, adenosine, are important signaling molecules that mediate diverse biological and pathological processes [36,39]. Studies have demonstrated that ATP, ADP and adenosine regulate the thromboregulation mechanism [38,55] and have a diverse array of functions in the nervous system, such as neurotransmission [10]; neuroprotection [13]; proliferation of glial cells [18] and myelin formation [1,50].

Signaling events, induced by extracellular adenine nucleotides, are controlled by the action of ectonucleotidases, including ecto-

nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) and ecto-5'-nucleotidase/CD73 [42,53]. These enzymes constitute an organized enzymatic cascade for the regulation of nucleotide-mediated signaling, controlling rate, degradation and nucleoside formation [3,54,51]. Therefore, over recent decades the importance of NTPDase and 5'-nucleotidase has been studied in many pathological conditions, such as cancer [2], diabetes [29] and in experimental models of ischemia [43], epilepsy [5] and demyelination [30,48,49].

Demyelination is the pathological hallmark of multiple sclerosis (MS), the most common chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) [37]. MS is characterized by a demyelination of axons which leads to a deficiency or complete loss in the transmission of nerve impulses [14,35]. As its precise cause remains unclear, it is not possible to prevent MS, nor is there a cure. Thus, a number of therapeutic strategies has been explored experimentally and clinically in order to improve reconstruction of the lost myelin sheaths [6,19]. Data from current research show that the

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 9557; fax: +55 55 3220 8978.
E-mail addresses: mariaschetinger@gmail.com, mariachitolina@gmail.com (M.R.C. Schetinger).

treatment for MS might involve a combination of immunomodulation, remyelination and neuroprotection [35].

Vitamin E is the generic term for a group of compounds known as tocopherols and tocotrienols, of which α -tocopherol has been shown to have the greatest biological activity [52]. The antioxidant property of vitamin E is well established in the literature [24], however evidence has demonstrated that this compound also possesses anti-inflammatory [21], antiaggregant [25] and neuroprotective properties [34]. Based on these findings, vitamin E has become attractive as a therapeutic agent in the treatment of several diseases and clinical trials have focused on the use of vitamin E in the treatment of pathologies of the nervous system such as Parkinson's and Alzheimer's disease [40,52]. However, the effects of vitamin E on the demyelination model have been little studied.

Considering that vitamin E is a potent antioxidant, antiaggregant and neuroprotector, the main aim of this study was to evaluate the effects of vitamin E on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in synaptosomes and platelets and on oxidative stress parameters in rats experimentally demyelinated by ethidium bromide (EB), in order to investigate the interaction of this compound in demyelinating events.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Nucleotides, Trizma Base, Percoll, HEPES and Coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Vitamin E acetate ($C_{31}H_{52}O_3$; dl α -tocopherol acetate) was obtained from Pharma Nostra (São Paulo, Brazil). All other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

2.2. Animals

Adult female Wistar rats (70–90 days; 220–280 g) were obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil. The animals were maintained at a constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. The study was performed in accordance with the University Ethics Committee Guidelines for experiments with animals.

2.3. Experimental demyelination with EB

The animals were randomly divided into five groups (10 animals each group): I control (saline); II (canola oil); III (vitamin E); IV (EB) and V (EB and vitamin E). For the surgical demyelination procedure, the animals were anesthetized with ketamine chloridate and xylazine (5:1; 0.1 ml/100 g). With the aid of a roof motor of orthodontic use and a drill number 2, a hole was made 0.85 cm to the right of the bregma until exposing the duramater. With the use of a Hamilton syringe with a removable needle of caliber 26 s, the solutions were injected 2 mm deep into the subcortical white water. Five microliters of EB (0.1%) were injected in the animals from groups IV and V, and the same volume of 0.9% saline solution was injected in the animals from groups I, II and III. The duramater was left open and the skin, together with the remainder of the subcutaneous tissue, was sutured with a 4.0 nylon thread.

2.4. Treatment with vitamin E

Four hours after the surgical procedure, the animals from groups III and V were given 2 mg/kg vitamin E diluted in canola oil (1 ml/kg) intraperitoneally (i.p.) for seven days. The animals from groups I and IV were given saline solution i.p. and those from group II were given canola oil i.p. Seven days after the surgical procedure, the animals were submitted to euthanasia and samples were collected for enzyme assays.

2.5. Histological and immunohistochemistry analysis

At seven days, three rats from every group were killed by perfusion with 0.09% saline with 0.01 M EDTA under deep anesthesia. Brain stem sections were collected, fixed in metacarn (60% methanol, 30% acetic acid, 10% chloroform), dehydrated and embedded in paraffin wax by standard methods. Sections (5 μm) were collected on glass slides pretreated with 4% silyane. The avidin–biotin complex method was used for immunolabelling. The sections were incubated during 2 h at room temperature with the polyclonal primary antibody anti-GFAP. The sections were incubated for 30 min with a biotinylated secondary antibody and for 30 min with the complex streptavidin–peroxidase. Immunoreactivity was observed using diaminobenzidine as the chromogen. The sections were counterstained with Harris hematoxylin.

2.6. Morphometric analysis of the lesion

Histological sections stained by hematoxylin and eosin (H&E) were analyzed. The mean area (mm) of the demyelinating lesion was measured using a light microscope, with an increase of 100 \times , using a system of processing and analysis of images (IMAGE PRO PLUS[®]) coupled with a binocular microscope (OLYMPUS, BX51/BX52) and video camera (OLYMPUS, OLY-200) for the acquisition of the microscopic image.

2.7. Synaptosome preparation

The cerebral cortex was homogenized in 10 volumes of an ice-cold medium (medium I), consisting of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, with a pH of 7.5, in a motor driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described by Nagy and Delgado-Escueta [31] using a discontinuous Percoll gradient. The pellet was suspended in an isoosmotic solution and the final protein concentration was adjusted to 0.4–0.6 mg/ml. Synaptosomes were prepared fresh daily, maintained at 0–4 $^\circ\text{C}$ throughout the procedure and used for enzymatic assays.

2.8. Platelet separation

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes et al. [28], with the following minor modifications. Total blood was collected by cardiac puncture with 0.120 M sodium citrate as anticoagulant. The total blood–citrate system was centrifuged at 160 \times g during 15 min. The PRP was centrifuged at 1400 \times g for 30 min and washed twice by centrifugation at 1400 \times g for 10 min with 3.5 mM HEPES isoosmolar buffer. The washed platelets were resuspended in HEPES isoosmolar buffer and adjusted to 0.4–0.6 mg of protein per milliliter.

2.9. NTPDase and 5'-nucleotidase assays

The NTPDase enzymatic assay of the synaptosomes was carried out in a reaction medium containing 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl_2 , 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 μl as described in a previous study from our laboratory [44]. The 5'-nucleotidase activity was determined essentially by the method of Heymann et al. [22] in a reaction medium containing 10 mM MgSO_4 and 100 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 μl .

In platelets, the reaction medium for NTPDase activity contained 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μl as described by Lunkes et al. [28]. For AMP hydrolysis, the chemical reagents used were the same described for NTPDase activity, except that 5 mM CaCl_2 was replaced by 10 mM MgCl_2 .

In both synaptosomes and platelets, 20 μl of enzyme preparation (8–12 μg of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to obtain a final concentration of 1.0 mM and incubation proceeded for 20 min (synaptosomes) and 60 min (platelets). For AMP hydrolysis, 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described and the final concentration of the nucleotide AMP added was 2 mM.

In all cases, reactions were stopped by the addition of 200 μl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [11] using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding platelets after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.10. Oxidative stress parameters

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS in serum samples according to a modified method of Jentsch et al. [23] and the results were expressed as nanomole MDA per milliliter of plasma. Non-protein thiols were assayed in plasma, evaluated by the method of Ellman [15] and expressed as $\mu\text{mol/ml}$ of plasma. The determination of catalase activity in blood was carried out in accordance with a modified method of Nelson and Kiesow [32]. This assay involves the change in absorbance at 240 nm, for 2 min, due to catalase dependent decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2). The enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient (0.0432 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$) as the results were expressed as pmoles per milligram protein.

2.11. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [7] using serum albumin as standard.

2.1.2. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests. $p < 0.05$ was considered to represent a significant difference in both analyses used. All data were expressed as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Histological, immunohistochemical and morphometric analysis of the demyelinated lesion

Seven days after the EB injection to the subcortical area in the animals from group IV, the lesions consisted of areas of demyelination seen as status spongiosus of the tissue (Fig. 1C, group IV). The disappearance of astrocytes (GFAP) from the lesion centre was also observed in this group (Fig. 1D) when compared to the control group (Fig. 1A and B, group I). In the group demyelinated and treated with vitamin E (group V), a smaller demyelinated area was detected without astrocytes at the center of the lesion, whereas GFAP immunolabelled astrocytes were observed at the periph-

ery of the lesion (Fig. 1E and F). In addition, the morphometric analysis demonstrated that the area of demyelination in group V was significantly smaller ($46,100 \text{ mm} \pm 11,000 \text{ mm}$) after the treatment with vitamin E when compared with the lesions induced by EB alone (group IV) ($361,500 \text{ mm} \pm 20,200 \text{ mm}$) ($p < 0.0001$) (Fig. 2).

3.2. NTPDase and 5'-nucleotidase in synaptosomes and platelets

NTPDase and 5'-nucleotidase activities were altered in synaptosomes of rats submitted to experimental demyelination. The results showed a significant increase in NTPDase activity in both substrates used; ATP ($F(4,22) = 7.01$ $p < 0.05$) and ADP ($F(4,21) = 5.27$ $p < 0.05$). Post hoc comparisons by Duncan's test revealed that ATP and ADP hydrolysis were significantly higher in synaptosomes of rats submitted to subcortical demyelination (group IV) when compared with the groups I, II, III and V (Fig. 3A and B). 5'-nucleotidase activity was also significantly increased in synaptosomes ($F(4,21) = 20.75$ $p < 0.01$), and post hoc comparisons by Duncan's test revealed that

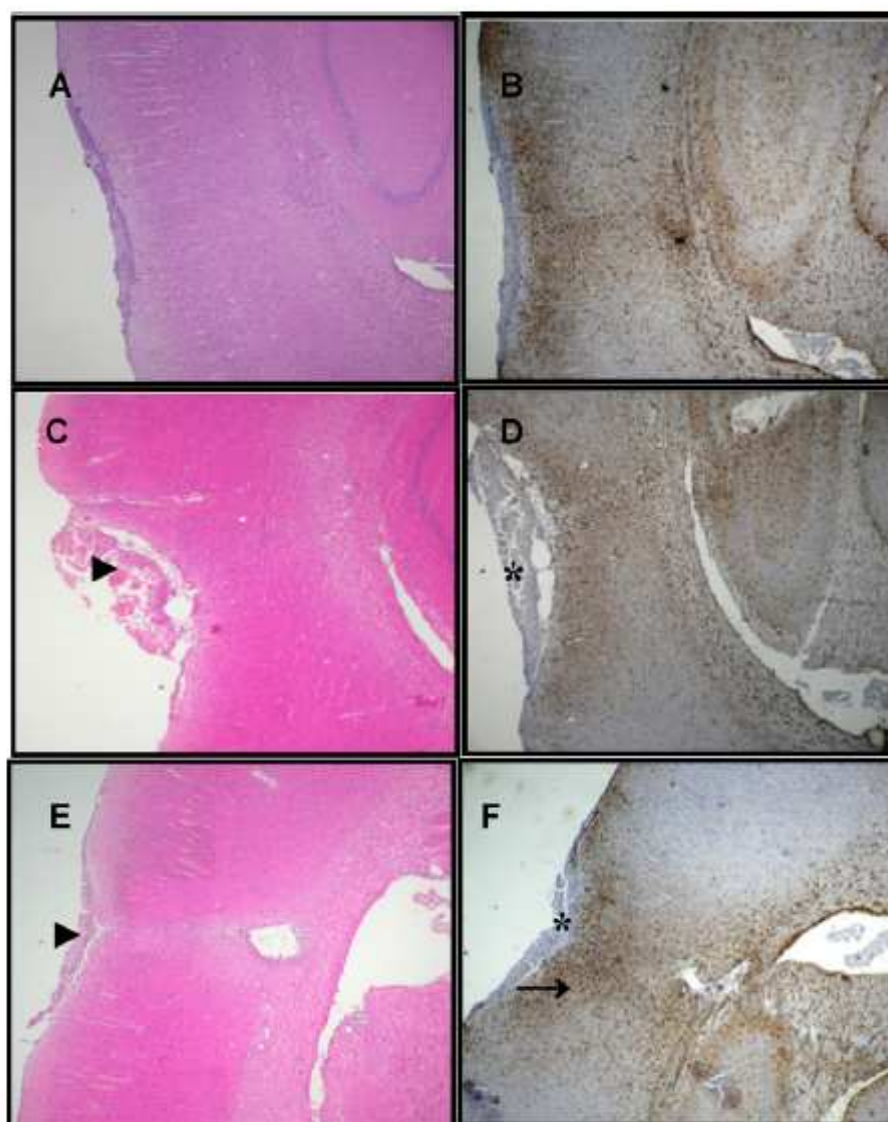


Fig. 1. Histological normal aspect of the subcortical region H&E (A) and (B) astrocytic GFAP of group I. In group IV, seven days after EB injection there is a large demyelinating lesion (▶ C) absence of GFAP positive cells in the lesion center (* D). Histological aspect of the subcortical area of rats demyelinated and treated with Vitamin E (group V) (▶ E). Astrocytes are still absent from the center of the lesion (→ F), although GFAP marked astrocytes are observed at the periphery of the lesion (→ F) (object 10 \times).

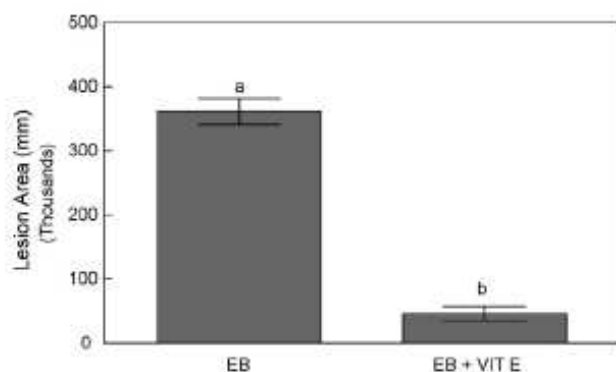


Fig. 2. Representation of the size of the demyelination lesion (mm) in rats demyelinated by ethidium bromide (EB) (group IV) and rats demyelinated and treated with vitamin E (EB + Vit E) (group V). Bars represent mean \pm SEM. a and b indicate differences between groups.

AMP hydrolysis was significantly higher in groups IV and V when compared with the groups I, II and III (Fig. 3C).

The results for NTPDase and 5'-nucleotidase in platelets were similar to those found in synaptosomes. In demyelinated rats (group IV), a significant increase in NTPDase activity was observed with ATP ($F(4,31) = 2.93$ $p < 0.05$) and ADP ($F(4,25) = 3.01$ $p < 0.05$) when compared with the groups I, II, III and V (Fig. 4A and B). 5'-nucleotidase activity also was increased in platelets ($F(4,31) = 3.88$ $p < 0.05$) and post hoc comparisons by Duncan's test revealed that AMP hydrolysis was significantly higher in groups IV and V when compared with the groups I, II and III (Fig. 4C).

In addition, it is important to note that controls were performed to correct for vehicle (canola oil) interference and no difference between vehicle and the control enzyme was observed (Figs. 3 and 4A–C).

3.3. Oxidative stress parameters

Experimental demyelination also altered some oxidative stress parameters. The results showed a significant increase in TBARS levels ($F(4,21) = 3.35$ $p < 0.05$) and non-protein thiols ($F(4,15) = 7.36$ $p < 0.05$) in the group demyelinated by EB (group IV) when compared with the groups I, II, III and V (Table 1). Catalase activity was significantly decreased in group IV ($F(4,14) = 3.07$ $p < 0.05$) when compared with groups I, II, III and V (Table 1) ($p < 0.05$). In demyelinated rats treated with vitamin E, there were no differences in TBARS levels, non-protein thiols and catalase activity when compared with the control group (Table 1, group V).

4. Discussion

In the present study, we investigated the effects of vitamin E on NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes and

Table 1

Oxidative stress parameters in rats demyelinated with ethidium bromide (EB) and treated with vitamin E.

Groups	TBARS (nmol MDA/ml)	Non-protein thiols (μ mol/ml of plasma)	Catalase (pmol/mg of protein)
I	13.12 \pm 0.75	1.20 \pm 0.10	9.96 \pm 0.64
II	13.88 \pm 1.02	1.12 \pm 0.12	10.43 \pm 0.41
III	12.98 \pm 0.38	1.12 \pm 0.19	10.20 \pm 0.86
IV	19.64 \pm 1.11*	1.55 \pm 0.13*	5.70 \pm 0.50*
V	12.96 \pm 2.11	1.07 \pm 0.10	10.99 \pm 0.97

Groups: I, (saline); II, (canola oil); III, (vitamin E); IV (EB) and V (EB + vitamin E). Values represent mean \pm SEM.

* Different from the others in the same column ($p < 0.05$).

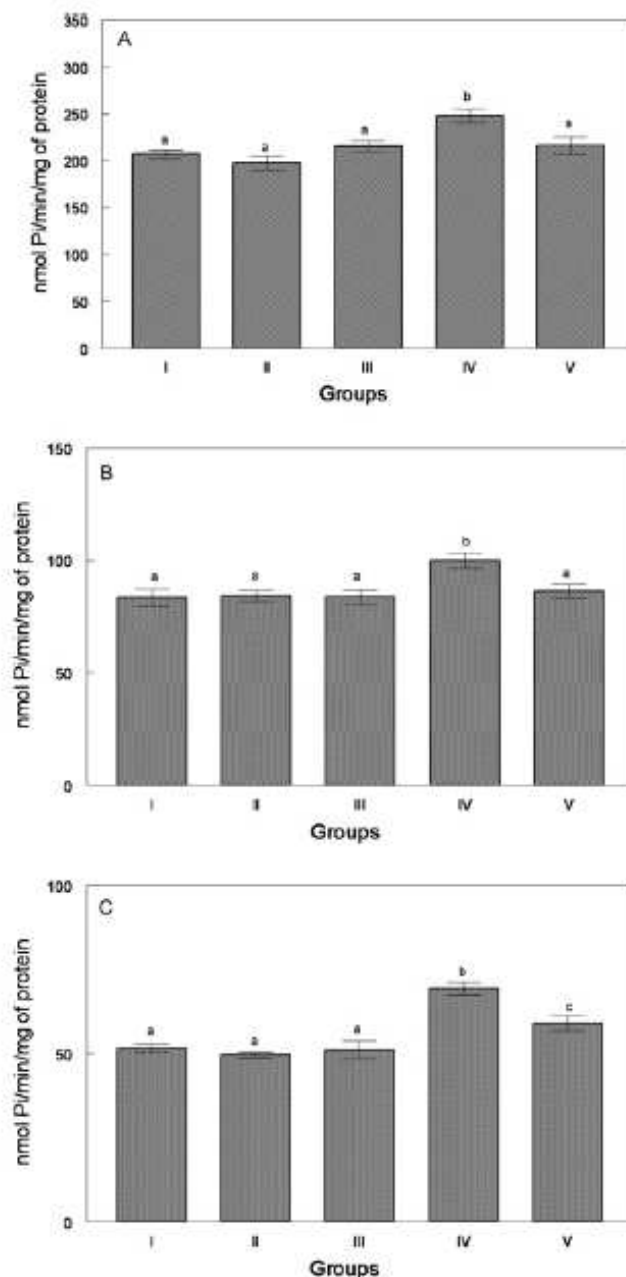


Fig. 3. ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in cerebral cortex synaptosomes of rats demyelinated with EB and treated with vitamin E. Groups: I (saline); II (canola oil); III (vitamin E); IV (EB) and V (EB + vitamin E). Bars represent mean \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$).

platelets as well as on oxidative stress parameters in a model of subcortical demyelination in rats.

Toxic demyelination by ethidium bromide (EB) is one of the most commonly used models for exploring the reparative capacity of the CNS [6]. EB induces focal demyelination by selectively damaging glial cells, which include oligodendrocytes (CNS myelin forming cells) and astrocytes [20]. Using this model, our group has previously demonstrated that an up-regulation of NTPDase and 5'-nucleotidase activities occurs in cerebral cortex synaptosomes after the induction of demyelination in the pons [48]. Similarly, in the present study we also observed an increase in ectonucleotidases activities in synaptosomes after the induction of subcortical

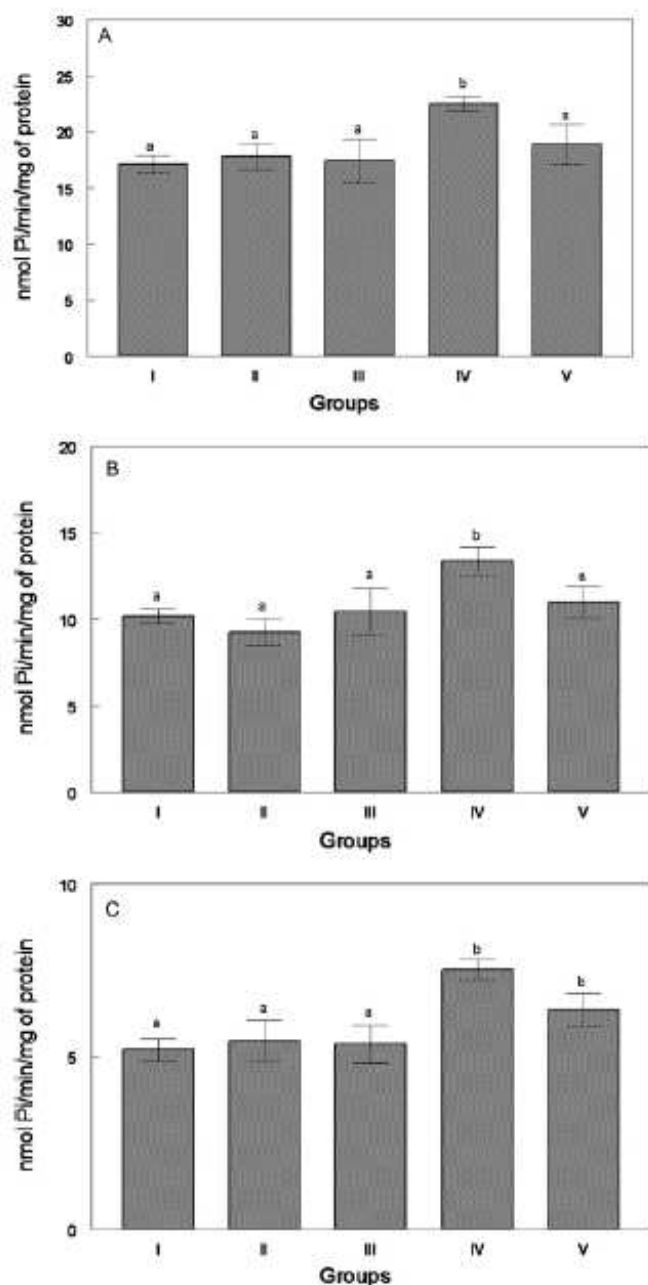


Fig. 4. ATP (a), ADP (b) and AMP (c) hydrolysis in platelets of rats demyelinated with EB and treated with vitamin E. Groups: I (saline); II (canola oil); III (vitamin E); IV (EB) and V (EB + vitamin E). Bars represent mean \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$).

demyelination (Fig. 3A–C, group IV). Taken together, these results indicate that while demyelination may occur in different brain regions, this event interferes with the activity of enzymes that play crucial roles in the CNS.

NTPDase and 5'-nucleotidase are enzymes that represent important therapeutic targets as they interfere with a variety of physiological and pathological functions mediated by nucleotides [42,45]. NTPDase hydrolyses ATP and ADP to AMP and, subsequently, the enzyme 5'-nucleotidase catalyzes AMP hydrolysis to form adenosine [53]. The action of these two enzymes is very important to control adenine nucleotides levels, and the duration and extent of their respective receptor activation [3,51,54].

The release of adenine nucleotides on a massive scale occurs in brain injury and despite the beneficial role of ATP, the accumulation of this molecule may promote an increase in intracellular calcium levels, increasing cellular damage [17]. On the other hand, adenosine is an important molecule in the neuromodulation and neuroprotection of CNS [13,39]. Most importantly, adenosine acts as a potent neuron-glia transmitter promoting oligodendrocyte progenitor differentiation and increasing myelination through activation of adenosine receptors [50]. In this context, after the demyelinating event, ectonucleotidase activities are likely to be modulated in a way that facilitates the production of adenosine, an important molecule for remyelination.

No differences in NTPDase activity were observed in synaptosomes in rats demyelinated and treated with vitamin E. However, 5'-nucleotidase activity was increased when compared to the control group (Fig. 3A–C, group V). Studies carried out with Vitamin E have provided evidence that this compound has neuroprotective properties, mainly by reducing the degree of oxidative stress [24,40,52]. On the other hand, these findings also demonstrate the need to consider that modulation of ectonucleotidases by vitamin E may also be a protective function, by which extracellular ATP/ADP are kept within physiological levels and adenosine production is increased.

The next set of experiments were performed in order to evaluate NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of rats after subcortical demyelination associated with vitamin E treatment. Our results showed that the activities of these enzymes were also increased in platelets of demyelinated rats (Fig. 4A–C, group IV). It is known that demyelinating diseases such as MS cause alterations in platelet functions [46]. Evidence suggests that these alterations may be due to the breakdown of the neural tissue, liberating myelin basic protein into the blood, which may alter the surface membrane of platelets [12,33]. Accordingly, due to the fact that NTPDase and 5'-nucleotidase are membrane enzymes, alterations in the membrane of platelets by myelin basic protein could be a decisive factor in changing the conformational state of the enzyme molecules, which would explain the alterations in the activity of these ectonucleotidases after the demyelinating event.

In addition, NTPDase and 5'-nucleotidase are crucial enzymes for thromboregulation mechanisms by controlling the extracellular levels of adenine nucleotides in the vascular system [3]. Studies have demonstrated that ATP is an important vasoconstrictor and ADP is the main promoter of platelet aggregation, whereas adenosine is a potent inhibitor of this aggregation and a modulator of vascular tone [38,47,55]. Based on our results, an increase in platelet ectonucleotidase activities may cause an imbalance in the ratio of nucleotides/nucleosides in the circulation, contributing to vascular disorders in demyelinating diseases.

On the other hand, when demyelinated rats were treated with vitamin E, this compound reverted the increase of NTPDase activity and increased 5'-nucleotidase activity in platelets when compared to the control group (Fig. 4A–C, group V) indicating that vitamin E interferes with purinergic signaling. Studies have indicated that vitamin E may inhibit platelet aggregation and adhesion [16,25], however the mechanism(s) responsible for this effect is few known. Based on this evidence, we can infer that vitamin E is an important compound involved in thromboregulation mechanisms in demyelinating diseases through the modulation of ectonucleotidase activities in platelets.

Another important aspect to be discussed is that vitamin E is the major lipid-soluble antioxidant and plays the largest role in protecting cell membranes from oxidative damage [4,9]. In this sense, due to the fact that NTPDase and 5'-nucleotidase are membrane enzymes and that demyelinating events may increase free radical formation, it is possible that enzyme alterations in cerebral cortex synaptosomes and platelets could be mediated by oxidative stress.

In this context, the effect of vitamin E may be very important as a free radical scavenger, stabilizing the curvature and fluidity of the cell membranes.

Reinforcing the above-mentioned point, we demonstrated in this study that oxidative stress markers such as TBARS and catalase activity were altered after subcortical demyelination (Table 1). However, our findings also revealed an increase in non-protein thiol levels, suggesting that after the demyelinating event the organism increases thiols as an antioxidant defense. These results agree in part with those obtained in patients with MS, where oxidative stress parameters in blood and cerebrospinal fluid were consistently found to be increased, while antioxidant defenses were found to be decreased, suggesting that oxidative stress may be associated with the pathogenesis of demyelinating diseases [26,27]. An important point to be observed is that when demyelinated rats were treated with vitamin E, alterations in TBARS and catalase were reverted to control levels, demonstrating that vitamin E may have an important antioxidant role in reducing the damage caused by free radicals in demyelinating events.

In our study, the neuroprotective effect of vitamin E was proven by the morphometric analysis of demyelinating lesions (Figs. 1 and 2). The data from this analysis revealed that the demyelinating lesions were smaller in rats treated with vitamin E when compared with the demyelinated group (Fig. 2). Although there are few reports demonstrating the relevant antioxidant function of vitamin E *in vivo*, we may suggest that neuroprotective properties of vitamin E observed in this study are attributed to antioxidant activity associated with modulation in adenosine nucleotide hydrolysis. In addition, we suggest that vitamin E may also exert its functions in certain domains in membranes, influencing signaling cascade with subsequent effects on the induction and suppression of genes [8,41]. Taken together, these findings support the hypothesis that this compound may be very important in the reduction or prevention of demyelinating lesions that occur in MS.

In conclusion, our findings reveal that adenosine nucleotide hydrolysis in synaptosomes and platelets, as well as oxidative stress parameters, were altered after a demyelinating event in the subcortical region. Since ATP and adenosine have important roles in brain and platelets in response to injury, the up-regulation of these enzymes could have potential therapeutic importance. In addition, this study highlights the protective role of vitamin E in reducing the size of lesions and the degree of oxidative stress induced by demyelination, suggesting that this compound may constitute a therapeutic window in demyelinating diseases such as MS.

Acknowledgements

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] C. Agresti, M. Meomartini, S. Amadio, E. Ambrosini, C. Volonté, F. Aloisi, S. Visentin, ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors, *Brain Res. Rev.* 48 (2005) 157–165.
- [2] M. Araújo, J. Rocha, A. Morsch, R. Zanin, R. Bauchspiess, V. Morsch, M. Schetinger, Enzymes that hydrolyze adenosine nucleotides in platelets from breast cancer patients, *Biochim. Biophys. Acta* 1740 (2005) 421–426.
- [3] B. Atkinson, K. Dwyer, K. Enjyoji, S. Robson, Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family and thrombus formation: potential as therapeutic targets, *Blood Cells Mol. Dis.* 36 (2006) 217–222.
- [4] J. Atkinson, R. Epand, R. Epand, Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review, *Free Rad. Biol. Med.* 44 (2008) 739–764.
- [5] C.D. Bonan, R. Walz, G.S. Pereira, P. Worn, A. Battastini, E.A. Cavaleiro, I. Izquierdo, J. Sarkis, Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal epilepsy, *Epilepsy Res.* 39 (2000) 229–238.
- [6] E. Bondan, M. Lallo, L. Sinhorini, L. Pereira, D. Graça, The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in wistar rats, *J. Submicr. Cytol. Pathol.* 32 (2000) 603–612.
- [7] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [8] R. Brigelius-Flohé, Vitamin E: the shrew waiting to be tamed, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 543–554.
- [9] R. Brigelius-Flohé, M. Traber, Vitamin E: function and metabolism, *Faseb J.* 13 (1991) 1145–1155.
- [10] G. Burnstock, Historical review: ATP as a neurotransmitter, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 166–176.
- [11] K. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–378.
- [12] T. Chiang, J. Whitaker, A. Kang, The effect of myelin basic protein on the endogenous phosphorylation of platelets, *Thromb. Res.* 25 (1982) 487–499.
- [13] R.A. Cunha, Adenosine as a neuromodulator and as homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors, *Neurochem. Int.* 38 (2001) 107–125.
- [14] S. Dhib-Jalbut, D. Arnold, D. Cleveland, M. Fisher, R. Friedlander, M. Mouradian, S. Przedborski, B. Trapp, T. Wyss-Coray, V. Yong, Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases, *J. Neuroimmunol.* 176 (2006) 198–215.
- [15] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [16] D. Emmert, J. Kirchner, The role of vitamin E in the prevention of heart disease, *Arch. Fam. Med.* 8 (1999) 537–542.
- [17] R. Feuvre, D. Brough, N. Rothwell, A.T.P. Extracellular, P2X7 receptors in neurodegeneration, *Eur. J. Pharmacol.* 447 (2002) 261–269.
- [18] R.D. Fields, G. Burnstock, Purinergic signaling in neuron – glia interactions, *Nat. Rev.* 7 (2006) 423–436.
- [19] F. Gilli, F. Marnetto, M. Caldano, A. Sala, S. Malucchi, A. Di Sapió, M. Capobianco, A. Bertoloto, Biological responsiveness to first injections of interferon beta in patients with multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 158 (2005) 195–203.
- [20] D. Graça, E. Bondan, L. Dias, C. Fernandes, P. Maiorka, Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system, *Arq. Neuropsiquiatr.* 59 (2001) 358–361.
- [21] P. Grammas, L. Hamdheydari, E.J. Benaksas, S. Mou, Q.N. Pye, W.J. Wechter, R.A. Floyd, C. Stewart, K. Hensley, Anti-inflammatory effects of tocopherol metabolites, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 (2004) 1047–1052.
- [22] D. Heymann, M. Reddington, G.W. Kreutzberg, Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain, *J. Neurochem.* 43 (1984) 971–978.
- [23] A.M. Jentsch, H. Bachmann, P. Furst, H.K. Biesalski, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 251–256.
- [24] S.M. Kashif, R. Zaidi, N. Banu, Antioxidant potential of vitamin A, E, and C in modulating oxidative stress in rat brain, *Clin. Chim. Acta* 340 (2004) 229–233.
- [25] G. Kobzar, V. Mardla, N. Samel, Effects of alpha-tocopherol, L-arginine and quercetin on aggregation of human platelets, *Nutr. Res.* 25 (2005) 569–575.
- [26] M. Koch, G. Ramsarsang, G. Arutjunyan, M. Stepanov, A. Teelken, D. Heersema, J. Heijer, Oxidative stress in serum and peripheral blood leucocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis, *J. Neurol.* 253 (2006) 483–487.
- [27] K. Lundun-Olesen, Etiology of multiple sclerosis: role of superoxide dismutase, *Med. Hypothesis* 54 (2000) 321–322.
- [28] G. Lunkes, D. Lunkes, V. Morsch, C. Mazzanti, A. Morsch, V. Miron, M.R. Schetinger, NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan - induced diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 65 (2004) 1–6.
- [29] G. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V. Morsch, C. Mazzanti, M. Schetinger, Enzymes that hydrolyze adenosine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb. Res.* 109 (2003) 189–194.
- [30] C. Mazzanti, R. Spanevello, A. Morsch, R. Zanin, V. Battisti, M. Ahmed, J. Gonçalves, A. Mazzanti, D. Graça, V. Morsch, M.R. Schetinger, Previous treatment with vitamin E alters adenosine nucleotide hydrolysis in platelets from adult rats experimentally demyelinated by ethidium bromide, *Life Sci.* 81 (2007) 241–248.
- [31] A. Nagy, A.V. Delgado-Escueta, Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using non-toxic isosmotic gradient material (Percoll), *J. Neurochem.* 43 (1984) 1114–1123.
- [32] D.P. Nelson, L.A. Kiesow, Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H_2O_2 solutions in the UV), *Anal. Biochem.* 49 (1972) 474–478.
- [33] I. Neu, M. Prosiogel, V. Pfaffenrath, Platelet aggregation and multiple sclerosis, *Acta Neurol. Scand.* 76 (1982) 497–504.
- [34] G. Onem, E. Aral, Y. Enli, E. Oguz, E. Coskun, H. Aybek, A. Cacan, M. Sacar, L. Bir, A. Baltalarli, C. Baycu, Neuroprotective effects of L-carnitine and vitamin E alone or in combination against ischemia-reperfusion injury in rats, *J. Surg. Res.* 131 (2006) 124–130.
- [35] L. Peterson, R. Fujinami, Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 184 (2006) 37–44.
- [36] M. Rathbone, P. Middlemiss, J. Gysbers, C. Andrew, M. Herman, J. Redd, R. Ciccarelli, P. Lorio, F. Caciagli, Trophic effects of purines in neurons and glial cells, *Prog. Neurobiol.* 59 (1999) 663–690.

- [37] B. Reipert, Multiple sclerosis: a short review of the disease and its differences between man and woman, *JMHG* 1 (2004) 334–340.
- [38] J.A. Remijn, Y. Wu, E.H. Jenning, J. Ijsseldijk, G. Willigen, P. Groot, J. Sixma, A. Nurden, P. Nurden, Role of ADP receptor P2y12 in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 686–691.
- [39] J.A. Ribeiro, A. Sebastião, A. Mendonça, Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications, *Prog. Neurobiol.* 68 (2003) 377–392.
- [40] R. Ricciarelli, F. Argellati, M. Pronzato, C. Domenicotti, Vitamin E and neurodegenerative diseases, *Mol. Aspects Med.* 28 (2007) 591–606.
- [41] G. Rimbach, A. Minihane, J. Majewicz, A. Fischer, J. Pallauf, F. Virgli, P. Weinberg, Regulation of cell signaling by the vitamin E, *Proc. Nutr. Soc.* 61 (2002) 415–425.
- [42] S. Robson, J. Sévigny, H. Zimmermann, The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance, *Purinergic Signal* 2 (2006) 409–430.
- [43] M. Schetinger, C. Bonan, R.C. Schierholt, A. Webber, N. Arteni, T. Emanuelli, R.D. Dias, J. Sarkis, C.A. Netto, Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: A possible link between preconditioning and adenosine production, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 7 (1998) 281–286.
- [44] M. Schetinger, N. Porto, M.B. Moretto, V.M. Morsch, V. Vieira, F. Moro, R.T. Neis, S. Bittencourt, H. Bonacorso, N. Zanatta, New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities, *Neurochem. Res.* 25 (2000) 949–955.
- [45] M.R. Schetinger, V. Morsch, C. Bonan, A. Wyse, NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health, *BioFactors* 31 (2007) 77–98.
- [46] W. Sheremata, W. Jy, L. Horstman, Y. Ahn, J. Alexander, A. Minagar, Evidence of platelet activation in multiple sclerosis, *J. Neuroinflamm.* 5 (2008) 27–32.
- [47] G. Soslau, D. Youngprapakorn, A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation, *Biochim. Biophys. Acta* 1355 (1997) 131–140.
- [48] R.M. Spanevello, C. Mazzanti, R. Kaizer, R. Zanin, D. Cargnelutti, L. Hannel, M. Correa, A. Mazzanti, R. Festugatto, D. Graça, M.R. Schetinger, V.M. Morsch, Apyrase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon β , *Neurochem. Res.* 31 (2006) 455–462.
- [49] R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, P.A. Maldonado, R. Zanin, A. Morsch, L. Hannel, A. Mazzanti, R. Festugatto, D. Graça, R. Schmatz, V.L. Loro, M.R. Schetinger, V.M. Morsch, Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta, *Life Sci.* 80 (2007) 1109–1114.
- [50] B. Stevens, S. Porta, L. Haak, V. Gallo, R. Fields, Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials, *Neuron* 36 (2002) 855–868.
- [51] N. Sträter, Ecto-5'-nucleotidase: structure function relationships, *Purinergic Signal* 2 (2006) 243–350.
- [52] G. Vatassery, T. Bauer, M. Dysken, High doses of vitamin E in the treatment of disorders of the central nervous system in the aged, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999) 793–801.
- [53] G. Yegutkin, Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 673–694.
- [54] H. Zimmermann, Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides, *Arch. Pharmacol.* 362 (2000) 299–309.
- [55] H. Zimmermann, Nucleotides and cd39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis, *Nat. Med.* 9 (1999) 987–988.

4. Discussão

Muitos estudos têm demonstrado que a NTPDase, a E-NPP, a 5'-nucleotidase e a ADA são enzimas que possuem um importante papel em mecanismos de trombaregulação, nas respostas imunes e inflamatórias, na neurotransmissão e na neuromodulação (Zimmermann et al., 2007; Yegutkin, 2008). As alterações na atividade destas enzimas têm sido descritas em várias condições patológicas bem como em modelos experimentais sugerindo que elas podem ser um importante parâmetro patológico (Lunkes et al., 2003; Spanevello et al., 2006; Schetinger et al., 2007; Bagatini et al., 2008; Maldonado et al., 2008; Schmatz et al., 2009). Neste contexto, no presente estudo a atividade destas enzimas foi avaliada em linfócitos e plaquetas de pacientes com a forma SREM, bem como em sinaptossomas e plaquetas de ratos submetidos à desmielinização subcortical e tratados com vitamina E, com o objetivo de contribuir para um melhor entendimento da patogênese da EM.

A EM é a doença desmielinizante mais comum do SNC (Kalb, 2000). Embora a etiologia e a patogênese desta doença ainda são desconhecidas tem sido demonstrado que processos auto-imunes direcionados contra componentes da bainha de mielina ou oligodendrócitos tem um papel crucial em mediar processos inflamatórios, particularmente nos estágios iniciais da SREM (Dhib-Jalbut et al., 2006; Winquist et al., 2007; Lassman, 2008).

Têm sido relatado na literatura que NTPDase e ADA são enzimas envolvidas em processos imunes e inflamatórios sendo que alterações em suas atividades já foram descritas em várias patologias as quais a imunidade está alterada (Hitoglu et al., 2001; Leal et al., 2005; Pousrharifi et al., 2008). Seguindo esta linha, no presente estudo foi observado que a atividade e a

expressão da NTPDase está aumentada em linfócitos de pacientes com a SREM enquanto que a atividade da ADA está diminuída nestas células quando comparado com o indivíduos saudáveis. Estes resultados confirmam prévios estudos que demonstraram que doenças imunes induzem alterações no metabolismo de nucleotídeos e sugerem que NTPDase e ADA também constituem-se em importantes enzimas para a modulação de respostas imunes na EM (Leal et al., 2005; Vivekanandhan et al., 2005).

Acredita-se que a complexa patogênese da EM envolve a ruptura da barreira hematoencefálica, infiltração de células CD4⁺ e CD8⁺, de células B e de macrófagos no SNC com concomitante liberação de moléculas pró-inflamatórias resultando em desmielinização e dano axonal (Dhib-Jalbut et al., 2006; Lassman et al., 2008). Dentre as moléculas liberadas como resultado da inflamação e desmielinização estão os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina como ATP e adenosina. Estas moléculas são consideradas importantes na interação entre os componentes do sistema imune durante a ativação, controlando assim o curso e resolução da resposta inflamatória e imune (Bours et al., 2006; Gessi et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que o ATP está envolvido em funções pró-inflamatórias como a estimulação e proliferação de linfócitos bem com a liberação de citocinas (Trautmann, 2009). Além disso, o ATP é necessário para a secreção de IFN- γ por células Th1 (Langston et al., 2003), o qual tem sido indicado por ser uma das mais importantes citocinas envolvida nos mecanismos patogênicos da EM (Dhib-Jalbut et al., 2006). Por outro lado, a adenosina tem ações imunossupressoras inibindo a ativação de linfócitos bem

como a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Haskó et al., 2000; Gessi et al., 2007).

Os níveis extracelulares destas moléculas em locais de inflamação são controlados pela ação da NTPDase e ADA (Yegutkin, 2008). A NTPDase hidrolisa ATP e possui um papel importante no controle das funções dos linfócitos incluindo o reconhecimento de antígenos e a ativação de células T citótóxicas (Dwyer et al., 2007; Pulte et al., 2007). Já a ADA catalisa a deaminação de adenosina a inosina sendo essencial também para o crescimento, proliferação e diferenciação dos linfócitos (Franco et al., 1997; Aldrich et al., 2000). Neste contexto, baseado nos resultados obtidos neste estudo pode-se sugerir que o aumento da atividade da NTPDase em linfócitos de pacientes com a SREM pode diminuir os níveis de ATP extracelular, uma molécula com ações inflamatórias, e a diminuição da atividade da ADA pode aumentar os níveis de adenosina, uma molécula com ações anti-inflamatórias e imunossupressoras. Sendo assim, pode-se propor que as alterações na atividade da NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com SRMS podem ser interpretadas como um mecanismo compensatório, para diminuir a resposta inflamatória e imune contribuindo assim para a integridade do tecido neural nesta fase da doença.

Neste estudo também foi demonstrado uma diminuição na atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA em plaquetas de pacientes com a SREM, indicando que esta doença neurológica pode interferir com parâmetros de coagulação por alterar os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos na circulação.

Reforçando a hipótese acima, dados da literatura descrevem a presença de trombose em veias cerebrais (Wakefield et al., 1994; Bunyan et al., 1997; Vandenberghe et al., 2003) e anormalidades nas funções plaquetárias como grande tendência à agregação espontânea e alta hipersensibilidade na presença de ADP em pacientes com EM (Neu et al., 1982). Estas observações sugerem que as plaquetas poderiam ter um papel na formação das lesões desmielinizantes (Neu et al., 1982).

Tendo em vista que os nucleotídeos de adenina possuem papéis relevantes na circulação, sendo o ADP o principal promotor de agregação plaquetária e a adenosina um inibidor desta agregação e um modulador do tônus vascular (Anfossi et al., 2002; Remijn et al., 2002; Rozalski et al., 2005); a ação conjunta das enzimas NTPDase, E-NPP e 5'-nucleotidase são fundamentais na circulação para a degradação extracelular de ATP/ADP/AMP e a respectiva geração de adenosina (Atkinson et al., 2006; Robson et al., 2006). Juntas, essas enzimas representam o maior sistema efetor em terminar com as respostas pró-inflamatórias e pró-trombóticas no sistema cardiovascular (Atkinson et al., 2006). Sendo assim, uma diminuição na atividade da NTPDase, E-NPP e 5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com SREM poderia resultar em alterações na agregação plaquetária, uma vez que a concentração de ADP pode aumentar no meio extracelular, enquanto que a hidrólise de AMP está diminuída levando a baixa produção de adenosina. Estas alterações poderiam explicar ao menos em parte o desenvolvimento de complicações vasculares descritas na EM.

Um outro importante aspecto a ser discutido é que a atividade da ADA também foi diminuída em plaquetas de pacientes com SREM. A ADA é

responsável por regular as concentrações extracelulares de adenosina (Franco et al., 1997); sendo assim pode-se especular que uma diminuição na atividade desta enzima pode ser interpretada como um mecanismo compensatório com a finalidade de evitar a agregação plaquetária excessiva e o desenvolvimento de trombos. Reforçando este ponto, foi demonstrado neste estudo que não houve diferença na agregação plaquetária usando ADP como agonista entre pacientes com EM e o grupo controle.

Como a maioria dos pacientes que fizeram parte deste estudo estavam fazendo uso de terapia imunomodulatória com IFN- β ou outros medicamentos como paracetamol e clonazepam, os efeitos *per se* destes medicamentos foram avaliados na atividade da NTPDase, da 5'-nucleotidase, da E-NPP e da ADA em linfócitos e plaquetas. Os resultados obtidos demonstraram que o IFN- β , o paracetamol e o clonazepam não foram capazes de alterar a atividade destas ectoenzimas tanto em linfócitos quanto em plaquetas. Conseqüentemente, acredita-se que as alterações observadas no presente estudo na atividade da NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA não são devido aos medicamentos usados pelos pacientes e sim devido a própria condição patológica.

Neste trabalho o papel da NTPDase e da 5'-nucleotidase, bem como parâmetros de estresse oxidativo também foram avaliados em um modelo de desmielinização subcortical associado ao tratamento com vitamina E. A desmielinização tóxica pelo brometo de etídio (BE) é um dos modelos mais comumente usados para avaliar a capacidade reparativa do SNC frente a um episódio de desmielinização (Bondan et al., 2000), pois o BE é capaz de induzir desmielinização por destruir seletivamente células gliais: astrócitos e

oligodendrócitos (Graça et al., 2001). Com este modelo experimental foi observado um aumento na atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex cerebral após um evento de desmielinização na ponte (Spanevello et al., 2006). Similarmente, no presente estudo também ocorreu um aumento na atividade destas enzimas quando a desmielinização foi induzida subcorticalmente, indicando que embora eventos desmielinizantes ocorram em diferentes regiões cerebrais eles interferem com a atividade de enzimas que tem papéis cruciais no SNC.

A NTPDase e a 5'-nucleotidase estão envolvidas nos processos de neurotransmissão e neuromodulação, sendo portanto responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP na fenda sináptica (Robson et al., 2006; Yegutkin, 2008). O ATP além de atuar como um neurotransmissor desempenha várias outras funções importantes no SNC (Burnstock, 2006; Neary & Zimmermann, 2009). Entretanto a liberação extracelular deste nucleotídeo pode aumentar mediante injúria cerebral podendo contribuir para o dano neurológico através da ativação de receptores P2X₇ (Freuve et al., 2002).

Por outro lado, a adenosina tem ações neuroprotetoras (Cunha, 2001; Ribeiro et al., 2003) e tem sido demonstrado que esta molécula promove a diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos podendo assim ter um papel crucial na formação das bainhas de mielina (Stevens et al., 2002). Neste contexto, acredita-se que após um evento de desmielinização no SNC a atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase são moduladas com a finalidade de limitar os efeitos citotóxicos do ATP e aumentar a produção de adenosina, uma importante molécula para remielinização.

Além disso, neste modelo experimental o papel da NTPDase e 5'-nucleotidase também foi verificado em plaquetas, uma vez que a literatura descreve anormalidades nas funções plaquetárias na EM (Neu et al., 1982). Os resultados obtidos demonstraram que a atividade destas enzimas também foi aumentada em plaquetas de ratos desmielinizados pelo BE. Esses achados diferem de outros trabalhos realizados em nosso grupo onde foi observado que após indução da desmielinização na ponte (Spanevello et al., 2007) bem como em pacientes com a SREM a atividade destas ectonucleotidases em plaquetas apresenta-se diminuída. Embora os mecanismos envolvidos nestas diferenças não são conhecidos, evidências têm sugerido que o dano à bainha de mielina pode resultar na liberação da proteína básica de mielina na circulação, a qual é capaz de causar alterações na membrana das plaquetas (Chiang et al., 1982; Neu et al., 1982). Considerando que NTPDase e 5'-nucleotidase são enzimas de membrana, alterações na membrana das plaquetas pela proteína básica de mielina poderia ser um importante fator sobre o estado conformacional dessas enzimas o que poderia explicar as alterações destas ectonucleotidases em plaquetas após eventos desmielinizantes.

Em relação ao tratamento com vitamina E, foi observado que quando ratos desmielinizados foram submetidos ao tratamento com 2 mg/Kg de vitamina E não houve o aumento da NTPDase, mas a atividade da 5'-nucleotidase permaneceu aumentada tanto em sinaptossomas quanto em plaquetas quando comparado com o grupo controle, indicando assim que vitamina E pode interferir com a sinalização purinérgica. Estudos têm relatado que a vitamina E é capaz de inibir a adesão e agregação plaquetária, entretanto os mecanismos responsáveis por estes efeitos ainda são pouco

conhecidos (Freedman & Keaney, 2001; Kobzar et al., 2005). Baseado nos resultados deste estudo pode-se inferir que um dos prováveis mecanismos seja a modulação da atividade das ectonucleotidases em plaquetas levando a produção de adenosina, uma molécula com ações antiagregantes. Além disso, evidências também têm indicado que vitamina E tem propriedades neuroprotetoras principalmente por reduzir o grau de estresse oxidativo (Kashif et al., 2004; Ricciarelli et al., 2007). A partir dos resultados obtidos neste trabalho é importante considerar que a modulação da atividade das ectonucleotidases no sistema nervoso pela vitamina E também pode ter um papel protetor mantendo as concentrações extracelulares de ATP/ADP dentro dos níveis fisiológicos e aumentando a produção de adenosina.

Outro importante aspecto a ser considerado é que vitamina E é um antioxidante que possui um papel crucial em proteger as membranas celulares do estresse oxidativo (Brigelius-Flohé & Traber, 1991; Atkinson et al., 2008). Sendo assim, devido ao fato que NTPDase e 5'-nucleotidase são enzimas de membrana é possível que as alterações nestas enzimas em sinaptossomas e plaquetas de ratos desmielinizados podem ser mediadas também por radicais livres e que o efeito antioxidante da vitamina E pode ter sido importante em estabilizar as propriedades da membrana plasmática.

Reforçando o exposto acima, neste trabalho foi observado também que marcadores de estresse oxidativo como níveis de TBARS foram aumentados enquanto que atividade da catalase foi diminuída em ratos desmielinizados pelo BE. Em adição, o tratamento com vitamina E reverteu estas alterações ao nível do grupo controle sugerindo assim que este composto pode ser eficaz em reduzir o dano celular causado por EROs em eventos desmielinizantes.

O efeito neuroprotetor da vitamina E foi demonstrado neste estudo pela análise morfométrica das lesões desmielinizantes. Os dados obtidos desta análise revelam que as lesões foram menores em ratos desmielinizados e tratados com vitamina E. Embora existam poucos estudos demonstrando a relevante função antioxidante da vitamina E *in vivo*, pode-se sugerir que as propriedades neuroprotetoras deste composto observadas neste trabalho podem ser atribuídas ao menos em parte, a sua atividade antioxidante associada a modulação da hidrólise dos nucleotídeos de adenina. Em adição, é importante considerar também que vitamina E possui várias outras funções incluindo ações antiinflamatórias e regulação da sinalização celular, as quais também podem contribuir para os efeitos benéficos da vitamina E (Grammas et al., 2004; Brigelius-Flohé, 2009). Finalmente, estas observações podem indicar que este composto pode ser importante na redução ou prevenção de lesões desmielinizantes que ocorrem na EM.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que as enzimas NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA são muito importantes na EM bem como em modelos experimentais de desmielinização. Embora suas funções variem de acordo com a localização tecidual, pode-se observar que a atividade destas enzimas são moduladas em linfócitos, plaquetas e em sinaptossomas com o objetivo de minimizar processos inflamatórios e imunes e reduzir o dano tecidual. A importância destas enzimas sob o ponto de vista clínico e terapêutico ainda precisa ser melhor investigada com a finalidade de ajudar no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de pacientes com EM. Além disso, este estudo salienta também o papel neuroprotetor da vitamina E em reduzir o tamanho de lesões desmielinizantes

induzidas experimentalmente, sugerindo assim que este composto pode ser benéfico no tratamento da EM.

5. Conclusões

Este foi o primeiro trabalho a avaliar a atividade de ectoenzimas em linfócitos e plaquetas de pacientes com a forma SREM, bem como em ratos submetidos à desmielinização subcortical por BE. O dado mais importante que pode ser observado neste estudo é que independente da localização tecidual ocorre uma modulação na atividade de ectoenzimas, possivelmente com a finalidade de manter a integridade tecidual na patologia desmielinizante.

Além disso, a vitamina E interferiu com a sinalização purinérgica tanto no sistema nervoso quanto no sistema vascular e diminuiu parâmetros de estresse oxidativo em ratos desmielinizados, demonstrando assim uma ação neuroprotetora frente a um modelo experimental de desmielinização. Esses dados sugerem que a vitamina E pode ser um composto benéfico para o tratamento de doenças desmielinizantes como a EM.

6. Perspectivas

Muitos aspectos precisam ser ainda investigados em relação aos processos desmielinizantes da Esclerose Múltipla, sendo assim poderíamos aprofundar mais estes estudos a partir da concretização dos seguintes objetivos:

- Avaliar a atividade da NTPDase, da 5'-nucleotidase, da E-NPP e da ADA em linfócitos e plaquetas de pacientes e com as formas progressiva secundária e progressiva primária da EM.
- Avaliar os níveis de nucleotídeos de adenina no soro de pacientes com EM.
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em todas as formas de EM.
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo bem como a atividade de ectoenzimas durante o surto da EM.
- Investigar o papel de outros compostos antioxidantes como N-acetil cisteína e resveratrol no modelo de desmielinização pelo BE.

7. Referências

Adrich, M.; Blackburn, M.; Kellems, R. (2000). The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272: 311-315.

Aksungar, F.; Topkaya, A.; Yildiz, Z.; Sahin, S.; Turk, U. (2008). Coagulation status and biochemical and inflammatory markers of multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience* 15: 393-397.

Anfossi, G.; Russo, I.; Massucco, P.; Mattiello, L.; Cavalot, F.; Balbo, A.; Trovati, M. (2002). Adenosine increases human platelets levels of cGMP through nitric oxide possible role in its antiaggregating effect. *Thrombosis Research* 105: 71-78.

Araújo, M.C.; Rocha, J.B.T.; Morsch, A.; Zanin, R.; Bauchspiess, R.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R.C. (2005). Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 421-426.

Arruda, W.O.; Scola, R.H.; Teive, H.A.; Werneck, L.C. (2001). Multiple sclerosis: report on 200 cases from Curitiba, Southern Brazil and comparison with other Brazilian series. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 59: 165-70.

Atkinson, B.; Dwyer, K.; Enjyoji, K.; Robson, S. (2006). Ecto-nucleotidases on the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 36: 217-222.

Atkinson, J.; Epand, R.; Epand, R. (2008). Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radical Biology and Medicine* 44: 739-764.

Bagatini, M.; Martins, C.; Battisti, V.; Spanevello, R.; Gasparetto, D.; Rosa, C.; Gonçalves, J.; Schetinger, M.; Santos, R.; Morsch, V. (2008). Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. *Clinical Biochemistry* 41: 1181-1185.

Barreiros, A.; David, J. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29: 113-123.

Bianchi, M.; Antunes, L. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição* 12: 123-130.

Bizzozero, O.; Dejesus, G.; Callahan, K.; Pastuszyn, A. (2005). Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research* 81: 687-695.

Bondan, E.F. (1997). Estudo morfológico do processo de remielinização no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos experimentalmente ao modelo gliotóxico do brometo de etídio e tratados com ciclofosfamida ou ciclosporina. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 190p.

Bondan, E.F.; Lallo, M.A.; Dagli, M.L.; Pereira, A.V.D.; Graça, D. (2002). Ruptura da barreira hematoencefálica após injeção de droga gliotóxica no tronco encefálico de ratos Wistar. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 60: 582-589.

- Bondan, E.F.; Lallo, M.A.; Sinhorini, I.L.; Pereira, L.A.V.; Graça, D.L. (2000). The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 32: 603-612.
- Bours, M.; Swennen, E.; Di Virgilio, F.; Cronstein, B.; Dagnelie, P. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 112: 358-404.
- Brigelius-Flohé, R.; Traber, M. (1991). Vitamin E: function and metabolism. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13: 1145-1155.
- Brigelius - Flohé, R. (2009). Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radical Biology and Medicine* 46: 543-554.
- Bunyan, M.; Ogunniyi, A. (1997). Incidental cerebral venous thrombosis in a patient with multiple sclerosis. *The Journal of the Neurological Science* 149: 191-194.
- Burnstock, G. (2002). Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clinical Medicine* 2: 45-53.
- Burnstock, G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Science* 27: 166-176.

Cananzi, A.; Ferro-Milone, F.; Grigoletto, F.; Toldo, M.; Meneghini, F.; Bortolon, F.; D'Andrea, G. (1987). Relevance of platelet factor four (PF4) plasma levels in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 76: 79-85.

Cardoso, E.; Fukuda, T.; Pereira, J.; Seixas, J.; Miranda, R.; Rodrigues, B.; Saback, T.; Andrade, R.; Cardoso, G.; Martinez, R.; Avena, J.; Melo, A. (2006). Clinical and epidemiological profile of multiple sclerosis in a reference center in the State of Bahia, Brazil. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 64: 727-730.

Chiang, T.; Whitaker, J.; Hang, A.; Beachey, F. (1982). The effect of myelin basic protein on the endogenous phosphorylation of platelets. *Thrombosis Research* 25: 487-499.

Colgan, S.; Eltzschig, H.; Eckle, T.; Thompson, L. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling* 2: 351-360.

Compston, A.; Alpine, D.; Confavreux, C.; Lassman, H.; McDonald, L. (2005). *MCA*lpine's multiple sclerosis. Elsevier Health Sciences 4 Edth 982 p.

Compston, A.; Coles, A. (2008). Multiple Sclerosis. *Lancet* 372:1502-1700.

Cunha, R. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors. *Neurochemistry International* 38:107-125.

Dhib-Jalbut, S.; Arnold, D.; Cleveland, A.; Fisher, M.; Friedlander, R.; Mouradian, M.; Przedborski, S.; Trapp, B.; Wyss-Coray, T.; Yong, V. (2006).

Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroimmunology* 176: 198-215.

Di Virgilio, F. (2007). Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signalling* 3: 1-3.

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

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.

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

Dwyer, K.; Deaglio, S.; Gao, W.; Friedman, D.; Strom, T.; Robson, S. (2007). CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signalling* 3:171-180.

Emerit, J.; Edeas, M.; Bricarie, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58: 39-46.

Farina, C.; Weber, M.; Meinl, E.; Wekerle, H.; Hablfield, R. (2005). Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurology* 4: 567-575.

Ferreira, M.L.; Machado, M.I.; Vilela, M.L.; Guedes, M.J.; Ataíde, Jr.; Santos, S.; Laurentino, S.G. (2004). Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis

after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 62: 1027-1032.

Ferreira, A.; Matsubara, L. (1997). Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista de Associação Médica Brasileira* 43: 61-68.

Feuvre, R.; Brough, D.; Rothwell, N. (2002). Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *European Journal of Pharmacology* 447: 261-269.

Fox, R.; Bethoux, F.; Goldman, M.; Cohen, J. (2006). Multiple sclerosis: advances in understanding, diagnosing, and treating the underlying disease. *Clinic Journal of Medicine* 73: 91-102.

Franco, R.; Casadó, V.; Ciruela, F.; Saura, C.; Mallol, J.; Canela, E.; LLuis, C. (1997). Cell surface adenosine deaminase much more than an ectoenzyme. *Progress in Neurobiology* 52: 283-294

Freedman, J.; Keaney, J. (2001). Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. *The Journal of Nutrition* 131: 374-377.

Fushini, S.; Shirabe, T. (2002). The reaction of glial progenitor cells in remyelination following ethidium bromide-induced demyelination in the mouse spinal cord. *Neuropathology* 22: 233-242.

Gessi, S.; Varini, K.; Merighi, S.; Fogli, E.; Sacchetto, V.; Benini, A.; Leung, E.; Mac-Lennan, S.; Borea, P. (2007). Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signalling* 3: 109-116.

Gibb, A.; Halliday, F. (1996). Fast purinergic transmission in the central nervous system. *Seminars in the Neuroscience* 8: 225-232.

Gilgun - Sherki, Y.; Melamed, E.; Offen, D. (2004). The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *Journal of Neurology* 251: 261-268.

Graça, D.; Blakemore, W.F. (1986). Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 12: 539-605.

Graça, D.; Bondan, E.; Pereira, I.; Fernandes, C.; Maiorka, P. (2001). Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 59: 358-361.

Grammas, P.; Hamdheydari, L.; Benaksas, E.; Mou, S.; Pye, Q.; Wechter, W.; Floyd, R.; Stewart, C.; Hensley, K. (2004). Anti - inflammatory effects of tocopherol metabolites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319: 1047-1052.

Grzesiuk, A. (2006). Características clínicas e epidemiológicas de 20 portadores de Esclerose Múltipla acompanhados em Cuiabá - Mato Grosso. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 64: 635-638.

Guazzo, E. (2005). A technique for producing demyelination of the rat optic nerves. *Journal of Clinical Neuroscience* 12: 54-58.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97: 1634 -1658.

Hart, B.; Hintzen, R.; Laman, J. (2009). Multiple sclerosis - a response to damage model. *Trends in Molecular Medicine* 15: 235-244.

Haskó, G.; Kuhel, D.; Chen, J.; Schwarzschild, M.; Deitch, E.; Mabley, J.; Marton, A.; Szabó, C. (2000). Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A_{2a} receptor-dependent and independent mechanisms. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14: 2065-2074.

Haskó, G.; Linden, J.; Cronstein, B.; Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature* 7: 759-770.

Hitoglu, S.; Hatzistilianou, M.; Gougoustamou, D.; Athanassiadu, F.; Kotsis, A.; Catriu, D. (2001). Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology* 20: 411-416

Kalb, R. (2000). *Esclerose Múltipla: perguntas e respostas*. São Paulo: ABEM – Associação Brasileira de Esclerose Múltipla, 1 Ed. 477p.

- Kashif, S.; Zaidi, R., Banu, N. (2004). Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta* 340: 229-233.
- Kobzar, G.; Mardla, V.; Samel, N. (2005). Effects of α -tocopherol, L-arginine, and quercetin on aggregation of human platelets. *Nutrition Research* 25: 569-575.
- Koch, M.; Mostert, J.; Arutjunyan, A.; Stepanov, M.; Heersema, T.; Keyser, J. (2007). Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 14: 529-533.
- Koch, M.; Ramsaransmg, G.; Arutjunyan, A.; Stepanov, M.; Teelken, A.; Heersema, D.; Keyser, J. (2006). Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *Journal of Neurology* 253: 483-487.
- Kopff, M.; Zakrzewska, I.; Czernicki, J.; Klem, J.; Strzelczyk, M. (1993). Red cell superoxide dismutase and catalase activity in multiple sclerosis. *Acta Biochimica Polonica* 40:154-157.
- Langston, H.; Ke, Y.; Gewirtz, A.; Dombrowski, K.; Kapp, J. (2003). Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen - specific T cells requires extracellular ATP. *The Journal of Immunology* 170: 2962-2970.
- Lassmann, H. (2008). Mechanisms of inflammation induced tissue injury in multiple sclerosis. *Journal of Neurological Sciences* 274: 45-47.
- Lavranja, I.; Bjelobaba, I.; Stojiljkovic, M.; Pekovic, S.; Mostarica-Stojkovic, M.; Stosic-Grujicic, S.; Nedeljkovic, N. (2009). Time-course changes of

ectonucleotidases activities during experimental autoimmune encephalomyelitis, *Neurochemistry International* 55: 193-198.

Leal, D.; Streher, C.; Bertoncheli, C.; Carli, L.; Leal, C.; Silva, J.; Morsch, V.; Schetinger, M. (2005). HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39 - positive lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1746: 129-134.

Lehamann, D.; Karussis, D.; Misrachi-Koll, R.; Shezen, R.; Ovadia, H.; Abramsky, O. (1994). Oral administration of the antioxidant - scavenger N-acetyl - L - cysteine inhibits acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 50: 35-42.

Lovas, G.; Palkovits, M.; Komoly, S. (2000). Increased c-Jun expression in neurons affected by lipoecithin-induced demyelination in rats. *Neuroscience Letters* 292: 71-74.

Luedtke, N.; Tor Q. (2003). Synthesis, Photophysical properties, and nucleic acid binding of phenantridinium derivatives based on ethidium. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11: 5235-5247.

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

Maldonado, P.; Corrêa, M.; Becker, L.; Flores, C.; Moretto, M.; Morsch, V.; Schetinger, M. (2008). Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase (E-

NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. *Clinical Biochemistry* 41: 400-406.

Mallan, E.; Scolding, N. (2009). The Diagnosis of MS. *The International of MS Journal* 16: 19-25.

Markovic - Plese, S.; McFarland, H. (2001). Immunopathogenesis on the multiple sclerosis lesion. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 1: 257-262.

Mazzanti, C.; Spanevello, R.; Ahmed, M.; Pereira, L.; Gonçalves, J.; Corrêa, M.; Schmatz, R.; Stefanello, N.; Leal, D.; Mazzanti, A.; Ramos, A.; Martins, T.; Danesi, C.; Graça, D.; Morsch, V.; Schetinger, M. (2009). Pre - treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. *International Journal of Developmental Neuroscience* 27: 73-80.

McDonald, W.; Compston, A.; Edan, G.; Goodkin, D.; Hartung, H.; Lublin, F.; McFarland, F.; Paty, D.; Polman, C.; Reingold, S.; Sandberg-Wollheim, M.; Sibley, W.; Thompson, A.; Noort, S.; Weinshenker, B.; Wolinsky, J. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 50:121-127.

Millar, J.; Merret, J.; Dalby, A. (1966). Platelet stickiness in multiple sclerosis. *Archives of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 29: 187-189.

Minguetti, G. Ressonância Magnética na Esclerose Múltipla. Análise de 270 casos. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 59: 563-569.

Moreira, M.; Felipe, E.; Mendes, M.; Tilbery, C. (2000). Esclerose Múltipla: estudo descritivo de suas formas clínicas em 302 casos. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 58: 460-466.

Moreira, M.; Lana-Peixoto, M.; Callegaro, D.; Haussen, S.; Gama, P.; Gabbai, A.; Rocha, F.; Lino, A. (2002). Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento de Esclerose Múltipla: as evidências para o uso de glicocorticóides e imunomoduladores. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 60: 875-880.

Moreira, M.; Tilbery, C.; Lana-Peixoto, M.; Mendes, M.; Kaimen-Maciel, D.; Callegaro, D. (2002). Aspectos históricos de la esclerosis múltiple. *Revista de Neurologia* 34: 378-383.

Moriya, M.; Nakatsuji, Y.; Miyamoto, K.; Okuno, T.; Kinoshita, M.; Kumanogoh, A.; Kusunoki, S.; Sakoda, S. (2008). Edaravone, a free radical scavenger, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience Letters* 440: 323-326.

Navarro, A.; Gómez, C.; Sánchez-Pino, M.; González, H.; Báñez, M.; Boveris, A.; Boveris, A. (2005). Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance and brain mitochondrial function in aging male mice. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 289: 1392 – 1399.

Neary, J.; Zimmermann, H. (2009). Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. *Trends in Neuroscience* 32: 189-198.

Neu, I.; Prosiogel, M.; Pfaffenrath, V. (1982). Platelet aggregation and multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 66: 491-304.

Neuhaus, O.; Archelos, J.; Hartung, H. (2003). Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences* 24: 131- 138

Odinak, M.; Bisaga, G.; Zarubina, I. (2002). New approaches to antioxidant therapy in multiple sclerosis. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S. S. Korsakova (Abstract)*.

Oliveira, E.; Souza, N. (1998). Esclerose Múltipla. *Revista de Neurociências* 6: 114-118.

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

Polman, C.; Reingold, S.; Edan, G.; Fillippi, M.; Hartung, H.; Kappos, L.; Lublin, F.; Metz, L.; McFarland, H.; O'Connor, P.; Sandberg-Wolheim, M.; Thompson, A.; Weinshenker, B.; Wolinsky, J. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of Neurology* 58: 840-846.

Porto, W. (2001). Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento fisiológico: base para nova terapia. *Revista de Neurociências* 9: 70-76.

Poser, C.; Paty, D.; Scheinberg, L.; McDonald, W.; Davis, F.; Ebers, G.; Johnson, K.; Sibley, W.; Silberberg, D.; Tourtellotte, W. (1983). New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of Neurology* 13: 227-231.

Poursharifi, P.; Saghiri, R.; Ebrahimi-Rad, M.; Nazem, H.; Pourpak, Z.; Moin, M.; Shams, S. (2008). Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 e ADA2 activities. *Clinical Biochemistry* (in press).

Puccioni-Sohler, M.; Lavrado, F.; Bastos, R.; Brandão, C.; Papaiz-Alvarenga, R. (2001). Esclerose Múltipla correlação clínico laboratorial. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 59: 89-91.

Pulte, D.; Broekman, M.; Olson, K.; Drosopoulos, J.; Kizer, J.; Islam, N.; Marcus, A. (2007). CD39/NTPDase 1 activity and expression in normal leukocytes. *Thrombosis Research* 121: 309-317.

Putnam, T. (1935). Studies in multiple sclerosis and sclerotic plaques produced by venular obstruction. *Archives of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 33: 929-940.

Rathone, M.; Middlemiss, P.; Gysbers, J.; Andrew, C.; Hermann, M.; Redd, J.; Ciccarelli, R.; Di Iorio, P.; Caciagli, F. (1999). Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in Neurobiology* 59: 663-690.

Reipert, B. (2004). Multiple sclerosis: a short review of the disease and its differences between men and women. *Journal of Men's Health & Gender* 4:334-340.

Remijn, J.; Wu, Y.; Jeninga, E.; Ijsseldijk, M.; Willigen, G.; Groot, P.; Sixma, J.; Nurden, A.; Nurden, P. (2002). Role of ADP receptor P2Y₁₂ in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 22: 686-691.

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

Ricciarelli, R.; Argellati, F.; Pronzato, M.; Domenicotti, C. (2007). Vitamin E and neurodegenerative diseases. *Molecular aspects of Medicine* 28: 591-606.

Robson, S.; Sévigny, J.; Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2: 409-430.

Rozalski, M.; Nocun, M.; Watala, C. (2005) Adenosine diphosphate receptors on blood platelets - potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochimica Polonica* 52: 411-415.

Santos, M.; Peixoto, M.; Munhoz, M.; Almeida, A. (2003). Avaliação dos potenciais evocados auditivos do tronco encefálico na esclerose múltipla. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 61: 392-397.

Schetinger, M.R.; Morsch, V.; Bonan, C.; Wyse, A. (2007). NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 31: 77-98.

Schmatz, R.; Schetinger, M.; Spanevello, R.; Mazzanti, C.; Stefanello, N.; Maldonado, P.; Gutierrez, J.; Corrêa, M.; Giroto, E.; Moretto, M.; Morsch, V. (2009). Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin - induced diabetic rats. *Life Sciences* 84: 345-350.

Schreibelt, G.; Horssen, J.; Rossum, S.; Dijkstra, C.; Drukarch, B.; Vries, H. (2007). Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Research Reviews* 56: 322-330.

Sheremata, W.; Ly, W.; Horstman, L.; Ahan, Y.; Alexander, S.; Minagar, A. (2008). Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation* 5: 1-6.

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

Souza, N.; Oliveira, E. (1999). Considerações sobre o tratamento da Esclerose Múltipla. *Revista de Neurociências* 7: 98-103.

Spanevello, R.; Mazzanti, C.; Kaizer, R.; Zanin, R.; Cargnelluti, D.; Hannel, L.; Côrrea, M.; Mazzanti, A.; Festugatto, R.; Graça, D.; Schetinger, M.; Morsch, V. (2006). Apyrase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the

cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon β . *Neurochemical Research* 31: 455-462.

Spanevello, R.; Mazzanti, C.; Maldonado, P.; Zanin, R.; Morsch, A.; Hannel, L.; Mazzanti, A.; Festugatto, R.; Graça, D.; Schmatz, R.; Loro, V.; Schetinger, M.; Morsch, V. (2007). Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon β . *Life Sciences* 80: 1109-1114.

Stangel, M.; Hartung, H. (2002). Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology* 68:361-376.

Stefan, C.; Jansen, S.; Bollen, M. (2005). NPP- type ectophosphodiesterases: unity and diversity. *Trends in Biochemical Sciences* 30: 542-550.

Stefan, C.; Jansen, S.; Bollen, M. (2006). Modulation of purinergic signalling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signalling* 2: 361-370.

Stevens, B.; Porta, S.; Haak, L.; Gallo, V.; Fields, R. (2002). Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 36: 855-868.

Sträter, N. (2006). Ecto-5'-nucleotidase: structure function relationships. *Purinergic Signalling* 2: 343-350.

Terkeltaub, R. (2006). Physiologic and pathologic functions of the NPP nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family focusing on NPP1 in calcification. *Purinergic Signalling* 2: 371-377.

Tilbery, C.; Moreira, M.; Mendes, M.; Lana - Peixoto, M. (2000). Recomendações quanto ao uso de drogas imunomoduladoras na esclerose múltipla. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 58: 769-776.

Toshniwal, P.; Zarling, E. (1992). Evidence of increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Neurochemical Research* 17: 205-207.

Traber, M.; Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine* 43: 4-15.

Trapp, B.; Nave, K. (2008). Multiple sclerosis: and immune or neurodegenerative disorder? *The Annual Review of Neuroscience* 31: 247-269.

Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the immune system: More than just a "Danger Signal". *Science Signalling* 2:1-3.

Vandenbergh, N.; Debouverie, M.; Anxionnat, R.; Clavelou, P.; Bouly, S.; Weber, M. (2003). Cerebral venous thrombosis in four patients with multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 10: 63-66.

Vannuchi, H.; Moreira, E.; Cunha, D.; Junqueira-Franco, M.; Bernardes, M.; Jordão-Jr, A. (1998). Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina, Ribeirão Preto* 31: 31-44.

Vatassery, G.; Bauer, T.; Dysken, M. (1999). High doses of vitamin E in the treatment of disorders of the central nervous system in the aged. *American Journal of Clinical Nutrition* 70: 793-801.

Vivekanandhan, S.; Soundararajan, C.; Tripathi, M.; Maheshwari, M. (2005). Adenosine deaminase and 5'-nucleotidase activities in peripheral blood T cells of multiple sclerosis. *Neurochemical Research* 30: 453-456.

Wakefield, A.; More, L.; Difford, J.; McLaughlin, J. (1994). Immunohistochemical study of vascular injury in acute multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Pathology* 47:129 -133.

Wakerley, B.; Nicholas, R.; Malik, O. (2008). Multiple sclerosis. *Medicine* 36: 625-629.

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

Winqvist, R.; Kwong, A.; Ramachandran, R.; Jain, J. (2007). The complex etiology of multiple sclerosis. *Biochemical Pharmacology* 74:1321-1329.



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

Zimmermann, H.; Mishra, S.; Shukla, V.; Langer, D.; Gampe, K.; Grimm, I.; Delic, J.; Braun, N. (2007). Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia* 73: 537-566.

ANEXOS

Anexo I

**Carta de aprovação do Comitê de Ética da Universidade
Federal de Santa Maria para a realização de estudos com
portadores de Esclerose Múltipla.**

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

CARTA DE APROVAÇÃO

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

Título: Estudo do perfil oxidativo e avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com Esclerose Múltipla.

Número do processo: 23081.007854/2007-44

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0081.0.243.000-07

Pesquisador Responsável: Maria Rosa Chitolina Schetinger


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

Dezembro/2008	Relatório parcial
Dezembro/2009	Relatório final

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

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 06/07/2007

Santa Maria, 6 de julho de 2007.


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

Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Questionário

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo o projeto de pesquisa **“Estudo do perfil oxidativo e avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com Esclerose Múltipla”** através da doutoranda Roselia Maria Spanevello, orientada pela professora Maria Rosa Chitolina Schetinger. Este projeto tem como objetivo avaliar a atividade de componentes sanguíneos em pacientes com Esclerose Múltipla e em indivíduos controles, livres de qualquer patologia, com a finalidade de colaborar para um melhor entendimento desta doença, além de proporcionar mais informações aos pacientes, já que estes terão acesso aos resultados da pesquisa.

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

Será também aplicado um questionário que servirá para coletar alguns dados que serão posteriormente importantes para a interpretação dos resultados, sendo que você é livre para respondê-lo ou não. Fica garantido que os dados coletados ficarão sob responsabilidade do pesquisador e que os mesmos serão utilizados apenas para fins científicos, sem que o paciente seja identificado, garantindo assim o anonimato.

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

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

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

Santa Maria, _____ de _____ 2008

Nome do paciente _____

Identidade _____

Assinatura do responsável pelo paciente, nos casos em que o paciente for menor que 18 anos _____

Identidade _____

Assinatura do pesquisador _____

Em casos de dúvidas entrar em contato com:

Maria Rosa Chitolina Schetinger (Orientadora): 3220 8665

Roselia Maria Spanevello (pesquisadora): 30257062 ou (55) 99788881

Comitê de ética em pesquisa da UFSM: Avenida Roraima 1000, Prédio Reitoria 7^o andar, sala 702, Cidade Universitária – Bairro Camobi, CEP: 97105-900, Santa Maria - RS. Fone (55) 32209362.

Projeto: Estudo do perfil oxidativo e avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de pacientes com Esclerose Múltipla.

Questionário:

1) Nome: _____ 2) Idade: _____ 3) Sexo: _____

4) Possuem alguma doença? () sim () não

Qual?

5) Se portador de Esclerose Múltipla possui qual forma?

() surto-remissão () progressiva primária () progressiva secundária () não sei

Quanto tempo possui a doença?

6) Toma medicamentos? () sim () não

Quais? Para que?

7) Toma algum específico para Esclerose Múltipla? () sim () não
Qual? Quanto tempo faz uso deste medicamento?

8) Se mulher, fez ou faz uso de contraceptivos orais? Quanto tempo usa ou usou este medicamento?

9) Teve filhos?

7) Fumante? () sim () não

Outras Observações:
