

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITO PERIFÉRICO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DE
RADICAIS LIVRES: UM ESTUDO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ATP
DIFOSFOIDROLASE (EC 3.6.1.5) E 5'-NUCLEOTIDASE (EC 3.1.3.5) DE
PLAQUETAS DE RATOS ADULTOS E DO ESTRESSE OXIDATIVO
PLASMÁTICO.**

SILVANA SORIANO FRASSETTO

Orientador:

PROF. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS

Co-orientador:

PROF. CARLOS ALEXANDRE NETTO

**Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas -
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.**

Porto Alegre

1998

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditarmos nos nossos sonhos, nada é por acaso.”

Henfil.

Dedico esta tese aos meus pais, Aldo e Léa, que sempre souberam mostrar a importância de enfrentar e vencer os desafios para conquistar qualquer objetivo na vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, carinho e pelo grande incentivo para a realização desta tese.

Ao Sarkis pela orientação, pelo conhecimento e principalmente pela confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Alex pela co-orientação, pelo conhecimento, pelo incentivo e pela ajuda para a conclusão deste trabalho.

Ao Renato pelo conhecimento, pelo grande incentivo e força durante a realização deste trabalho.

Às colaboradoras e amigas Rosinha e Carla pela amizade, pelo apoio e ajuda neste trabalho.

À Ana pelo conhecimento e pelo incentivo durante este trabalho.

A todos os bolsistas de iniciação científica que ajudaram na realização desta tese.

À Adriane Belló Klein pelo conhecimento, pela amizade e pelas valiosas dicas durante a realização deste trabalho.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da UFRGS.

A todos os integrantes do departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente ajudaram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida e à FINEP, ao CNPq e à UFRGS pelo auxílio à pesquisa.

Ao Luís pelo carinho, pelo amor e pelo apoio.

À Deus, por iluminar e guiar os meus passos nesta trajetória.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xv
I. INTRODUÇÃO.....	01
I.1. ATP difosfohidrolase (apirase, EC 3.6.1.5).....	01
I.2. ADP extracelular e agregação plaquetária.....	06
I.2.1. Receptores purinérgicos P _{2T}	07
I.3. 5'-nucleotidase (EC 3.6.1.5).....	09
I.4. Adenosina.....	10
I.4.1. Receptores purinérgicos P ₁	12
I.5. Isquemia cerebral.....	14
I.5.1. Efeitos no sistema nervoso central.....	17
I.5.2. Efeitos periféricos.....	21
I.5.3. Pré-condicionamento isquêmico.....	22
I.6. Radicais livres.....	24
I.6.1. Radicais livres e plaquetas.....	26
I.6.2. Radicais livres e proteínas.....	27
I.7. Antioxidantes plasmáticos.....	29
I.8. Hipóteses do trabalho.....	30
I.9. Objetivos do trabalho.....	31

II. CAPÍTULO 1

"Free radical-induced inhibition of ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets.".....33

III. CAPÍTULO 2

"Free radicals alter 5'-nucleotidase activity (EC 3.1.3.5) from rat blood platelets.".....42

IV. CAPÍTULO 3

"Brain ischemia and reperfusion alter platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats.".....59

V. CAPÍTULO 4

"Preconditioning cancels peripheral oxidative stress associated with brain ischemia followed by reperfusion in rats.".....86

VI. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....114

VII. CONCLUSÕES GERAIS.....126

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....129

RESUMO

O nosso laboratório tem demonstrado que plaquetas de ratos expressam uma ectoenzima denominada ATP difosfoidrolase (EC 3.6.1.5) que hidrolisa ATP e ADP até AMP. Um possível papel fisiológico para esta enzima seria a participação em uma cadeia enzimática juntamente com uma 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) para a hidrólise completa do ATP até adenosina na circulação. Assim, a ATP difosfoidrolase hidrolisa ATP e ADP até AMP e a 5'-nucleotidase hidrolisa AMP até adenosina. Enquanto que o ATP e o ADP são descritos como nucleotídeos ativos nos vasos sanguíneos, sendo que o ADP é um fator de agregação plaquetária; a adenosina é um vasodilatador e inibidor da formação de microtrombos. Considerando que a ATP difosfoidrolase e a 5'-nucleotidase são importantes para a degradação de ATP, ADP e AMP e, possivelmente, para a formação de adenosina, a alteração destas atividades enzimáticas pode representar um fator que contribui para a injúria vascular em mecanismos patológicos associados aos radicais livres. Nós demonstramos o efeito *in vitro* de radicais livres nas atividades da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos. As plaquetas foram expostas a um sistema que forma radicais livres sendo que estas enzimas foram inibidas. A inibição enzimática não aconteceu quando adicionamos glutathione (GSH) e cisteína no meio de incubação. Os resultados indicam que tióis plasmáticos de peso molecular baixo são importantes para a defesa contra a injúria causada pelos radicais livres sobre estas enzimas. Como a nossa proposta é que a ATP difosfoidrolase e a 5'-nucleotidase regulam a concentração de nucleotídeos no microambiente plaquetário, a nossa hipótese é que o metabolismo de nucleotídeos e, conseqüentemente, a formação de adenosina por estas enzimas podem ser alterados por radicais livres levando à formação de microtrombos cardíacos e cerebrais em doenças vasculares como a isquemia. Estudos têm mostrado que pacientes com doença cerebrovascular isquêmica apresentam formação de microtrombos periféricos. Além disso, a isquemia cerebral causa a morte de neurônios vulneráveis devido à excitotoxicidade e ao estresse oxidativo, sendo que esta injúria é limitada quando o fenômeno de pré-condicionamento isquêmico é induzido. Muitos estudos têm sugerido que há a proteção contra a injúria neuronal após o pré-condicionamento porque um episódio de isquemia breve induz tolerância a episódios isquêmicos mais longos. Como o efeito protetor pelo pré-condicionamento contra a injúria tem sido atribuído à adenosina, é possível que as enzimas envolvidas na formação deste nucleosídeo no sistema nervoso e na circulação participem deste fenômeno como moduladores. A atividade de uma ATP difosfoidrolase de sinaptossomas de hipocampo de ratos tolerantes à isquemia cerebral foi demonstrada no nosso laboratório. No presente trabalho, nós investigamos a hipótese de que a isquemia cerebral transitória e o pré-condicionamento podem alterar o metabolismo de nucleotídeos na circulação periférica. Assim,

os efeitos da isquemia cerebral, da reperfusão e do pré-condicionamento foram estudados nas atividades da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos. Ratos adultos foram submetidos a um único episódio isquêmico (2 ou 10 min), ou a um episódio isquêmico duplo (pré-condicionamento isquêmico = 2+10 min) pelo método de oclusão dos quatro vasos. Ratos não pré-condicionados e pré-condicionados também foram submetidos à reperfusão. Os episódios isquêmicos de 2 ou 10 min inibiram a hidrólise do ATP e do ADP pela ATP difosfoidrolase de plaquetas. Por outro lado, a hidrólise do AMP pela 5'-nucleotidase aumentou depois de 2 min de isquemia, enquanto que com o episódio isquêmico de 10 min não houve efeito. O pré-condicionamento isquêmico ativou ambas as enzimas. Os efeitos da reperfusão foram diferentes para cada grupo experimental. As atividades enzimáticas retornaram aos níveis do controle no grupo que foi submetido a 2 min de isquemia e reperfusão. A atividade da ATP difosfoidrolase permaneceu inibida até 30 dias de reperfusão após 10 min de isquemia. Sessenta minutos e 1 dia de reperfusão após 10 min de isquemia inibiu a atividade da 5'-nucleotidase. Por outro lado, a enzima foi ativada após 10 min de isquemia seguidos de 2 e 5 dias de reperfusão, mas retornou aos níveis do controle depois de 10 e 30 dias. O pré-condicionamento isquêmico cancelou os efeitos dos 10 min de isquemia e da reperfusão sobre as atividades enzimáticas. Os resultados indicam que a isquemia cerebral e a reperfusão alteram a degradação de ATP, ADP e AMP por plaquetas e, provavelmente, a formação de adenosina na circulação. Além disso, o pré-condicionamento isquêmico ativa as enzimas levando a um possível aumento na degradação de ADP e formação de adenosina, e na consequente regulação da formação de microtrombos e do fornecimento de oxigênio ao tecido vascular. Embora a isquemia cerebral cause efeitos periféricos, ainda não foi definido se um provável estresse oxidativo está relacionado a estes efeitos. Entretanto, a ativação plaquetária na doença cardíaca isquêmica parece estar relacionada ao estresse oxidativo. No nosso estudo, sugerimos que a isquemia cerebral e a reperfusão podem causar, juntamente com o estresse oxidativo cerebral e a morte celular, um estresse oxidativo periférico que provavelmente está relacionado às alterações enzimáticas e à formação de microtrombos. Então, o nosso objetivo foi também estabelecer uma relação entre o pré-condicionamento isquêmico cerebral e uma possível proteção contra o estresse oxidativo periférico. Para avaliar esta possível relação, nós analisamos a emissão de quimioluminescência iniciada por *tert*-butil hidroperóxido e o conteúdo de tióis, como medidas do estresse oxidativo periférico, no plasma de ratos não pré-condicionados e pré-condicionados submetidos à isquemia cerebral produzida pelo método de oclusão dos quatro vasos. Os resultados mostram que 2 e 10 min de isquemia causam um aumento da quimioluminescência plasmática quando comparada aos ratos controle. No grupo que foi submetido a 2 min de isquemia, o efeito não permaneceu após a reperfusão. No grupo que foi submetido a 10 min de isquemia, o aumento permaneceu até 1 dia depois da reperfusão sendo que os valores retornaram aos níveis do controle após 2 dias. Entretanto, a

quimioluminescência plasmática de ratos pré-condicionados à isquemia (2+10 min) e à reperfusão não foi diferente quando comparada ao controle. Quando nós analisamos os tióis, houve uma diminuição do conteúdo de tióis plasmáticos depois de 2, 10 min e 2+10 min de isquemia seguidos da reperfusão. Assim, a isquemia causa, juntamente com o estresse oxidativo cerebral e a morte celular, um estresse oxidativo periférico. Os ratos protegidos pelo pré-condicionamento contra a morte neuronal não apresentaram um aumento da quimioluminescência plasmática causado pela isquemia cerebral. Além disso, a diminuição de tióis plasmáticos em todos os grupos que foram submetidos à reperfusão indica que estes podem ser utilizados como antioxidantes. Concluindo, parece que as alterações nas atividades da ATP difosfohidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos podem estar relacionadas a mecanismos patológicos associados aos radicais livres como a isquemia cerebral e a reperfusão.

ABSTRACT

Reports from our laboratory have shown that rat blood platelets contain an ecto-enzyme denominated ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) that hydrolyzes ATP and ADP to AMP. The possible physiological role for this enzyme is to participate in an "enzyme chain" together with a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) for the complete hydrolysis of ATP to adenosine in the bloodstream. Thus, ATP diphosphohydrolase activity hydrolyzes ATP and ADP to AMP and 5'-nucleotidase hydrolyzes AMP to adenosine. Whereas ATP and ADP are known to be vasoactive and platelet active nucleotides, respectively, adenosine is described as a vasodilator and inhibitor of platelet aggregation. Considering that ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase are important in ATP, ADP and AMP degradation and, possibly, for adenosine generation, we have suggested that the alteration of these enzymatic activities may represent a factor contributing to vascular injury in pathologic free radical mechanisms. We have demonstrated the *in vitro* effects of free radicals on ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities from rat blood platelets. Platelets were exposed to an oxidant-generating system and these enzymes were inhibited. Enzymatic inhibition was prevented by glutathione (GSH) and cysteine. The results may indicate that reduced low-molecular-weight thiols from plasma are important for the defense against the oxidant injury by free radicals on the enzymes. Since we have proposed that ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities regulate the nucleotide concentration in the platelet microenvironment, our hypothesis is that the nucleotide metabolism and, consequently, adenosine generation by these enzymes may be affected by free radicals leading to facilitation of cardiac or cerebral microthrombus formation in vascular diseases such as ischemia. Studies have shown that patients with ischemic cerebrovascular disease present peripheral microthrombus formation. It is also known that brain ischemia causes death of vulnerable neurons due to excitotoxic-triggered oxidative stress, but such injury is markedly limited when an ischemic preconditioning phenomenon is induced. Several studies have suggested that protection against neuronal injury after preconditioning occurs because a brief episode of ischemia induces tolerance to longer ischemic episodes. Since it has been postulated that the injury-limiting effect of preconditioning can be attributable to adenosine, it is possible that enzymes involved in the production of adenosine in the nervous system and in the circulation should participate or modulate such phenomenon. The activity of synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the hippocampus of rats tolerant to brain ischemia has been demonstrated. In the present study, we examined the hypothesis that transient brain ischemia and preconditioning may alter nucleotide peripheral metabolism. Thus, the effects of brain ischemia, reperfusion and preconditioning on rat blood platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities were evaluated. Adult rats were submitted to single ischemic episodes (2

or 10 min), or to a double ischemic episode (ischemic preconditioning - 2+10 min) by the four-vessel occlusion method. Naive and preconditioned rats were also reperfused. Single ischemic episodes inhibited ATP and ADP hydrolysis by platelet ATP diphosphohydrolase. On the other hand, AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase was increased after 2 min ischemia, whereas the 10 min ischemic event had no effect. Ischemic preconditioning caused activation of both enzymes. The effects of reperfusion were distinct for each experimental group. Enzyme activities returned to control levels in the 2 min ischemic group. The decrease in ATP diphosphohydrolase activity was maintained up to 30 days of reperfusion after 10 min ischemia. Sixty min and 1 day of reperfusion after 10 min ischemia inhibited 5'-nucleotidase activity. On the other hand, the enzyme activity was activated after 10 min ischemia followed by 2 and 5 days of reperfusion, but returned to control levels after 10 and 30 days. Interestingly, ischemic preconditioning cancelled the effects of 10 min ischemia and reperfusion on the enzymatic activities. The results indicate that brain ischemia alter ATP, ADP and AMP degradation from platelets and probably the generation of adenosine in the circulation. Furthermore, ischemic preconditioning activates the enzymes leading to a possible increase in ADP degradation and adenosine formation, and the consequent regulation of microthrombus formation and vascular tissue oxygen supply. Although it has been shown that brain ischemia induces peripheral effects, it has not been defined if a probable oxidative stress is related to these effects. However, it has been suggested that in ischemic heart disease platelet activation is related to oxidative stress. In our study, we have suggested that cerebral ischemia and reperfusion may cause, along with brain oxidative stress and cell death, a peripheral oxidative stress that probably is related to enzymatic alterations and microthrombus formation. Thus, our objective was also to establish a relationship between brain ischemic preconditioning and a possible protection against the state of peripheral oxidative stress. To evaluate this possible relationship, we measured the *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence emission and thiol content, as measures of peripheral oxidative stress, in plasma of naive and preconditioned rats submitted to brain ischemia produced by the 4-vessel occlusion method. Results show that both 2 and 10 min of ischemia cause an increase of plasma chemiluminescence when compared to control rats. In the 2 min ischemic group, the effect was not present after reperfusion. In the 10 min ischemic group, the increase was present up to 1 day after recirculation and values returned to control levels after 2 days. However, rats preconditioned to ischemia (2+10 min) and reperfusion showed no differences in plasma chemiluminescence when compared to controls. When we analyzed thiols, there was a decrease of plasma thiol content after 2, 10 min and 2+10 min of ischemia followed by reperfusion when compared to controls. Thus, ischemia causes, along with brain oxidative stress and cell death, a peripheral oxidative stress. Rats protected against neuronal death by preconditioning do not exhibit ischemia-induced increases in plasma chemiluminescence. Furthermore, the decrease in thiol content in all reperfused groups indicates its antioxidant

capacity. In conclusion, it seems that changes in ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities from rat blood platelets may be related to pathologic free radical mechanisms such as cerebral ischemia-reperfusion.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura I.1. - Esquema da hidrólise de ATP, ADP e AMP extracelular.....	5
Figura I.2 - Principais mecanismos celulares desencadeados em episódios de isquemia cerebral.....	16
Figura I.3 - Intermediários de radicais livres gerados pela molécula de oxigênio.....	25
Figura II.1. - "Time-course of the inhibitory effect of the oxidant-generating system (0.5 mM H ₂ O ₂ / 0.02 mM FeCl ₂ / 5 mM ascorbate) on ATP and ADP hydrolysis.".....	37
Figura II.2. - "Effect of varying concentrations of reduced glutathione on ATP and ADP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H ₂ O ₂ / 0.02 mM FeCl ₂ / 5 mM ascorbate).".....	38
Figura II.3. - "Effect of varying concentrations of cysteine on ATP and ADP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H ₂ O ₂ / 0.02 mM FeCl ₂ / 5 mM ascorbate)."	39
Figura II.4. - "Effect of 0.1 mM glutathione or 0.1 mM cysteine on platelet SH groups in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H ₂ O ₂ / 0.02 mM FeCl ₂ / 5 mM ascorbate).".....	39
Figura III.1. - "Time-course of the inhibitory effect of the oxidant-generating system (0.5 mM H ₂ O ₂ and 0.02 mM FeCl ₂) on AMP hydrolysis.".....	55
Figura III.2. - "Effect of 50 U/ml superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) on AMP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H ₂ O ₂ and 0.02 mM FeCl ₂).".....	56

- Figura III.3.** - "Effect of varying concentrations of reduced glutathione on AMP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H₂O₂ and 0.02 mM FeCl₂)."
.....57
- Figura III.4.** - "Effect of varying concentrations of cysteine on AMP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H₂O₂ and 0.02 mM FeCl₂)."
.....58
- Figura IV.1.** - "Activity of platelet ATP diphosphohydrolase (ATPase and ADPase) and 5'-nucleotidase (AMPase) after brain ischemia."
.....82
- Figura IV.2.** - "Activity of platelet ATP diphosphohydrolase (ATPase and ADPase) and 5'-nucleotidase (AMPase) after 2' (min) brain ischemia followed by reperfusion."
.....83
- Figura IV.3.** - "Activity of platelet ATP diphosphohydrolase (ATPase and ADPase) and 5'-nucleotidase (AMPase) after 10' (min) brain ischemia followed by reperfusion."
.....84
- Figura IV.4.** - "Activity of platelet ATP diphosphohydrolase (ATPase and ADPase) and 5'-nucleotidase (AMPase) after brain ischemic preconditioning followed by reperfusion."
.....85
- Figura V.1.**- "Effect of transient forebrain ischemia in rats on *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence of plasma and plasma thiols."
.....110
- Figura V.2.** - "Effect of 2 min (2') transient forebrain ischemia and reperfusion in rats on *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence of plasma and plasma thiols."
.....111
- Figura V.3.** - "Effect of 10 min (10') transient forebrain ischemia and reperfusion in rats on *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence of plasma and plasma thiols."
.....112

Figura V.4. - "Effect of brain ischemic preconditioning and reperfusion in rats on <i>tert</i> -butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence of plasma and plasma thiols."	113
--	-----

ABREVIATURAS

ATP - adenosina-5'-trifosfato

ADP - adenosina-5'-difosfato

AMP - adenosina-5'-monofosfato

SNC - sistema nervoso central

THA - 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridine

PAF - fator de agregação plaquetária

PDGF - fator de crescimento derivado de plaqueta

PLC - fosfolipase C

PKC - proteína quinase C (dependente de cálcio)

DAG - diacilglicerol

IP₃ - inositol 1,4,5-trifosfato

GPI - glicosil-fosfatidilinositol

EDRF/NO - fator de relaxamento derivado do endotélio / óxido nítrico

PKA - proteína quinase A (dependente de AMPc)

AMPc - AMP cíclico

GMPc - GMP cíclico

PKG - proteína quinase G (dependente de GMPc)

PIP₂ - fosfatidilinositol-4,5-difosfato

NMDA - N-metil-D-aspartato

AMPA - alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxasole-4-propionato

KA - cainato

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintetase

GFAP - proteína glial fibrilar ácida

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

GSH - glutathiona reduzida

TRIS - tris-(hidroximetil)-aminoetano

OGS - oxidant-generating system

TBA - thiobarbituric acid

DTNB - ácido 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico

I. INTRODUÇÃO

I.1 ATP difosfoidrolase (apirase, EC 3.6.1.5).

A denominação ATP difosfoidrolase (apirase) surgiu na literatura científica em 1945, quando MEYERHOF descreveu as enzimas capazes de remover dois fosfatos lábeis do ATP e um do ADP sendo AMP o produto final da reação. A partir de 1945, e principalmente na última década, várias ATP difosfoidrolases foram descritas em diferentes tipos de células sugerindo um papel importante no metabolismo celular. Estudos sobre a localização e o mecanismo de catálise das ATP difosfoidrolases, bem como sobre as funções do ATP, ADP e AMP no metabolismo, indicam o envolvimento da enzima na regulação dos níveis de nucleotídeos nas células e tecidos [KOMOSZYNSKI, 1994].

Além da atividade de hidrólise do ATP e do ADP, uma característica exclusiva das ATP difosfoidrolases é a de hidrolisar outros nucleosídeos di- e trifosfatados, o que as diferencia das ATPases que somente tem afinidade para hidrolisar o ATP [KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996]. Sendo assim, a capacidade de hidrolisar nucleosídeos di- e trifosfatados também sugere que provavelmente as ATP difosfoidrolases participem em diversos mecanismos.

Vários papéis fisiológicos têm sido propostos para as ATP difosfoidrolases dependendo da localização da atividade em diferentes organismos e tecidos, e sempre associado ao catabolismo intra- ou extracelular de nucleotídeos. Esta enzima está bem estudada em vegetais [TRAVERSO-CORI et alii, 1965; TOGNOLI & MARRÉ, 1981; VALENZUELA et alii, 1989; KETTLUN et alii, 1992]. Em vegetais, o papel fisiológico não está estabelecido e os estudos realizados restringem-se às características cinéticas da enzima, embora alguns autores tenham proposto sua participação no metabolismo

celular. Em batatas, as evidências apontam para um possível papel “anti-alimentador” para a enzima uma vez que o ATP, se disponível, deve servir como fagoestimulante para diversos insetos [RIBEIRO et alii, 1984].

Os invertebrados também apresentam a ATP difosfoidrolase. Um papel anti-trombótico foi proposto para a ATP difosfoidrolase presente na saliva de insetos hematófagos [RIBEIRO & GARCIA, 1980]. A enzima da saliva de inseto hidrolisa o ADP do sangue do hospedeiro retirando o nucleotídeo capaz de induzir agregação plaquetária, e assim favorece a alimentação do inseto [SARKIS et alii, 1986; RIBEIRO et alii, 1989; RIBEIRO et alii, 1990; RIBEIRO et alii, 1991]. Na superfície externa do tegumento de *Schistosoma mansoni* também foi descrita a ATP difosfoidrolase que provavelmente tem uma função anti-hemostática [VASCONCELLOS et alii, 1993; VASCONCELLOS et alii, 1996].

ATP difosfoidrolases também têm sido descritas em membranas celulares de diferentes espécies de mamíferos, incluindo células de tecidos normais e tumorais [LEBEL et alii, 1980; KNOWLES et alii, 1983; YAGI et alii, 1989; YAGI et alii, 1991; PIEBER et alii, 1991; YAGI et alii, 1992; VALENZUELA et alii, 1992; PICHER et alii, 1993; KETTLUN et alii, 1994; KACZMAREK et alii, 1996; SÉVIGNY et alii, 1997]. Com o trabalho de PIEBER et alii [1991], o papel anti-trombótico dessa enzima também foi demonstrado em mamíferos. A ATP difosfoidrolase de homogenato e fração microssomal de tecido da placenta de rato foi descrita como sendo capaz de inibir a agregação plaquetária quando hidrolisa o ADP [PIEBER et alii, 1991]. Além disso, a partir do trabalho de YAGI et alii [1992] foi sugerido uma possível participação da enzima na transdução de sinal através da adesão célula-célula.

Nos últimos dez anos a enzima tem sido muito estudada em nosso laboratório. Os primeiros estudos foram realizados em sistema nervoso central (SNC) de ratos.

Posteriormente, alguns trabalhos foram feitos com o objetivo de identificar ATP difosfoidrolases no sistema cardiovascular de ratos. Em SNC, uma ATP difosfoidrolase foi caracterizada em sinaptossomas de hipotálamo de ratos [SCHADECK et alii, 1989]. Em 1991, BATTASTINI et alii identificaram essa atividade enzimática em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos adultos. Recentemente, a ATP difosfoidrolase foi caracterizada e solubilizada a partir de membrana plasmática sináptica de ratos [BATTASTINI et alii, 1995]. Com relação ao sistema cardiovascular, outros trabalhos de caracterização foram realizados em nosso laboratório. Foi descrita uma ATP difosfoidrolase em plaquetas intactas de ratos [FRASSETTO et alii, 1993] e de humanos [PILLA et alii, 1996] bem como em sarcolema cardíaco de ratos [OLIVEIRA et alii, 1997].

Além de estudos de caracterização e localização da enzima em diferentes tecidos, a atividade da ATP difosfoidrolase frente a diferentes situações fisiológicas ou patológicas também tem sido estudada. Em sistema nervoso, foi realizado um estudo ontogenético em córtex cerebral de ratos [MÜLLER et alii, 1993]. Também foi descrito o efeito da desnutrição em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos [ROCHA et alii, 1990b] bem como o efeito da clorpromazina em sinaptossomas de núcleo caudado de ratos [ROCHA et alii, 1990a]. Além disso, o efeito da fenilalanina e seus metabólitos foi estudado em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos [WYSE et alii, 1994], bem como o efeito de metais pesados como cloreto de mercúrio [OLIVEIRA et alii, 1994], acetato de cádmio [BARCELLOS et alii, 1994] e cloreto de alumínio [SCHETINGER et alii, 1995]. SCHETINGER et alii [1994] ainda estudaram a atividade da enzima em hipocampo de ratos pré-condicionados à isquemia cerebral. Em 1996, demonstrou-se que a atividade da ATP difosfoidrolase de membrana plasmática sináptica é sensível à peroxidação lipídica e que a vitamina E tem um efeito protetor evitando este processo e,

conseqüentemente, a inibição da enzima [VIETTA et alii, 1996]. BONAN et alii [1997] mostraram o efeito do 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) sobre a atividade da ATP difosfohidrolase de sinaptossomas de ratos. Em plaquetas, foi descrito que a enzima é inibida e sua cinética alterada por ATP e ADP livres, ou seja, nas formas não complexadas com cálcio [FRASSETTO et alii, 1995]. Além disso, a ATP difosfohidrolase de plaquetas também é inibida por radicais livres enquanto que a glutatona e a cisteína protegem sua atividade [FRASSETTO et alii, 1997] (*Capítulo 1 da tese*).

Um das possíveis funções fisiológicas propostas pelo nosso grupo para a ATP difosfohidrolase é a sua participação, juntamente com a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), em uma cadeia enzimática para a hidrólise completa do ATP até adenosina. Assim, a ATP difosfohidrolase hidrolisa ATP e ADP até AMP e a 5'-nucleotidase hidrolisa AMP até adenosina. A cadeia enzimática está representada na figura I-1. Em sistema nervoso, a cadeia enzimática tem a função de hidrolisar o ATP, uma molécula neurotransmissora [EVANS et alii, 1992], e assim pode contribuir para a formação de adenosina, um neuromodulador [WILLIAMS, 1984]. Considerando o sistema vascular, a ATP difosfohidrolase é importante porque também hidrolisa o ADP, um agregante plaquetário [COLMAN, 1990], e assim juntamente com a 5'-nucleotidase pode produzir adenosina, molécula considerada como um potente inibidor da agregação plaquetária [KITAKAZE et alii, 1991] e vasodilatador [ENGLER, 1991]. Sendo assim, a nossa proposta é que a ATP difosfohidrolase de plaquetas, ao hidrolisar o ADP no seu microambiente, participe do controle da formação de microtrombos na circulação evitando a oclusão de vasos sanguíneos [SARKIS et alii, 1997].

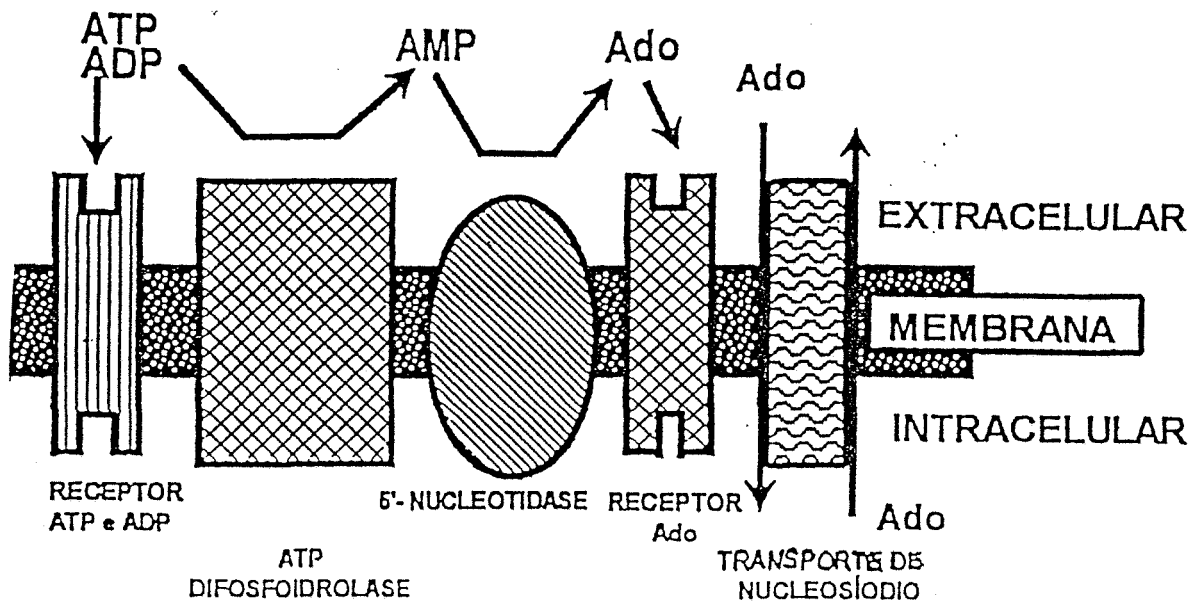


Figura I-1. Esquema da hidrólise de ATP, ADP e AMP extracelular. (adaptado de Lynden, 1994)

I.2 ADP extracelular e agregação plaquetária.

Estudos datados da década de sessenta mostraram que o ADP era capaz de induzir a agregação plaquetária [GAARDER et alii, 1961]. Neste trabalho somente o ADP e o desóxi-ADP tiveram esse efeito sendo que vinte e dois nucleotídeos foram testados. As reações da ativação plaquetária são desencadeadas pelo ADP extracelular liberado de plaquetas, eritrócitos ou células endoteliais lesadas e incluem exposição dos sítios de ligação para o fibrinogênio, influxo de cálcio extracelular e mobilização de cálcio intracelular, alterações em proteínas citoesqueléticas, fosforilação da cadeia leve da miosina e resíduos de tirosina em muitas proteínas bem como secreção do conteúdo de grânulos das plaquetas [COLMAN, 1990; HOLMSEN, 1996].

O ADP desempenha dois papéis importantes na ativação plaquetária. Em baixas concentrações (0.1 a 0.5 μM) o ADP induz mudança da forma plaquetária caracterizada pela formação de pseudópodos, um processo reversível. Em concentrações mais altas (2 a 5 μM), ocorre liberação do conteúdo dos grânulos alfa e grânulos densos e agregação plaquetária irreversível [COLMAN, 1990].

A ativação plaquetária começa com a ligação de um agonista extracelular ao seu respectivo receptor na superfície da plaqueta, mas é o sinergismo de vários agonistas que realmente determina o grau de agregação *in vivo*. Assim, o resultado da interação do primeiro agonista com seu receptor é a produção de outros agonistas que amplificam a resposta plaquetária [HOLMSEN, 1996]. Além do ADP, o fator de agregação plaquetária (PAF), a trombina, o colágeno, o tromboxano A_2 , a serotonina e a adrenalina também são considerados agregantes plaquetários [HOLMSEN, 1996]. O ADP como agonista é capaz de induzir a secreção do conteúdo dos grânulos densos e grânulos alfa. Os grânulos alfa contêm fatores de coagulação (fator V e VIII e

fibrinogênio) e de crescimento (fator de crescimento derivado de plaqueta - PDGF), proteínas específicas de plaquetas (fator 4 e B-tromboglobulina) e glicoproteínas (trombospondina e fibronectina). Os grânulos densos além de armazenar serotonina, também têm grandes quantidades de ATP e ADP que estão presentes em agregados moleculares os quais mantêm o equilíbrio osmótico. O ADP secretado dos grânulos densos no meio extracelular pode aumentar ainda mais a resposta estimulatória [HOLMSEN, 1996].

1.2.1 Receptores purinérgicos P_{2T} .

O receptor P_{2T} pode ser diferenciado de todos os outros receptores purinérgicos P_2 porque o ADP é o seu agonista natural enquanto que o ATP é um antagonista competitivo. Por outro lado, o ATP é um agonista para todos os outros subtipos de receptores P_2 (P_{2X} , P_{2Y} , P_{2U} e P_{2Z}). Além disso, o receptor P_{2T} é específico de plaquetas e de algumas células leucêmicas [MURGO et alii, 1992; MURGO et alii, 1994], ao contrário de outros receptores P_2 que são expressos em muitos tecidos [GACHET et alii, 1996].

O ADP induz agregação plaquetária através de um receptor purinérgico P_{2T} . Entretanto, parece que existem dois tipos de receptores para o ADP em plaquetas. Um receptor responsável pela agregação plaquetária e inibição da adenilato ciclase, o receptor P_{2T} , e um segundo receptor responsável pela mudança da forma das plaquetas e influxo de cálcio proposto como sendo um P_{2X1} [GACHET et alii, 1996; MACKENZIE et alii, 1996]. As características do receptor P_{2T} ainda são discutidas. Os receptores purinérgicos P_2 podem ser acoplados a uma proteína G (P_{2Y} e P_{2U}) ou a canais iônicos (P_{2X} e P_{2Z}), mas ainda não está claro em quais dessas duas categorias o receptor P_{2T} participa. Na realidade, parece ter algumas características das duas

categorias sugerindo que também há mais de um tipo de receptor P_{2T} em plaquetas [HOURANI & HALL, 1994].

A maioria dos agregantes plaquetários atuam através de receptores acoplados à uma proteína G para estimular uma fosfolipase C (PLC), com a resultante ativação de uma proteína kinase C (PKC) via diacilglicerol (DAG) e mobilização de cálcio intracelular via inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) [HOURANI & CUSACK, 1991]. Além disso, essas substâncias também causam influxo de cálcio [HEEMSKERK & SAGE, 1994]. Muitos agregantes inibem a adenilato ciclase via uma proteína G_i , mas essa inibição parece não ser responsável pela agregação plaquetária. Entretanto, como a adenosina e a prostaciclina inibem a agregação por estimular a adenilato ciclase, a inibição dessa enzima por agregantes pode aumentar a agregação *in vivo* [HOURANI & CUSACK, 1991]. O ADP e o 2-metilADP foram demonstrados como sendo ativadores de uma proteína G em plaquetas [GACHET et alii, 1992]. Estudos recentes sugerem que esta proteína G pode ser uma G_{i2} , responsável pela inibição da adenilato ciclase [OHLMANN et alii, 1995].

Muitas proteínas que ligam o ADP têm sido propostas como sendo receptores para este nucleotídeo: uma proteína de 100kDa denominada agreguina [COLMAN, 1990] e mais recentemente uma proteína de 43kDa [CRISTALII & MILLS, 1993]. No entanto, não existem evidências de que essas proteínas sejam realmente receptores para o ADP em plaquetas. Sendo assim, como o próprio receptor P_{2T} ainda não foi totalmente caracterizado por técnicas bioquímicas ou de biologia molecular, certamente um melhor conhecimento da via de ativação plaquetária pelo ADP será muito importante para a identificação desse receptor.

1.3 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5).

A 5'-nucleotidase catalisa a hidrólise de 5'-AMP até adenosina e fosfato inorgânico em diferentes tipos de células. Essa enzima é uma glicoproteína [ancorada a GPI (glicosil-fosfatidilinositol)] intrínseca de membrana plasmática [ZIMMERMANN, 1992], mas também está presente em membranas de retículo endoplasmático [MAGNUMSSON et alii, 1974] e em forma solúvel no citosol [ORFORD & SAGGERSON, 1996].

A 5'-nucleotidase de membrana plasmática é descrita como sendo uma ectoenzima que contribui em uma cascata enzimática para a completa hidrólise do ATP, ADP e AMP extracelular até adenosina. Assim, essa enzima catalisa a etapa final da cascata enzimática quando desfosforila o AMP. Por ser uma das enzimas responsáveis pela produção de adenosina em vários tecidos [NISHIO et alii, 1987; ZIMMERMANN, 1992; ZIMMERMANN et alii, 1993; DARVISH, 1996], a 5'-nucleotidase possui um papel fisiológico importante. A inativação extracelular do ATP e do ADP até AMP com a consequente formação de adenosina por uma 5'-nucleotidase induzem diferentes efeitos fisiológicos uma vez que o ATP e o ADP são agonistas de receptores purinérgicos P_2 [HARDEN et alii, 1995], enquanto que a adenosina é um agonista de receptores purinérgicos P_1 [OLAH & STILES, 1995]. Sendo assim, a degradação desses nucleotídeos até adenosina por ectoenzimas é um mecanismo importante para o controle dos efeitos fisiológicos que ocorrem através dos receptores P_2 e P_1 . Além dessa função catalítica, também tem sido atribuído à 5'-nucleotidase um papel na adesão e no reconhecimento celular por estar associada a componentes de membrana plasmática [VOLKNANDT et alii, 1991; ZIMMERMANN, 1992].

I.4 Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo com importantes funções biológicas. Desde a sua identificação no miocárdio em 1929 [DRURY & SZENT-GYORGYI et alii, 1929], muitos pesquisadores têm mostrado que este nucleosídeo também controla muitos processos no sistema nervoso além do sistema cardiovascular. Com relação ao sistema nervoso central, a adenosina tem várias ações quando se liga a receptores purinérgicos A₁: inibição da liberação de neurotransmissores, inibição da transmissão sináptica, supressão espontânea da excitação neuronal [MEGHLI et alii, 1989] e redução no influxo de cálcio [DOLPHIN & ARCHER, 1983]. Muitos trabalhos têm demonstrado que a adenosina possui ação neurotransmissora e neuromoduladora em várias áreas do sistema nervoso central de mamíferos [PHILLIPS & WU, 1981]. Sua capacidade de inibir a liberação de neurotransmissores leva à hipótese de a adenosina tenha como função manter o "tônus inibitório" na neurotransmissão excitatória [WILLIAMS, 1984] e que também atue como neuromodulador inibitório [DUNWIDDIE, 1980].

Foi demonstrado que os níveis de adenosina cerebrais aumentam quando diminui a concentração de oxigênio disponível [VAN WYLEN et alii, 1986; PÉREZ-PINZÓN et alii, 1993] na isquemia [WINN et alii, 1979] e em convulsões [WINN et alii, 1980]. Assim, a adenosina pode influenciar funções neuronais além de atuar sobre a regulação do fluxo sanguíneo uma vez que é considerada vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária quando se liga a receptores purinérgicos A₂ no músculo liso vascular e em plaquetas, respectivamente [PHILLIS, 1989; KITAKAZE et alii, 1991]. Na isquemia o papel neuroprotetor da adenosina é evidente. Essa proteção é devida aos seguintes mecanismos: 1) diminuição da liberação de aminoácidos excitatórios como o glutamato via receptor purinérgico A₁; 2) manutenção da homeostase intracelular de

cálcio; e 3) manutenção do potencial de membrana, para que não ocorra despolarização induzida, fazendo com que os canais de K^+ dependentes de voltagem não sejam bloqueados [RUDOLPHI et alii, 1992b].

A adenosina também tem várias funções cardíacas. Quando ocorre uma isquemia do miocárdio a irrigação sanguínea é comprometida e grande quantidade de adenosina é formada pelo coração em hipóxia numa tentativa de recuperar o fluxo sanguíneo coronário e manter o equilíbrio entre o fornecimento e a exigência de oxigênio [ELY & BERNE, 1992]. Além disso, esse nucleosídeo pode: 1) inibir os efeitos metabólicos e hemodinâmicos da estimulação beta-adrenérgica por mecanismos pré-sinápticos e pós-sinápticos para reduzir o gasto de energia do coração quando o fornecimento de oxigênio fica limitado [DOBSON et alii, 1987]; 2) reduzir o ritmo cardíaco pela inibição da formação e condução do impulso nos nodos sino-atrial e átrio-ventricular, respectivamente [SCHRADER, 1990]. Clínicamente, a adenosina parece eliminar a taquicardia supraventricular [DI MARCO et alii, 1985]; 3) inibir a formação de ânions superóxido por neutrófilos humanos; este efeito pode diminuir a injúria causada por radicais livres de oxigênio induzida por neutrófilos sobre as células endoteliais [CRONSTEIN et alii, 1986]. Os ânions superóxido de leucócitos ativados estão envolvidos na degradação do EDRF/NO (fator de relaxamento derivado do endotélio/óxido nítrico), o que resultaria em vasoconstrição [GRYGLEWSKI et alii, 1986]. Durante a isquemia cardíaca, essa ação antiinflamatória da adenosina pode limitar a proporção do infarto [ENGLER et alii, 1986; CRONSTEIN, 1994]; 4) estimular a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais, um mecanismo que também induz vasodilatação [LI et alii, 1995]; e 5) inibir a agregação plaquetária sendo portanto anti-trombogênica [KITAKAZE et alii, 1991].

Recentemente, outras funções têm sido atribuídas à adenosina. ABBRACCHIO et alii [1995] mostraram que esse nucleosídeo pode induzir apoptose (morte celular programada) de células astrogliais. Foi demonstrado que a adenosina também ativa as enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, glutaciona peroxidase e também a enzima associada glutaciona redutase possivelmente através da sua ligação a receptores purinérgicos A_3 acoplados à proteína G e à fosfolipase C. O aumento da concentração de cálcio intracelular e diacilglicerol a partir dessa reação leva à ativação de uma proteína quinase C e subsequente fosforilação e ativação das enzimas antioxidantes [RAMKUMAR et alii, 1995]. O resultado deste processo é uma proteção eficiente contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica em situações como isquemia e reperfusão. Além disso, a adenosina tem sido descrita como sendo um "scavenger" de radicais livres hidroxil ($\cdot\text{OH}$) [YOKOI et alii, 1995; KÜNZEL et alii, 1996].

Estas funções protetoras da adenosina no sistema nervoso e cardiovascular indicam que manipulações farmacológicas dos níveis deste nucleosídeo podem ter efeitos terapêuticos na prevenção e no tratamento de injúrias cardíacas e cerebrais [FRASSETTO et alii, 1995; PHILLIS, 1995; VON LUBITZ et alii, 1995].

1.4.1 Receptores purinérgicos P_1

Entre os receptores purinérgicos, os receptores P_1 são bastante estudados. Os receptores P_1 são ativados com o potencial agonista na ordem de adenosina > AMP > ADP > ATP e estão subdivididos em A_{1a} , A_{1b} , A_{2a} , A_{2b} , A_3 e A_4 . Estes receptores também são mediadores das respostas de ativação através de mecanismos de

transdução de sinal múltiplos; são acoplados a uma proteína G que liga nucleotídeos da guanina [OLAH & STILES, 1995; WINDSCHEIF, 1996].

A adenosina tem vários modos de ação dependendo do tipo de receptor P_1 que é ativado. Os receptores A_1 , A_2 e A_3 têm uma ação diferenciada sobre a atividade da adenilato ciclase: os receptores A_1 e A_3 inibem a enzima e os receptores A_2 a ativam. Esta enzima é inibida ou estimulada através do acoplamento com uma proteína G_i ou G_s , respectivamente. Como consequência, os níveis de AMPc (AMP cíclico) intracelular diminuem ou aumentam, respectivamente. Com o aumento destes níveis, proteínas quinase dependentes de AMPc (PKA) são ativadas podendo fosforilar muitas proteínas modulando-as e alterando funções fisiológicas [WINDSCHEIF, 1996].

A atividade da guanilato ciclase também é estimulada através de uma proteína G_s e leva à formação de GMP cíclico (GMPc) que ativa proteínas quinase específicas (PKG). Esta estimulação também é mediada por receptores A_2 e tem como efeitos a redução da concentração intracelular de cálcio e a vasodilatação [WINDSCHEIF, 1996].

Além da relação dos receptores A_1 e A_3 com a inibição da atividade da adenilato ciclase, a ativação destes receptores pode estimular a enzima fosfolipase C (PLC) através de uma proteína G_p . Esta enzima hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP_2) até inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), que são mensageiros secundários. O IP_3 induz a liberação de cálcio intracelular armazenado enquanto que o DAG ativa proteínas quinase C (dependentes de cálcio) que podem fosforilar proteínas. Além disso, os receptores A_1 também são mediadores de efeitos em canais de potássio e cálcio [WINDSCHEIF, 1996].

Diversos eventos fisiológicos podem ser mediados pelos receptores P_1 em diferentes tipos celulares dependendo do subtipo de receptor que é ativado. Dentre estes, destacamos os efeitos sobre: o ritmo cardíaco, a contratilidade do coração, o

tônus vascular, a modulação na liberação de neurotransmissores, a adipólise e a agregação plaquetária [SÉVIGNY & BEAUDOIN, 1994].

1.5 Isquemia cerebral

A isquemia é definida como uma interrupção completa ou parcial do aporte de sangue a um determinado tecido resultando, conseqüentemente, em um decréscimo de chegada de oxigênio e metabólitos [SWEENEY et alii, 1995]. O sistema nervoso central é um dos tecidos mais sensíveis à isquemia e à hipóxia porque apresenta um metabolismo oxidativo ativo e poucas reservas energéticas [MARANGOS et alii, 1990].

A isquemia cerebral pode ser focal ou global. A isquemia focal é devida à presença de trombos ou embolia sendo caracterizada pela interrupção do aporte de sangue apenas para uma região específica do cérebro. A isquemia global acontece após uma parada cardíaca e caracteriza-se pela interrupção da circulação para todo o cérebro [SWEENEY et alii, 1995]. O episódio isquêmico pode ser transitório se houver reperfusão posterior, ou permanente se houver dano vascular irreversível e impossibilidade de reperfusão.

A isquemia cerebral tem sido muito estudada em modelos experimentais [HUNTER et alii, 1995]. A isquemia cerebral global transitória, realizada neste trabalho, pode ser produzida em ratos não anestesiados pela oclusão dos quatro vasos (4-VO): a oclusão permanente das duas artérias vertebrais e a oclusão transitória das duas carótidas comuns impedem o aporte de sangue ao cérebro [PULSINELLI et alii, 1982].

Durante a isquemia cerebral ocorrem diversas alterações no sistema nervoso central (tecido neuronal) e na circulação central e periférica que são descritas a seguir. As conseqüências moleculares da isquemia cerebral incluem mudanças nos sistemas de sinalização intercelular (neurotransmissores, neuromoduladores), nos sistemas de

transdução de sinais (receptores, canais iônicos, segundos mensageiros e reações de fosforilação), no metabolismo (carboidratos, proteínas, ácidos graxos, radicais livres) e na regulação da expressão gênica [PULSINELLI, 1992] (Figura I-2).

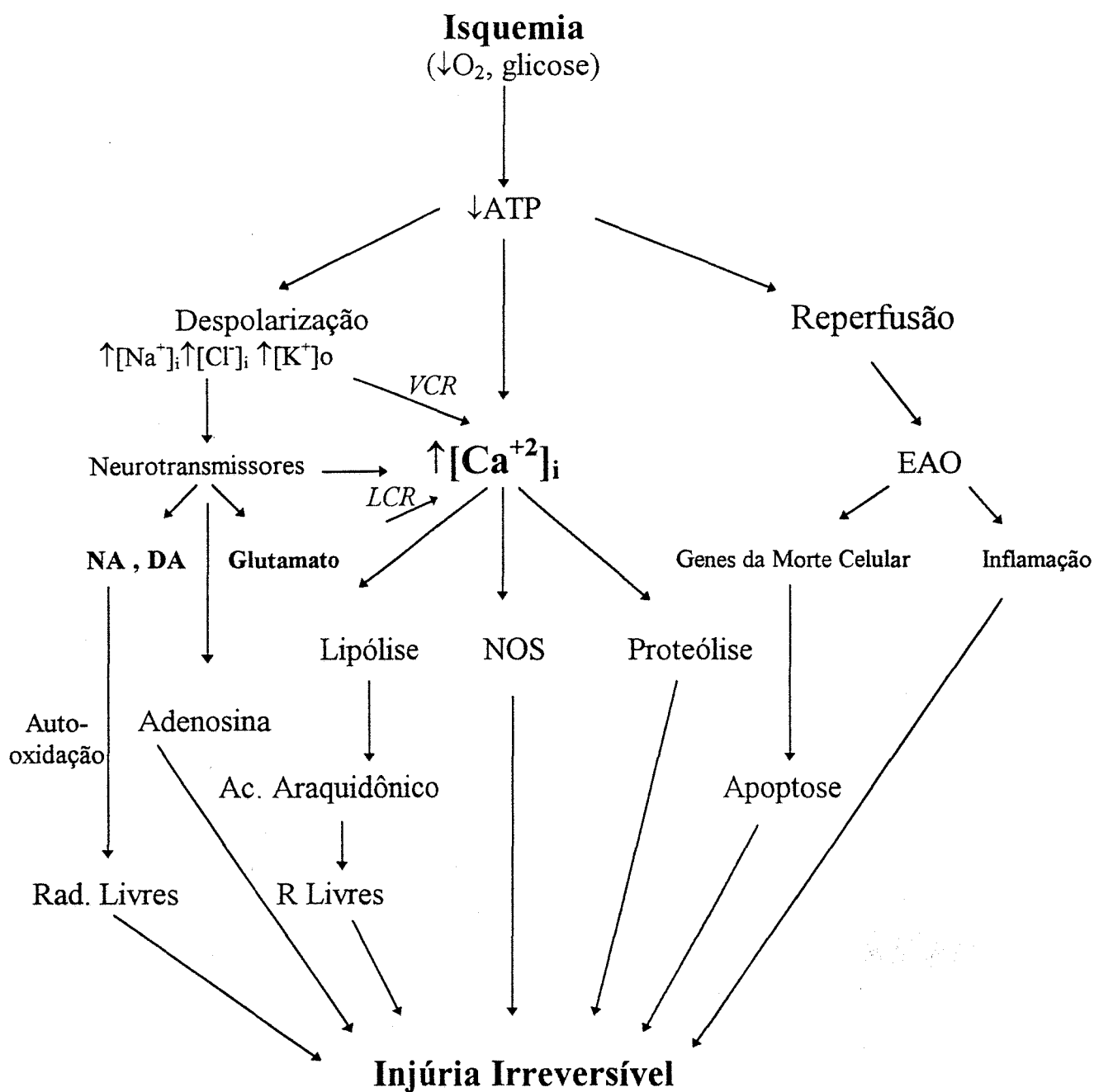


Figura I-2. Principais mecanismos celulares desencadeados em episódios de isquemia cerebral. (LCR - ligant calcium receptor; VCR - voltage calcium receptor; EAO - espécies ativas de oxigênio; NOS - nitric oxide synthase; NA - noradrenalina; DA - dopamina).

I.5.1 Efeitos no sistema nervoso central

A injúria e morte neuronal são as principais consequências da isquemia cerebral. Durante os primeiros momentos da isquemia as células sofrem uma privação de glicose e do acceptor mitocondrial de elétrons, o oxigênio, necessários para o metabolismo oxidativo normal. Com a falta de oxigênio, a glicólise aeróbica torna-se prejudicada e a glicose passa a ser degradada anaeróticamente. Assim, a produção de ATP torna-se insuficiente e há acidose celular [MARTIN et alii, 1994]. A acidose intracelular pode ser causada por um acúmulo de ácido láctico, um aumento na tensão de CO_2 (PCO_2) e por prótons gerados na degradação do ATP e no metabolismo da glicose [FAROOQUI et alii, 1994; PULSINELLI, 1992]. O principal efeito da diminuição do pH celular é a formação de edema, a inibição na recaptação de neurotransmissores e a formação de radicais livres [FAROOQUI et alii, 1994].

Durante a isquemia também há um aumento da liberação de glutamato e de outros aminoácidos excitatórios como o aspartato e a cisteína no espaço extracelular [SLIVKA & COHEN, 1993; PHILLIS & O'REGAN, 1996]. Existem evidências de que o aumento da liberação de glutamato, resultando em despolarização e aumento na concentração intracelular de cálcio, é a principal causa da morte neuronal na isquemia cerebral. A suscetibilidade neuronal ao glutamato e aos demais aminoácidos excitatórios acontece pela intensa estimulação dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxasole-4-propionato) e KA (cainato) sendo que este processo é denominado excitotoxicidade [SWEENEY et alii, 1995].

O aumento da entrada de cálcio para dentro da célula, através da abertura de canais acoplados aos receptores para os aminoácidos excitatórios, também está relacionado com a injúria e morte celular [FAROOQUI et alii, 1994; KRISTIÁN &

SIESJÖ, 1996]. O cálcio é o segundo mensageiro mais importante no tecido neuronal. Quando aumenta a sua concentração intracelular, um grande número de eventos metabólicos que interferem na recuperação dos neurônios é desencadeado. Entre eles estão: a ativação de enzimas hidrolíticas dependentes de cálcio; o aumento na depleção de ATP; a ativação de fosfolipases, quinases, fosfatases e proteases; alterações na expressão gênica; e o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio através da ativação da fosfolipase C [SWEENEY et alii, 1995]. Com o aumento da hidrólise de fosfolipídeos de membrana, ácidos graxos livres, incluindo o ácido araquidônico, são acumulados [FAROOQUI et alii, 1994]. Essa hidrólise desfaz o gradiente iônico e é um dos fatores responsáveis pela morte neuronal [CHAVKO & NEMOTO, 1992]. Há três processos envolvidos no dano causado pela isquemia na membrana celular: a ativação de fosfolipases A₁, A₂ e C [CHAVKO & NEMOTO, 1992; FAROOQUI et alii, 1994]; a inibição da ressíntese de fosfolipídeos causada pela baixa carga energética; e mudanças na integridade da membrana podendo causar ruptura mecânica [FAROOQUI et alii, 1994].

Os ácidos graxos, liberados durante a isquemia pelas fosfolipases, são desacopladores da fosforilação oxidativa e causam o efluxo de cálcio e potássio da mitocôndria para o citosol. O ácido araquidônico produzido é substrato para a formação de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos que são reguladores do fluxo sanguíneo cerebral. Além disso, essas substâncias podem gerar radicais livres de oxigênio que peroxidam ácidos graxos de membrana causando também alterações na estrutura de proteínas [FAROOQUI et alii, 1994].

As espécies reativas de oxigênio são descritas como sendo um dos principais mediadores fisiopatológicos da degeneração neuronal induzida pela isquemia. O seu papel de injúria na isquemia ficou evidente a partir de estudos que demonstraram que

vários “scavengers” protegem contra o dano isquêmico [WATANABE et alii, 1994], e camundongos transgênicos que expressavam mais a enzima superóxido dismutase sofriam menos danos celulares quando submetidos à isquemia focal [KINOUCI et alii, 1991]. A maior parte do dano provocado por essas espécies acontece durante a reperfusão, ou seja, no momento em que o tecido isquêmico volta a receber a circulação sanguínea [HALL, 1993]. Durante a reperfusão, a chegada de oxigênio ao tecido é intensa e este começa a equilibrar o seu metabolismo. Entretanto, a capacidade de utilização de oxigênio pela citocromo oxidase mitocondrial (cadeia respiratória) no metabolismo oxidativo celular é ultrapassada, favorecendo a produção de espécies reativas de oxigênio [PIANTADOSI & ZHANG, 1996]. Por outro lado, parece que a extensão dos danos causados pela produção de espécies reativas de oxigênio durante a reoxigenação é dependente da duração e amplitude da isquemia prévia [AGARDH et alii, 1991].

Outro fator que induz a formação de espécies reativas de oxigênio no sistema nervoso central em situações de isquemia e reperfusão, é a própria excitotoxicidade. A liberação de aminoácidos excitatórios e a ativação dos seus receptores pode estimular a formação de espécies reativas de oxigênio, e o aumento da produção dessas espécies pode levar a uma maior liberação de aminoácidos excitatórios. Portanto, existe uma relação entre a excitotoxicidade e o estresse oxidativo [YANG et alii, 1996]. Assim, o estresse oxidativo é devido a um aumento da produção de radicais livres mas também é devido a uma diminuição da capacidade antioxidante endógena [HALLIWELL, 1992].

Além da produção de espécies reativas de oxigênio pela cadeia respiratória e pelo processo de excitotoxicidade, a adenosina produzida em concentrações elevadas durante a isquemia quando completamente degradada também pode formar essas espécies (radical superóxido - $O_2^{\cdot -}$ e peróxido de hidrogênio - H_2O_2). A conversão da

xantina desidrogenase à xantina oxidase durante a isquemia e hipóxia é responsável por esse processo [ROY & McCORD, 1983].

Entre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é considerado muito deletéreo às células. A peroxidação de lipídeos, principalmente de membranas [BROMONT et alii, 1989], a fragmentação e agregação de proteínas comprometendo a funcionalidade da mesmas e a quebra de fitas e modificação de bases de ácidos nucleicos são alguns efeitos dessas espécies [FAROOQUI et alii, 1994]. Além do radical hidroxil, o óxido nítrico (NO) também é um radical livre envolvido em mecanismos da isquemia cerebral. Em neurônios, o NO é sintetizado por uma óxido nítrico sintetase (NOS) dependente de Ca^{2+} -calmodulina que fica muito ativa durante a isquemia [SWEENEY et alii, 1995].

Durante a isquemia cerebral o óxido nítrico pode ter efeitos protetores e tóxicos. As diferenças observadas com relação aos efeitos do óxido nítrico na viabilidade celular estão relacionadas à presença ou ausência do radical superóxido (O_2^-). Na isquemia o superóxido pode combinar-se ao óxido nítrico dando origem ao ânion peroxinitrito que é muito tóxico como oxidante [IADECOLA, 1997]. Por outro lado, o óxido nítrico tem ações protetoras porque é vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária e inibidor de receptores NMDA o que limitaria a excitotoxicidade [IADECOLA, 1997].

O óxido nítrico é o único radical livre que tem funções protetoras na isquemia, mas existem outros mecanismos protetores como: a ação de enzimas antioxidantes [TRUELOVE et alii, 1994], e a modulação da temperatura cerebral [GLOBUS et alii, 1995; ZHAO et alii, 1996]. Assim, a hipotermia tem um efeito neuroprotetor na isquemia que está relacionado à redução da formação de espécies reativas de oxigênio [GLOBUS et alii, 1995; ZHAO et alii, 1996].

I.5.2 Efeitos periféricos

Além dos efeitos da isquemia cerebral no sistema nervoso central, alguns efeitos periféricos também têm sido descritos. O óxido nítrico formado em neurônios pode difundir através do endotélio para o espaço intravascular durante a isquemia cerebral e a reperfusão. KUMURA et alii [1994] mostraram que durante a isquemia cerebral focal seguida de reperfusão em ratos ocorre um aumento plasmático de óxido nítrico e principalmente de seus produtos (nitratos e nitritos). Os níveis de nitrosil hemoglobina (HbNO) na circulação periférica aumentam significativamente durante a reperfusão e a superóxido dismutase contribui ainda mais para este efeito, o que indica que também há reação entre o óxido nítrico e radicais superóxido durante a reperfusão formando peroxinitrito [KUMURA et alii, 1996].

A ativação plaquetária e a agregação com eritrócitos é um dos principais efeitos periféricos da doença isquêmica cerebrovascular [ISAKA et alii, 1989; TANAHASHI et alii, 1996]. O fator de ativação plaquetária (PAF) é rapidamente sintetizado, liberado ou expressado pelo endotélio e pela membrana de neutrófilos, de monócitos e de plaquetas durante a isquemia cerebral [LINDSBERG et alii, 1991]. Este fator induz ativação de plaquetas e de leucócitos e é considerado um dos principais mediadores de danos a tecidos, inclusive no sistema nervoso central, durante a isquemia cerebral [MATSUO et alii, 1996]. Os eritrócitos também têm um papel importante na agregação plaquetária. A agregação parece estar relacionada ao hematócrito, sendo que este efeito pela presença de eritrócitos é devido ao dano celular e liberação de ADP, um agregante plaquetário [SANIABADI et alii, 1987].

Alterações "in vitro" da funcionalidade de plaquetas têm sido descritas em pacientes com doença cerebrovascular isquêmica sugerindo que modificações em

receptores e grânulos alfa de plaquetas podem ocorrer na circulação. Assim, parece que glicoproteínas da superfície de plaquetas são alteradas em pacientes com isquemia cerebral [LEGRAND et alii, 1991].

1.5.3 Pré-condicionamento isquêmico

O fenômeno de pré-condicionamento de um tecido contra o dano da isquemia também conhecido por tolerância isquêmica induzida foi descrito originalmente por MURRY et alii [1986], que demonstraram que pequenas oclusões das artérias coronárias (isquemias subletais) seguidas de reperfusão protegiam o coração de cachorros quando uma isquemia e reperfusão letais ocorriam posteriormente. A partir deste trabalho, muitos modelos foram estabelecidos para o estudo deste fenômeno em diferentes espécies de animais e tecidos, destacando-se aqueles de isquemia cardíaca ou cerebral [LOSANO et alii, 1996; RESHEF et alii, 1996]. O modelo de tolerância induzida em ratos utilizado neste trabalho foi estabelecido em nosso laboratório por Schetinger et alii [1994].

Em camundongos, a relação entre o dano isquêmico e a tolerância induzida também foi estudada. Foi observado que animais submetidos a episódios breves de isquemia cerebral (2 minutos), que não causam dano celular, apresentam tolerância a períodos mais longos de isquemia (10 ou 20 minutos) os quais causam morte neuronal de até 90% em determinadas regiões do cérebro. Assim, o fenômeno de tolerância induzida é observado pela ausência ou diminuição da injúria neuronal [KITIGAWA et alii, 1990; KIRINO et alii, 1991].

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno de proteção do pré-condicionamento isquêmico. Um papel protetor é atribuído a algumas proteínas que começam a se expressar após um episódio isquêmico breve, entre elas estão as

“heat shock proteins” (proteínas de choque térmico), a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a c-fos [KITIGAWA et alii, 1990; KIRINO et alii, 1991; FAROOQUI et alii, 1994]. A proteção permite que a célula seja exposta a um novo episódio isquêmico sem sofrer danos irreversíveis.

Além da síntese de determinadas proteínas, alguns autores sugerem que os mecanismos para o aumento da produção de adenosina são muito importantes no processo de tolerância. Alguns estudos indicam que o efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico é atribuído à este nucleosídeo [LIU et alii, 1991; TOOMBS et alii, 1992]. O processo é iniciado pela liberação de adenosina, o produto da degradação do ATP, que ativa os receptores A_1 na superfície externa da membrana celular. Essa ligação aos receptores estimula uma cascata de eventos intracelulares, finalmente resultando em uma melhor capacidade para resistir ao dano isquêmico [RESHEF et alii, 1996]. YTREHUS et alii [1994] demonstraram que o pré-condicionamento protege o coração de coelhos contra a injúria isquêmica pela ativação da proteína quinase C, sendo que este efeito foi atribuído à adenosina ou a catecolaminas [TSUCHIDA et alii, 1994]. Além disso, a ativação da proteína quinase C estimula a atividade da ecto-5'-nucleotidase de cardiomiócitos de ratos, mediando a proteção. Assim, parece que a ativação da proteína quinase C protege o miocárdio contra a injúria pela fosforilação e ativação da ecto-5'-nucleotidase e consequente produção de mais adenosina [KITAKAZE et alii, 1996b; NODE et alii, 1997].

Estes efeitos de proteção do fenômeno de pré-condicionamento mostram a importância dos mecanismos de adaptação celular contra o dano isquêmico letal.

I.6 Radicais livres

Radicaís livres são espécies químicas altamente reativas que diferem de todas as outras por possuírem um elétron não pareado. Todas as espécies químicas convencionais apresentam uma característica em comum: elas têm pares eletrônicos completos ocupando regiões do espaço denominadas orbitais. Os elétrons podem ser caracterizados como sendo cargas negativas circulando em torno de um núcleo positivo. A razão pela qual eles necessitam ser pareados é que, além de traçar uma órbita em torno do núcleo, eles também giram em torno de seu próprio eixo; e para manter a estabilidade, cada elétron que gira para direita deve ser equilibrado por um elétron que gira para a esquerda (spins opostos) em um mesmo orbital. Portanto, uma ligação química comum é constituída por dois elétrons, sendo que cada lado da ligação contribui com um elétron. Quando a ligação se rompe ela se divide de modo que um fragmento retém ambos os elétrons e o outro não retém nenhum. Mas é possível que uma ligação se rompa de tal modo que cada um dos dois fragmentos retenham um elétron da ligação, isto é, por divisão homolítica. Se este processo ocorrer e se um dos fragmentos resultantes mantiver uma existência independente por um período suficiente para reagir independentemente com outra molécula ou íon, então estes fragmentos são qualificados como radicaís livres [DEL MAESTRO, 1980; HALLIWELL, 1991]. Os radicaís livres de oxigênio também são considerados espécies reativas de oxigênio, porém o inverso não é correto. Este último termo foi criado porque nem todas as espécies envolvidas nas reações de radicaís possuem elétrons desemparelhados.

O elétron desemparelhado confere ao radical livre uma certa instabilidade, tanto no plano energético como cinético. Do ponto de vista energético, os radicaís livres tendem a obter elétrons de seus companheiros eletrônicos. Do ponto de vista cinético, o

fato dos radicais livres possuírem um elétron não acoplado sobre sua órbita periférica, favorece consideravelmente as colisões biomoleculares e a sua aproximação com outras moléculas. Assim, quando o radical livre reage com uma molécula vizinha, ele transforma rapidamente esta última também em radical livre ao ir em busca de um elétron "estabilizador". Desta maneira, começa uma reação em cadeia de formação de radicais livres [DEL MAESTRO, 1980].

Existem alguns fatores que promovem a atividade dos radicais livres como os íons de metais de transição que podem perder ou ganhar um elétron a medida que mudam o seu estado de valência, o grau de insaturação das moléculas, a irradiação de alta energia (raios X e luz ultra-violeta) e o oxigênio molecular. O oxigênio molecular é crucial para a maioria dos processos dos radicais livres. É uma molécula original que comporta dois elétrons desemparelhados (bi-radical) e é no entanto estável, não reage espontaneamente com as moléculas não radicais. Por outro lado, o oxigênio apresenta uma afinidade muito grande por outras áreas moleculares instáveis. Assim, a própria molécula de oxigênio pode gerar diversos intermediários de radicais livres muito reativos. Estes intermediários são os responsáveis pelos efeitos do oxigênio [DEL MAESTRO, 1980] (Figura I-3).

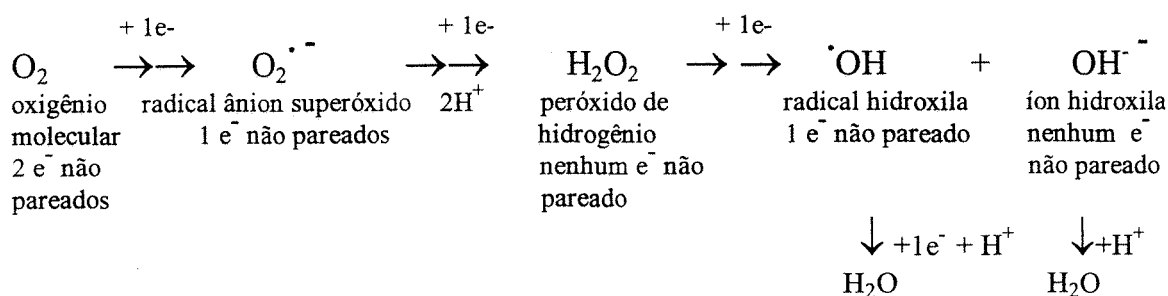


Figura I-3. Intermediários de radicais livres gerados pela molécula de oxigênio.

I.6.1 Radicais livres e plaquetas

Nos últimos anos, muitos estudos têm mostrado a relação entre os radicais livres e a função plaquetária devido às evidências que mostram o seu papel fisiopatológico na doença cardiovascular. Entre os primeiros estudos, está o trabalho de MARCUS et alii [1977], que demonstraram a produção do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por plaquetas. Estudos posteriores mostraram que durante a agregação, espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são liberadas por plaquetas [DEL PRINCIPE et alii, 1985]. O peróxido de hidrogênio produzido pode ser transformado em um radical muito reativo, o radical hidroxil (OH), através da reação de Fenton que utiliza o íon Fe^{2+} , e a agregação plaquetária pode ser inibida por “scavengers” deste radical [IULIANO et alii, 1994]. Então, a ativação de plaquetas expostas ao peróxido de hidrogênio pode ser mediada por radicais hidroxil formados em uma reação do tipo Fenton [IULIANO et alii, 1994]. A partir deste papel do radical hidroxil, os radicais livres de oxigênio têm sido propostos como sendo “segundo mensageiros” no processo de ativação plaquetária [IULIANO et alii, 1997; LANDER, 1997]. Assim, parece que a fosfolipase A_2 é um componente importante uma vez que inibidores dessa enzima impedem a ativação de plaquetas por radicais livres [IULIANO et alii, 1992]. A estimulação da fosfolipase A_2 também pode ocorrer indiretamente através da ativação do sistema de fosforilação tirosina quinase por radicais livres [CLARK & BRUGGE, 1993]. Os radicais livres também podem afetar a função plaquetária por reagirem com o óxido nítrico (NO), uma molécula vasodilatadora liberada pelo endotélio. O óxido nítrico também é produzido por plaquetas e inibe a agregação quando induz o aumento da concentração de GMP cíclico [MONCADA et alii, 1991]. Esta atividade biológica do óxido nítrico é limitada pela presença do radical superóxido, estes reagem entre si para

formar o ânion peroxinitrito (OONO^-) que é muito reativo [DARLEY-USMAR & HALLIWELL, 1996]. Assim, parece que os radicais livres de oxigênio também induzem a agregação plaquetária por inibirem o efeito do óxido nítrico, além do estímulo sobre o metabolismo do ácido araquidônico e tirosina quinases [IULIANO et alii, 1997].

Estes estudos evidenciam que os radicais livres de oxigênio têm uma contribuição importante na agregação plaquetária *in vivo*, e indicam que este efeito pode ser relevante em eventos trombóticos.

1.6.2 Radicais livres e proteínas

Os radicais livres são especialmente nocivos para as proteínas, afetando particularmente enzimas e proteínas de transporte, que podem por esta via ser oxidadas e inativadas. Em consequência deste efeito dos radicais livres sobre as proteínas, podem ocorrer graves alterações do metabolismo celular [WOLFF et alii, 1986].

A modificação de resíduos de aminoácidos por radicais livres e a consequente alteração da atividade de uma proteína têm sido útil para identificar resíduos essenciais para a função proteica [WOLFF et alii, 1986; VLIET et alii, 1995]. Em geral, a inibição e a inativação são consequências da alteração de enzimas por radicais livres. Entretanto, a ativação de algumas enzimas pode ocorrer pela inativação de um inibidor enzimático [WOLFF et alii, 1986].

Radicais livres como o radical hidroxil e os intermediários da peroxidação lipídica (Ex: radicais alcoxil - RO^\cdot e peroxil - ROO^\cdot) podem fragmentar proteínas de membrana e originar pontes intra e intermoleculares. Na peroxidação lipídica, a agressão de radicais muito reativos, como o hidroxil, sobre as membranas celulares fosfolipídicas origina uma reação em cadeia devida, por um lado, à existência de duplas ligações carbono-

carbono ao nível de ácidos graxos insaturados que facilitam o deslocamento do elétron livre, e por outro lado, pela presença de oxigênio molecular que facilmente forma par através de um de seus elétrons com o elétron livre deslocado potencializando a lesão. Durante a peroxidação, o radical hidroxil capta um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado. Este, com uma súbita reorganização de suas ligações duplas e em presença de oxigênio, forma um radical peroxil (ROO \cdot) que quando atua sobre uma cadeia insaturada vizinha intacta transforma-se em um hidroperóxido ROOH instável, enquanto que outro radical lipídico peroxil que foi novamente formado pode recomeçar um novo ciclo. Os hidroperóxidos ROOH são convertidos, na presença de ferro (Fe $^{2+}$), em radicais alcoxil que podem reiniciar uma nova cadeia de reações. Os hidroperóxidos também se decompõem formando aldeídos, como o malonildialdeído, que podem causar severos danos às proteínas de membrana, inativando enzimas e receptores. Esta reação em cadeia é interrompida quando dois radicais livres interagem, estabilizando-se, ou pelo seu encontro com moléculas antioxidantes denominadas "scavengers" [HALLIWELL & CHIRICO, 1993].

O efeito de radicais livres e da peroxidação lipídica sobre enzimas de membrana é muito estudado. ATPases que participam do transporte de íons são alteradas [MISHRA et alii, 1989; ROHN et alii, 1993] bem como enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares [POELSTRA et alii, 1990]. Nos últimos anos, ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase têm sido descritas como sendo sensíveis aos radicais livres [MISHRA et alii, 1990; SIEGFRIED et alii, 1996; CANDINAS et alii, 1996; VIETTA et alii, 1996]. Estes trabalhos mostram a importância do estudo de efeitos dos radicais livres sobre enzimas que participam da hidrólise extracelular de ATP, ADP e AMP até adenosina.

1.7 Antioxidantes plasmáticos

Um antioxidante é definido como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação deste substrato [HALLIWELL, 1995]. Existem diversas estratégias celulares de defesa, denominadas antioxidantes, que atuam contra processos mediados por espécies reativas de oxigênio, incluindo moléculas captadoras e estabilizadoras de radicais e enzimas como a catalase, a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase [HALLIWELL, 1995].

Os fluidos extracelulares contém quantidades pequenas de enzimas antioxidantes. A maior parte dos antioxidantes extracelulares são proteínas que quelam metais de transição impedindo a sua ação como catalisadores na formação de radicais hidroxil, como a transferrina, a ferritina, a lactoferrina e a ceruloplasmina. Os fluidos extracelulares também contém antioxidantes de peso molecular baixo, como o ácido ascórbico, a vitamina E, os carotenóides, a bilirrubina, o ácido úrico e os tióis (-SH), que estão ativamente envolvidos na defesa contra as espécies reativas de oxigênio [SORIANI et alii, 1994]. Tióis como a glutatona e a cisteína estão presentes no plasma de indivíduos saudáveis em concentrações que variam de 10 a 20 μM [SORIANI et alii, 1994]. Embora a sua concentração no plasma seja menor do que a encontrada intracelularmente, estes tióis extracelulares são muito efetivos como antioxidantes.

A grande maioria dos grupos sulfidril (-SH) no plasma está associada à albumina, uma proteína que, além das funções de regulação da pressão osmótica e de transporte de várias substâncias como ácidos graxos, pigmentos biliares e algumas drogas, tem sido descrita como sendo um antioxidante [HALLIWELL, 1988]. A albumina tem uma vida média de aproximadamente 20 dias, está presente no plasma em

concentrações que variam de 35 a 40 mg/ml (0.58 mM) e tem a capacidade de inibir a formação de radicais livres dependente de íons e atuar como “scavenger” de radicais hidroxil [HALLIWELL, 1988]. Por sua alta concentração no plasma e rápido “turnover”, e por não ter evoluído especificamente como um antioxidante, a albumina é caracterizada como um antioxidante “de sacrifício”, ou seja, é danificada para proteger moléculas mais nobres. Assim, moléculas de albumina são sacrificadas e desta maneira protegem contra a ação dos radicais livres; mas ao mesmo tempo como há uma alta concentração de albumina no plasma, este dano é biologicamente insignificante. A albumina danificada é degradada proteoliticamente e renovada [HALLIWELL, 1988]. Entre as moléculas danosas para a albumina, o ânion peroxinitrito formado a partir da reação do óxido nítrico com o radical superóxido também é capaz de oxidar esta proteína plasmática [GATTI et alii, 1994; VÁSQUEZ-VIVAR et alii, 1996].

Trabalhos recentes indicam que a albumina pode ter influência no processo de agregação plaquetária reduzindo a produção de tromboxano A₂. Estas publicações demonstram que a mortalidade pela doença cardiovascular está relacionada a baixas concentrações de albumina no plasma [PHILLIPS et alii, 1989; KULLER et alii, 1991; PORCELLATI et alii, 1995]. Além disso, a albumina é capaz de proteger o fígado de rato contra a injúria provocada pela isquemia e hipóxia [STRUBELT et alii, 1994]. Sendo assim, a albumina pode ser considerada como um protetor contra o estresse oxidativo [SIES, 1991].

1.8 Hipóteses do trabalho

Há algum tempo, o nosso grupo de pesquisa tem estudado as ecto-enzimas ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase que, agindo em conjunto, levam à produção de adenosina extracelular a partir de ATP ou ADP. O ADP está relacionado com a

agregação plaquetária, assim como os radicais livres, e a adenosina é um potente inibidor deste processo. Assim, tornou-se importante investigar o efeito de radicais livres sobre as atividades da ATP difosfohidrolase e da 5'-nucleotidase expressas em plaquetas de ratos.

A isquemia é descrita como uma doença em que a produção de radicais livres é um dos fatores responsáveis pela intensa injúria celular. Assim, decidimos investigar o efeito periférico da isquemia e reperfusão cerebral sobre a atividade de ecto-enzimas de plaquetas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos até adenosina. Além disso, decidimos investigar a possibilidade da isquemia e reperfusão cerebral induzir um estresse oxidativo periférico. Para este estudo, utilizou-se um modelo de isquemia cerebral global transitória em ratos para relacionar o efeito "in vivo" de uma doença onde há a formação de radicais livres com a atividade de enzimas de plaquetas envolvidas na degradação de ADP e formação de adenosina. Como a isquemia e reperfusão também estimulam a agregação plaquetária e a formação de trombos, a escolha pelo estudo com plaquetas foi importante.

1.9 Objetivos do trabalho

1. Estudar o efeito "in vitro" de radicais livres, através de um sistema gerador, sobre as atividades da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase de plaquetas intactas de ratos adultos.

2. Estudar o efeito "in vitro" de alguns antioxidantes sobre a ação dos radicais livres na atividade das enzimas ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase de plaquetas intactas de ratos adultos.

3. Estudar o efeito de diferentes episódios de isquemia cerebral transitória (2, 10 ou 2 + 10 minutos) e da reperfusão sobre a atividade das enzimas ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase de plaquetas intactas de ratos adultos.

4. Estudar o efeito de diferentes episódios de isquemia cerebral transitória (2, 10 ou 2 + 10 minutos) e da reperfusão sobre a quimioluminescência plasmática de ratos adultos.

5. Estudar o efeito de diferentes episódios de isquemia cerebral transitória (2, 10 ou 2 + 10 minutos) e da reperfusão sobre a concentração de tióis plasmáticos em ratos adultos.

6. Relacionar os efeitos dos episódios simples de isquemia cerebral (2 e 10 minutos) com os efeitos do episódio duplo (pré-condicionamento cerebral - 2 + 10 minutos).

II. CAPÍTULO 1

FREE RADICAL-INDUCED INHIBITION OF ATP DIPHOSPHOHYDROLASE ACTIVITY (EC 3.6.1.5) FROM RAT BLOOD PLATELETS

FREE RADICAL-INDUCED INHIBITION OF ATP DIPHOSPHOHYDROLASE ACTIVITY (EC 3.6.1.5) FROM RAT BLOOD PLATELETS.

Silvana S. Frassetto, Renato D. Dias and João J. F. Sarkis.*

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências - Departamento de Bioquímica
Rua Sarmento Leite, 500 - Porto Alegre - RS - Brasil - 90046-900.
Fax number: 5551-2271343

Received July 8, 1996

Received after revision November 5, 1996

SUMMARY

In the present report we demonstrate the *in vitro* effects of free radicals on an ecto-ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. Rat blood platelets were exposed to an oxidant-generating system ($H_2O_2 / Fe^{2+} /$ ascorbate) and the ATP diphosphohydrolase activity was inhibited. The enzyme inhibition was prevented by glutathione (GSH) and cysteine but not by trolox as a vitamin E analogue. The TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) assay and the determination of sulphhydryl groups indicate that the inhibition of the enzyme activity in resting platelets is not related to lipid peroxidation or to oxidation of sulphhydryl residues. These results demonstrate the susceptibility of ATP diphosphohydrolase activity from platelets to free radicals and suggest that amino acid residues which are essential for the enzyme function are probably modified.

Key words: ATP diphosphohydrolase, apyrase, ATPase-ADPase, platelets, free radicals, oxidative stress.

INTRODUCTION

It has been demonstrated that oxygen radicals are involved in oxygen toxicity and that the hydroxyl radical (HO^\bullet) shows the highest reactivity with all biological components (1). The damaging effect of HO^\bullet on biological systems is mainly associated with its high reactivity with molecules at its site of formation (1). Some investigators have demonstrated that HO^\bullet causes oxidative modification of amino acid residues of proteins and that crosslinking and fragmentation of the proteins result in loss of function (2,3). Thus, the modification of amino acid residues by HO^\bullet with subsequent changes in enzyme activity have been used to identify essential residues for protein function. (4).

Earlier reports from our laboratory have shown that rat platelets contain a membrane ecto-enzyme denominated ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) that hydrolyzes ATP and ADP to AMP (5,6). The possible physiological role for this enzyme is to participate in an "enzyme chain" together with a 5'-nucleotidase for the complete hydrolysis of ATP to adenosine in the bloodstream.

* To whom the correspondence should be addressed.

We have suggested that the nucleotide degradation in the bloodstream may play an important role in the regulation of vascular tone and platelet aggregation since ATP and ADP are vasoactive and platelet active nucleotides, respectively (7,8).

The present results show the *in vitro* effect of oxidative damage via the Fenton-like reaction on the ATP diphosphohydrolase activity from rat blood platelets. Free radical species have been reported to stimulate both the adhesive and aggregatory responses of platelets, and free radical scavengers are therefore important regulators of platelet function (9). Since we have proposed that ATP diphosphohydrolase from rat blood platelets regulates the nucleotide concentration in the bloodstream, our hypothesis is that the nucleotide metabolism including ADP degradation by ATP diphosphohydrolase may be affected by free radicals, leading to facilitation of cardiac or cerebral microthrombus formation and its dangerous consequences.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Nucleotides, cysteine, reduced glutathione, superoxide dismutase and catalase were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Vitamin E (trolox) was obtained from Tanvimil, Laboratorios Ramos, Buenos Aires, Argentina. Hydrogen peroxide was obtained from Perhidrol, Merck, Darmstadt, Germany. All other reagents were analytical grade.

Platelet isolation.

Male Wistar rats from our breeding stock were maintained on a 12h light/12-h dark cycle in a constant temperature room. Resting platelets were isolated as described by Hantgan (10). The intact platelets were separated from plasma by gel filtration on a 1,5 x 7 cm Sepharose 2B column. The column was equilibrated with a buffer consisting of 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 5.5 mM dextrose, 0.2 mM EGTA and 0.05 g% azide, pH 6.8 (Ca²⁺-free Tyrode's buffer). Platelets were eluted with the same buffer at room temperature, 0.5 ml fractions were collected and the tubes containing platelets (determined visually) were used for subsequent experiments. The material was prepared fresh daily.

Incubation and enzyme assay.

In order to test the effects of free radicals, the platelet preparation was incubated for 30 min. in the presence of an oxidant-generating system (0.5 mM H₂O₂, 0.02 mM FeCl₂ and 5 mM ascorbate) at 37°C (2,11,12). At the end of 30 min. incubation, 50 U/ml superoxide dismutase and catalase were added before the ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) activity assay. Superoxide dismutase and catalase alone did not alter the ATP diphosphohydrolase activity. For the enzyme activity assay, ATP and ADP hydrolysis by the platelet preparation was carried out in a medium containing 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, as previously described by us (5). The enzyme reaction was started by the addition of ATP or ADP to a final concentration of 0.5 mM. Incubation time (60 min.) and protein concentration (0.10 - 0.15 mg/ml) were chosen in order to ensure the linearity of the enzyme reaction. The reaction was stopped by the addition of trichloroacetic acid to a final concentration of 5% (w/v). All assays were run in duplicate with appropriate controls. Released Pi was measured by the method of Chan et al (13). Values for ATPase and ADPase specific activities of ATP diphosphohydrolase, that corresponds to 100%, were 10.5 ± 1.2 (mean ± SD, n=6) and 6.2 ± 0.9 (mean ± SD, n=6) nmol phosphate (Pi) released / min / mg protein, respectively.

Determination of lipid peroxidation.

Lipid peroxidation was determined when the platelet preparation was assayed for TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) formation (14). For TBARS determination the test material was heated at acid pH with TBA (thiobarbituric acid) and the resulting chromogen extracted into

butanol was measured by absorbance at 532 nm. TBARS formation was expressed as nmol TBARS / mg protein.

Determination of platelet sulphhydryl groups.

Sulphhydryl groups were determined by the method of Ellman (15) and are expressed as nmol SH groups / mg protein.

Determination of protein.

Protein was determined by the Coomassie Blue method (16) with bovine serum albumin used as standard.

Statistical analysis.

Data were analyzed statistically by the paired *t*-test or by one-way analysis of variance. *P* values less than 0.05 were considered to be significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Inhibition of ATPase and ADPase activities of ATP diphosphohydrolase.

The effects of the oxidant-generating system (H_2O_2 / FeCl_2 / ascorbate) on ATPase and ADPase activities of ATP diphosphohydrolase from platelets were studied. The results in Fig. 1 show that in the presence of H_2O_2 , Fe^{2+} and ascorbate there was a time-dependent inhibition of ATP and ADP hydrolysis with a maximum decrease of the activity at 30 min. of incubation. H_2O_2 or Fe^{2+} or ascorbate alone did not affect ATP or ADP hydrolysis by ATP diphosphohydrolase (results not shown). To demonstrate the effect of incubation time of the oxidant-generating system we compared the 30 min time point (maximum inhibition) to the 5, 15, 60 and 90 min time points. ADP hydrolysis at 30 min was significantly lower ($P < 0.05$) when compared to the results obtained at 5 min. and 15 min. ATP hydrolysis at 30 min was significantly lower ($P < 0.05$) when compared to the result at 5 min. On the other hand, the results at 60 min and 90 min for ATP and ADP hydrolysis were not significantly different when compared to the result at 30 min. It is important to note that the overall profile of these results showed a similar conduct of ATPase and ADPase activities of ATP diphosphohydrolase.

Thus, because ATP diphosphohydrolase activity from platelets was inhibited by the oxidant-generating system, we investigated the possibility that the lipid peroxidation could be responsible for protein damage or inhibition of the enzyme activity. Recently, we demonstrated that lipid peroxidation leads to the inhibition of ATPase-ADPase activities of ATP diphosphohydrolase from rat synaptic plasma membrane (12).

Lipid peroxidation.

Lipid peroxidation is the most extensively studied biologically relevant free radical chain reaction (17). In order to determine whether ATP diphosphohydrolase inhibition was due to lipid peroxidation, TBARS formation was measured in resting and activated platelets. It is known that the activation of rat platelets increases the exposure of polyunsaturated fatty acid-enriched phospholipids,

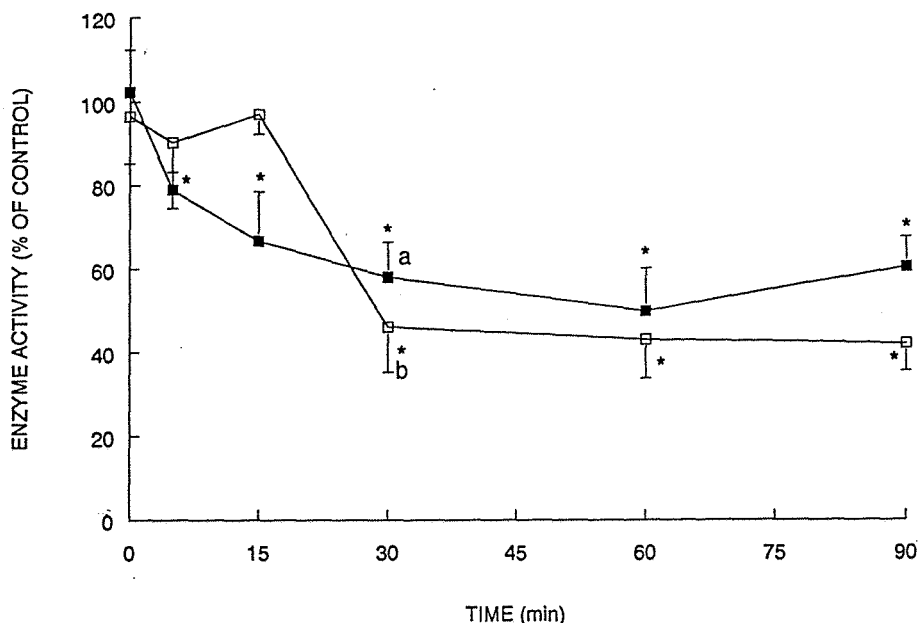


Figure 1. Time-course of the inhibitory effect of the oxidant-generating system (0.5 mM H₂O₂ / 0.02 mM FeCl₂ / 5 mM ascorbate) on ATP (■) and ADP (□) hydrolysis. Data represent mean ± SD percentage of the control enzyme activity for five different platelet preparations. * P < 0.05 compared to control group without the oxidant generating system (zero group). ^a P < 0.05 compared to 0 and 5 min. ^b P < 0.05 compared to 0, 5 and 15 min.

that are readily attacked by free radicals, on the external leaflet of the plasma membrane (18). Thus, the bulk of polyunsaturated species in rat platelets is present in the inner half of the resting biomembrane (18). The TBA test, which is one of the assays most commonly used for the lipid peroxidation process (17), shows that the incubation of resting platelets with the oxidant-generating system (0.5 mM H₂O₂ / 0.02 mM Fe²⁺ / 5 mM ascorbate) for 30 min. did not increase the amount of TBARS (0.097 ± 0.023 nmoles TBARS / mg prot., mean ± SD, n = 4) when compared to the control (0.098 ± 0.013 nmoles TBARS / mg prot., mean ± SD, n = 4). On the other hand, when platelets were activated with 2.5 mM CaCl₂, 0.05 U/ml thrombin and 1.25 μM Ca²⁺-ionophore A23187 (18,19), incubation with the oxidant-generating system for 30 min increased (P < 0.05) TBARS formation (0.151 ± 0.025 nmoles TBARS / mg prot., mean ± SD, n = 4) above control levels.

These data indicate that H₂O₂, Fe²⁺ and ascorbate did not induce lipid peroxidation in resting platelets and suggest that ATP diphosphohydrolase activity is not inhibited by the lipid peroxidation process. Furthermore, a vitamin E analogue (trolox), as an antioxidant that is effective in protecting against membrane lipid peroxidation, did not prevent the inhibition of the ecto-ATP diphosphohydrolase activity from resting platelets by the oxidative damage (results not shown). Considering that the lipid peroxidation process may occur in activated platelets, probably the ATP diphosphohydrolase activity is also affected by this free radical chain reaction when platelets are activated in the circulation.

Effect of glutathione (GSH) and cysteine on the inhibition of ATP diphosphohydrolase.

Reduced low-molecular-weight thiols such as glutathione and cysteine are present in plasma and are involved in the defense against the oxidant injury by free radicals (20). To investigate the possible protective effect of thiols on the inhibition of ATP diphosphohydrolase activity by the oxidant-generating system (OGS) we tested reduced glutathione and cysteine. As can be seen in Figs. 2 and 3, glutathione and cysteine, when incubated before the oxidant-generating system, have the ability to completely protect the ATP diphosphohydrolase enzyme against inhibition. Furthermore, glutathione (0.1 mM) and cysteine (0.1 mM), when added after 30 min incubation with the oxidant-generating system, return the ADPase activity of ATP diphosphohydrolase to approximate control values (results not shown). These data show that thiols act as antioxidant protectors.

It has been reported that sulphhydryl groups are critical for the activity of many enzymes and are common targets for free radicals, with sulphhydryl oxidation being a mechanism of free radical-mediated toxicity at the molecular level (21). Thus, the sulphhydryl content of platelets was measured to test this hypothesis.

Effect of the oxidant generating system, glutathione and cysteine on sulphhydryl content of platelets.

Figure 4 shows that -SH groups were found to be significantly decreased ($P < 0.05$) in platelets after 30 min incubation with the oxidant-generating system (OGS) when compared to

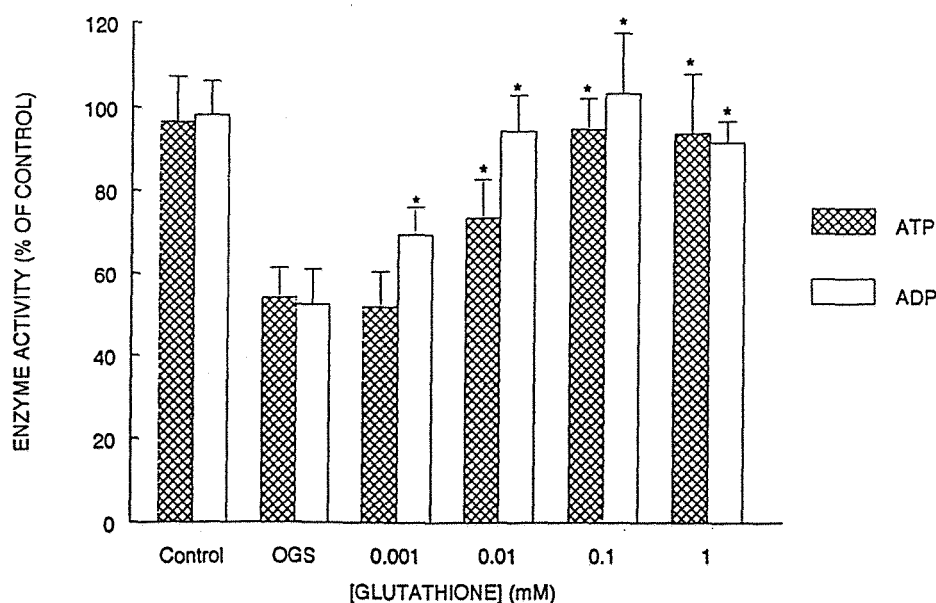


Figure 2. Effect of varying concentrations of reduced glutathione on ATP and ADP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H_2O_2 / 0.02 mM $FeCl_2$ / 5 mM ascorbate). Platelet preparations were incubated for 30 min with the oxidant generating system. Results are expressed as mean \pm SD percentage of the control enzyme activity for four different platelet preparations. * $P < 0.05$ compared to the oxidant-generating system group (OGS) without glutathione.

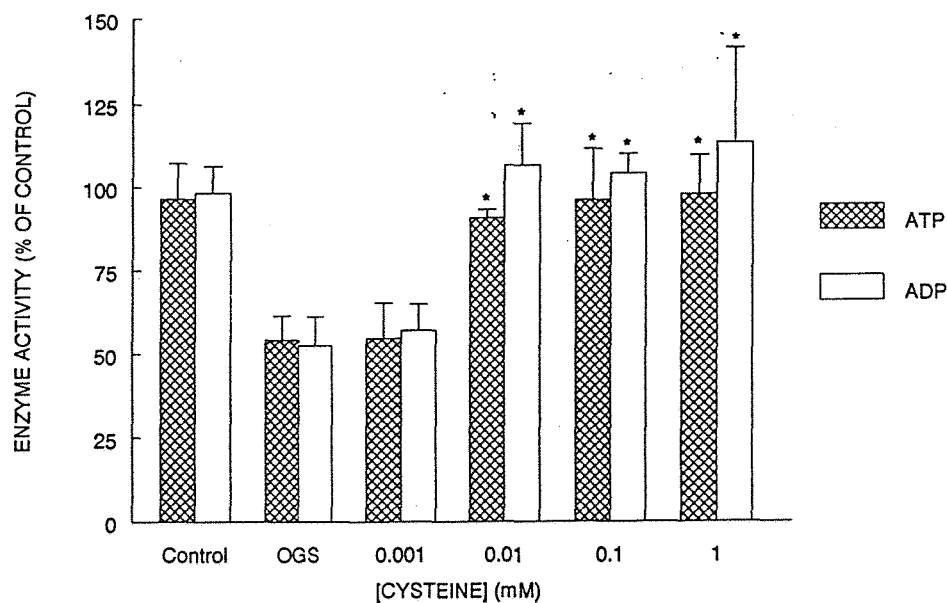


Figure 3. Effect of varying concentrations of cysteine on ATP and ADP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H_2O_2 / 0.02 mM $FeCl_2$ / 5 mM ascorbate). Platelet preparations were incubated for 30 min with the oxidant-generating system. Results are expressed as mean \pm SD percentage of the control enzyme activity for four different platelet preparations. * $P < 0.05$ compared to the oxidant-generating system group (OGS) without cysteine.

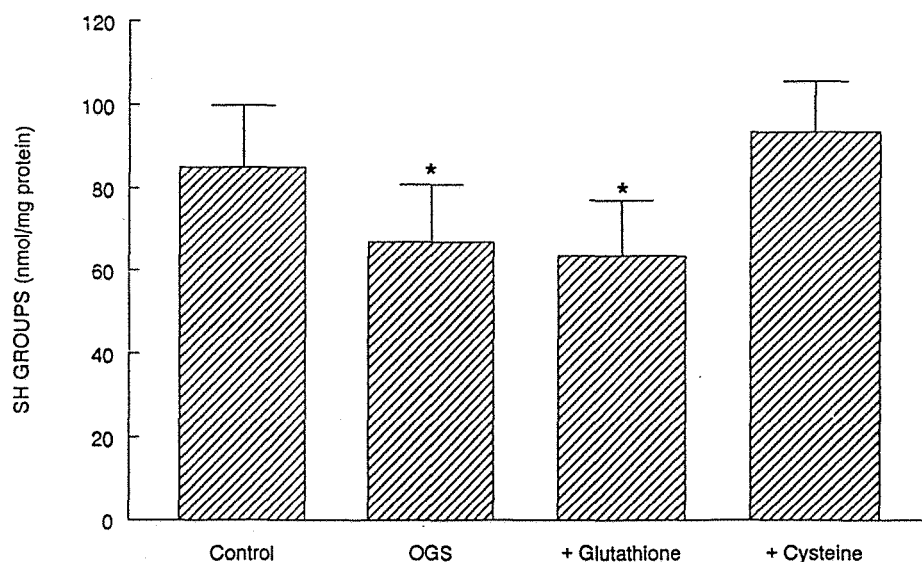


Figure 4. Effect of 0.1 mM glutathione or 0.1 mM cysteine on platelet SH groups in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H_2O_2 / 0.02 mM $FeCl_2$ / 5 mM ascorbate). Platelet preparations were incubated for 30 min with the oxidant-generating system. Results are expressed as mean \pm SD -SH groups for five different platelet preparations. * $P < 0.05$ compared to control group without the oxidant-generating system.

platelets without the oxidative damage. Furthermore, reduced glutathione (0.1 mM) and cysteine (0.1 mM) were tested to examine their protective ability toward free radical-induced alteration of platelet sulphhydryl content. Platelets were incubated with glutathione or cysteine and the oxidant-generating system was added. As can be seen in Fig. 4, glutathione did not prevent the decrease of platelet sulphhydryl content but cysteine completely protected platelet sulphhydryl groups against this alteration.

These data suggest that glutathione may protect ATP diphosphohydrolase activity against inhibition (Fig. 2) by acting as a scavenger (9) of free radicals. Cysteine protected against the oxidation of platelet sulphhydryls but, probably, protected ATP diphosphohydrolase activity from platelets against inhibition (Fig. 3) also as a scavenger (9). Because glutathione does not protect sulphhydryls against oxidation and protects the enzyme activity, we suggest that sulphhydryl residues are not involved in the enzyme activity and its oxidation is not responsible for the enzyme inhibition. Thus, the results may indicate that ATP diphosphohydrolase activity from platelets is inhibited by free radicals and plasma thiols, such as reduced glutathione and cysteine, protect the enzyme activity against the oxidative damage. Since the inhibition of the membrane ecto-enzyme activity from platelets that occurs during the oxidative damage is not related to lipid peroxidation or to oxidation of sulphhydryl residues, it is probable that other amino acid residues which are essential for ATP diphosphohydrolase function are modified (22-24).

The results reported here indicate that free radicals may inhibit ATPase and ADPase activities of ATP diphosphohydrolase from rat blood platelets. We have suggested that, depending on the tissue, this enzymatic activity is responsible for different physiological functions such as control of platelet aggregation which might contribute to the antithrombogenicity of the vessel wall (by the regulation of ADP available in the bloodstream) (5,6) or control of neurotransmitter (ATP) catabolism in the nervous system (25-27). In light of the findings presented here, it is probable that oxygen free radicals reduce ATP diphosphohydrolase activity from platelets, leading to facilitation of cardiac or cerebral microthrombus formation. Poelstra et al (28) have suggested a relationship between oxygen free radical production, reduction of a rat glomerular ADPase activity and increased platelet aggregation. Finally, considering that ADP is a nucleotide known to induce platelet aggregation (8) and that ATP diphosphohydrolase is important in ADP degradation, a change in the enzyme activity may represent a factor contributing to vascular damage in pathologic free radical mechanisms such as cardiac or cerebral ischemia-reperfusion and other adverse conditions (29-31).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil). S. S. F. was the recipient of a fellowship from CAPES-Brazil.

REFERENCES

1. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1992) *FEBS Lett.* 307, 108-112.
2. Huang, W., Wang, Y., and Askari, A. (1992) *Int. J. Biochem.* 24, 621-626.
3. Franzini, E., Sellak, H., Hakim, J., and Pasquier, C. (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* 1203, 11-17.
4. Wolff, S. P., Garner, A., and Dean, R. T. (1986) *TIBS* 11, 27-31.

5. Frassetto, S. S., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. F. (1993) *Mol. Cell. Biochem.* 129, 47-55.
6. Frassetto, S. S., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. F. (1995) *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 35, 499-506.
7. Burnstock, G. (1990) *Annals of the New York Academy of Sciences* 603, 31-45.
8. Colman, R. W. (1990) *FASEB J.* 4, 1425-1435.
9. Salvemini, D., and Botting, R. (1993) *Trends in Pharmacol. Sci.* 14, 36-42.
10. Hantgan, R. R. (1984) *Blood* 64, 896-906.
11. Huang, W., Wang, Y., Askari, A., Zolotarjova, N., and Ganjeizadeh, M. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 108-114.
12. Vietta, M., Frassetto, S. S., Battastini, A. M. O., Belló Klein, A., Moreira, C., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. F. (1996) *Neurochem. Res.* 21, 299-304.
13. Chan, K. M., Delfert, D., and Junger, K. D. (1986) *Anal. Biochem.* 157, 375-378.
14. Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978) *Meth. Enzymol.* 52, 302-309.
15. Ellman, G. L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
16. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
17. Halliwell, B., and Chirico, S. (1993) *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715S-725S.
18. Joo, F., Chevy, F., Colard, O., and Wolf, C. (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* 1149, 231-240.
19. Schroit, A. J., and Zwaai, R. F. A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1071, 313-329.
20. Soriani, M., Pietraforte, D., and Minetti, M. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 180-188.
21. Armstrong, D. A., and Buchanan, J. D. (1978) *Photochem. Photobiol.* 28, 743-755.
22. Valenzuela, M. A., Del Campo, G., Marin, M., and Traverso-Cori, A. (1973) *Biochem. J.* 133, 755-763.
23. Pieber, M., Valenzuela, M. A., Kettlun, A. M., Mancilla, M., Aranda, E., Collados, L., and Traverso-Cori, A. (1991) *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 281-285.
24. Kettlun, A. M., Alvarez, A., Quintar, R., Valenzuela, M. A., Collados, L., Aranda, E., Banda, A., Chayet, L., Chiong, M., Mancilla, M., and Traverso-Cori, A. (1994) *Int. J. Biochem.* 26, 437-448.
25. Battastini, A. M. O., Rocha, J. B. T., Barcellos, C. K., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. F. (1991) *Neurochem. Res.* 16, 1303-1310.
26. Muller, J., Rocha, J. B. T., Battastini, A. M. O., Sarkis, J. J. F., and Dias, R. D. (1993) *Neurochem. Int.* 23, 471-477.
27. Battastini, A. M. O., Oliveira, E. M., Moreira, C. M., Bonan, C. D., Sarkis, J. J. F., and Dias, R. D. (1995) *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 37, 209-219.
28. Poelstra, K., Hardonk, M. J., Koudstaal, J., and Bakker, W. W. (1990) *Kidney Int.* 37, 1500-1508.
29. Southorn, P. A., and Powis, G. (1988) *Mayo Clin. Proc.* 63, 390-408.
30. Aalto, T. K., and Raivio, K. O. (1993) *Am. J. Physiol.* 264, C282-C286.
31. Halliwell, B. (1993) *Haemostasis* 23, 118-126.

III. CAPÍTULO 2

FREE RADICALS ALTER 5'-NUCLEOTIDASE ACTIVITY (EC 3.1.3.5)

FROM RAT BLOOD PLATELETS

(submetido ao Medical Science Research)

FREE RADICALS ALTER 5'-NUCLEOTIDASE ACTIVITY (EC 3.1.3.5) FROM
RAT BLOOD PLATELETS.

SILVANA S. FRASSETTO, RENATO D. DIAS AND JOÃO J. F. SARKIS *.

From the Department of Biochemistry, Basic Health Sciences Institute, Federal
University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 (anexo), Cep: 90035-003,
Porto Alegre, RS, Brasil.

* To whom correspondence should be addressed. Fax: +55 51-3165535

E-mail: JJSarkis@plug-in.com.br

Key words: ecto-5'-nucleotidase, inhibition, blood, platelets, free radicals, oxidant-
generating system, oxidative stress, adenosine, platelet aggregation, glutathione,
cysteine.

ABSTRACT

The *in vitro* effects of free radicals on an ecto-5'-nucleotidase activity (EC 3.1.3.5) from rat blood platelets were investigated. Treatment of rat platelets with an oxidant-generating system (H_2O_2 and Fe^{2+}) resulted in inhibition of AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase. The enzymatic inhibition was prevented by catalase, glutathione (GSH) and cysteine but not by trolox as a vitamin E analogue. These results may indicate that reduced low-molecular-weight thiols from plasma are important for the natural defense against the oxidant injury produced by free radicals in the enzyme. Furthermore, since trolox did not protect AMP hydrolysis activity against inhibition, we suggest that this effect is not related to lipid peroxidation. In the present report we demonstrate the susceptibility of 5'-nucleotidase activity from rat platelets to free radicals. On the basis of the present findings, it is probable that oxygen reactive species in the circulation inhibit 5'-nucleotidase activity leading to a decrease in adenosine generation in the platelet microenvironment. Since adenosine mediates its physiological actions such as vasodilation and inhibition of platelet aggregation by activating its receptors, we are tempted to speculate whether the inhibition of 5'-nucleotidase activity from platelets by free radicals may lead to a decrease in adenosine generation and thus to vascular injuries.

INTRODUCTION

The generation of oxygen free radicals in excess amounts has been implicated as a causative factor in the pathogenesis of various vascular diseases, since these species play an important role in inducing platelet aggregation *in vivo* favoring thrombotic events (1,2). It has been described that among oxygen reactive species, the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) shows the highest reactivity with all biological systems (3).

ATP and ADP are known to be vasoactive and platelet active nucleotides (4,5), respectively, whereas adenosine is described as a vasodilator (6) and inhibitor of platelet aggregation (7). Studies from our laboratory have shown the *in vitro* inhibitory effect of hydroxyl radicals produced via the Fenton-like reaction on ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets which hydrolyzes ATP and ADP to AMP (8). We have suggested that the physiological role for this enzyme is to participate, together with a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), in a membrane-associated "enzymatic chain" for the complete hydrolysis of ATP and ADP to adenosine in the circulation (8). Thus, ATP diphosphohydrolase activity hydrolyzes ATP and ADP to AMP and 5'-nucleotidase hydrolyzes AMP to adenosine. Considering that ADP causes platelet aggregation when binding to $\text{P}_{2\text{T}}$ purinoceptors (9) and that ATP diphosphohydrolase is important for ADP degradation and, possibly, for adenosine generation, we have suggested that the inhibition of this enzymatic activity may represent a factor contributing to vascular injury in pathologic free radical mechanisms (8).

It is clear that cardioprotection from the effects of oxidative stress in ischemic preconditioning can be achieved with increased production of adenosine by 5'-nucleotidase (10). The nucleoside mediates protection from injurious effects by activation of its receptors (11). Besides its beneficial effects as a vasodilator (6) and

inhibitor of microthrombus formation (7), adenosine is an anti-inflammatory agent (12) and activates antioxidant enzymes (13).

The present report shows that the AMP hydrolysis activity of 5'-nucleotidase from rat blood platelets is inhibited by oxidative damage via the Fenton-like reaction. Our hypothesis is that 5'-nucleotidase from platelets, like ATP diphosphohydrolase (8), i. e., the final step of the "enzymatic chain" proposed by us, may also be affected by vascular oxidative stress leading to microthrombus formation in ischemic events. Since both 5'-nucleotidase and adenosine receptors are located on the same cell surface membrane, alteration in the enzyme activity and production of adenosine in the platelet microenvironment may represent vascular damage.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Nucleotide, reduced glutathione, cysteine, superoxide dismutase and catalase were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Vitamin E (trolox) was obtained from Tanvimil, Buenos Aires, Argentina. Hydrogen peroxide was obtained from Perhidrol, Merck, Darmstadt, Germany. All other reagents were of analytical grade.

Platelet isolation. Male Wistar rats from our breeding stock were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle in a constant temperature room. Platelets were isolated as described by Hantgan (14). Intact platelets were separated from plasma by gel filtration on a 1.5 x 7 cm Sepharose 2B column. The column was equilibrated with a buffer consisting of 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 5.5 mM dextrose, 0.2 mM EGTA and 0.05 g% azide, pH 6.8. Platelets were eluted with the same buffer at room temperature; fractions were collected and the tubes containing platelets (determined visually) were used for subsequent experiments. The material was prepared fresh daily.

Incubation and 5'-nucleotidase activity assay. Platelet preparations were incubated for 30 min in the presence of an oxidant-generating system (0.5 mM H₂O₂ and 0.02 mM FeCl₂) at 37° C (15,16). For the 5'-nucleotidase activity assay, AMP hydrolysis by the platelet preparation was carried out in a medium containing 134 mM NaCl, 5.0 mM glucose, 1.5 MgCl₂, 15 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, as described by Nishio et al (17). The enzyme reaction was started by the addition of AMP to a final concentration of 2 mM. Incubation time (120 min) and protein concentration (0.10 - 0.15 mg/ml) were chosen in order to ensure the linearity of the enzyme reaction. The reaction was stopped by the addition of trichloroacetic acid to a final concentration of 5% (w/v). All assays were run in duplicate with appropriate controls. Released Pi was measured by the method of Chan et al (18).

Protein determination. Protein was determined by the Coomassie Blue method (19) with bovine serum albumin used as standard.

Statistical analysis. Data were analyzed by the paired t-test or by one-way analysis of variance. P values less than 0.05 were considered to be significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Value of control AMPase specific activity of 5'-nucleotidase, that corresponds to 100%, was 2.1 ± 0.4 (mean \pm SD, n=7) nmol phosphate (Pi) released / min / mg protein. The results in Fig. 1 show that in the presence of H₂O₂ and Fe²⁺ (an oxidant-generating system - OGS) there was a significant inhibition (P<0.05) of AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase after 30 min of incubation when compared to zero (control), 5 and 15 min time points. H₂O₂ or Fe²⁺ alone did not affect AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase (results not shown). As shown in Fig. 2, catalase (50 U/ml) has the ability to completely protect 5'-nucleotidase against inhibition. On the other hand, superoxide dismutase (50 U/ml) did not protect AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase against inhibition. These data

suggest that probably the inhibition of AMP hydrolysis is dependent on H_2O_2 which reacts with Fe^{2+} to form hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) by the Fenton reaction.

Reduced low-molecular-weight thiols such as glutathione and cysteine are present in plasma at concentrations ranging from 10 to 20 μM . Although the concentration of these thiols in plasma is several times lower than that found intracellularly, the extracellular thiols are involved in the defense against the oxidant injury by free radicals (20). Thus, we investigated the possible protective effect of reduced glutathione and cysteine on the inhibition of 5'-nucleotidase activity from platelets by the oxidant-generating system (OGS). As can be seen in Figs. 3 and 4, glutathione and cysteine, when added after 30 min incubation with the oxidant-generating system, cause 5'-nucleotidase activity to return to control values. Cysteine at 10 and 100 μM concentrations (Fig. 4), did not increase 5'-nucleotidase activity to approximate control values. The results suggest that glutathione and cysteine in the circulation may act as protectors against the oxidant damage to the 5'-nucleotidase from platelets. On the other hand, trolox, which is a water-soluble vitamin E analogue (21), does not protect AMP hydrolysis activity against inhibition by the oxidant-generating system (results not shown). Since the antioxidant action of vitamin E or its analogue is expected to be effective in protecting against membrane lipid peroxidation (22), probably the inhibition of 5'-nucleotidase activity in resting platelets is not related to membrane lipid-derived radicals. Recently, we have demonstrated that the incubation of resting platelets with an oxidant-generating system did not increase lipid peroxidation when compared to control but inhibited an ATP diphosphohydrolase activity. In contrast, when platelets were activated, incubation with an oxidant-generating system increased lipid peroxidation above control levels (8). We have also reported that ATPase-ADPase

activities of ATP diphosphohydrolase from synaptic plasma membranes of rat forebrain are inhibited by lipid peroxidation and that trolox protects against this effect (16).

It has been described that sulphhydryl oxidation is a mechanism of free radical-mediated toxicity at the molecular level. Furthermore, reduced sulphhydryl groups are important for the activity of many enzymes (23). We have shown that platelet sulphhydryl groups were decreased after incubation with an oxidant-generating system when compared to platelets without the oxidative damage (8). Glutathione did not prevent the decrease of platelet sulphhydryl content but cysteine protected against this alteration. Because we have demonstrated that glutathione does not protect platelet sulphhydryls against oxidation (8) and here we are showing that glutathione protects 5'-nucleotidase activity (Fig. 3), we suggest that sulphhydryl residues are not involved in the enzyme activity and the oxidation is not responsible for the enzyme inhibition. These results indicate that glutathione and cysteine may protect 5'-nucleotidase activity against inhibition by acting as a scavenger (24) of free radicals. Thus, we suggest that other amino acids that are essential for 5'-nucleotidase activity are modified by the oxidant-generating system, since the enzyme inhibition is probably not related to oxidation of sulphhydryl residues.

The present results imply that free radicals in the circulation may inhibit AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase activity from rat blood platelets. The dephosphorylation of extracellular AMP by an ecto-5'-nucleotidase produces adenosine. Actually, we have proposed that this nucleoside is produced during metabolic activity by the action of an "enzymatic chain" that hydrolyzes first ATP or ADP to AMP and then AMP to adenosine. Thus, ATP diphosphohydrolases (EC 3.6.1.5) would be responsible for the hydrolysis of ATP and ADP to AMP (25-28). Considering the present findings, it is probable that

oxygen free radicals in the circulation inhibit 5'-nucleotidase activity leading to a decrease in adenosine generation in the platelet microenvironment.

Adenosine mediates its physiological actions by activating its receptors. Functions mediated via these receptors such as vasodilation (6) and inhibition of platelet aggregation (7) may account for the beneficial effect of adenosine in the bloodstream. In view of our results, we are tempted to speculate that the inhibition of 5'-nucleotidase (shown in this paper) and ATP diphosphohydrolase (8) from platelets, and probably of adenosine generation, by oxygen free radicals may lead to facilitation of cardiac or cerebral microthrombus formation. Since ischemia-reperfusion and other adverse conditions have been reported to be pathologic free radical mechanisms (1,29), inhibition of 5'-nucleotidase activity from platelets in these events may lead to a decrease in adenosine levels and consequent vascular injury.

REFERENCES

1. Halliwell, B. 1993. *Haemostasis* **23**, 118-126.
2. Iuliano, L.; Colavita, A.R.; Leo, R.; Praticò, D. and Violi, F. 1997. *Free Rad. Biol. Med.* **22**, 999-1006
3. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1992. *FEBS Lett.* **307**, 108-112
4. Burnstock, G. 1990. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **603**, 31-45
5. Colman, R.W. 1990. *FASEB J.* **4**, 1425-1435
6. Engler, R.L. 1991. *Circulation* **84**, 951-954
7. Kitakaze, M.; Hori, M.; Sato, H.; Takashima, S.; Inoue, M.; Kitabatake, A. and Kamada, T. 1991. *Circ. Res.* **69**, 1402-1408
8. Frassetto, S.S.; Dias, R.D. and Sarkis, J.J.F. 1997. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **41**, 161-168

9. Gachet, C.; Hechler, B.; Léon, C.; Vial, C.; Ohlmann, P. and Cazenave, J.-P. 1996. *Platelets* **7**, 261-267
10. Kitakaze, M.; Minamino, T.; Node, K.; Komamura, K. and Hori, M. 1996. *Basic Res. Cardiol.* **91**, 23-26
11. Ely, S.W. and Berne, R.M. 1992. *Circulation* **85**, 893-904
12. Cronstein, B.N. 1994. *J. Appl. Physiol.* **76**, 5-13
13. Ramkumar, V.; Nie, Z.; Rybak, L.P. and Maggirwar, S.B. 1995. *TIPS* **16**, 283-285
14. Hantgan, R.R. 1984. *Blood* **64**, 896-906
15. Huang, W.; Wang, Y.; Askari, A.; Zolotarjova, N. and Ganjeizadeh, M. 1994. *Biochim. Biophys. Acta.* **1190**, 108-114
16. Vietta, M.; Frassetto, S.S.; Battastini, A.M.O.; Belló Klein, A.; Moreira, C.; Dias, R.D. and Sarkis, J.J.F. 1996. *Neurochem. Res.* **21**, 299-304
17. Nishio, H.; Takeshita, K.; Okugawa, K. and Segawa, T. 1987. *Japan. J. Pharmacol.* **43**, 230-233
18. Chan, K.M.; Delfert, D. and Junger, K.D. 1986. *Anal. Biochem.* **157**, 375-378
19. Bradford, M.M. 1976. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
20. Soriani, M.; Pietraforte, D. and Minetti, M. 1994. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 180-188
21. Miura, T.; Muraoka, S. and Ogiso, T. 1993. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **31**, 125-133
22. Ross, D. and Moldeus, P. 1991. *Membrane lipid oxidation*. pp. 151-170. Boca Raton, Florida.
23. Wolff, S.P.; Garner, A. and Dean, R.T. 1986. *TIBS* **11**, 27-31
24. Salvemini, D. and Botting, R. 1993. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 36-42
25. Battastini, A.M.O.; Rocha, J.B.T.; Barcellos, C.K.; Dias, R.D. and Sarkis, J.J.F. 1991. *Neurochem. Res.* **16**, 1303-1310

26. Frassetto, S.S.; Dias, R.D. and Sarkis, J.J.F. 1993. *Mol. Cell. Biochem.* **129**, 47-55
27. Pilla, C.; Emanuelli, T.; Frassetto, S.S.; Battastini, A.M.O.; Dias, R.D. and Sarkis, J.J.F. 1996. *Platelets* **7**, 225-230
28. Oliveira, E.M.; Battastini, A.M.O.; Meirelles, M.N.L.; Moreira, C.M.; Dias, R.D. and Sarkis, J.J.F. 1997. *Mol. Cell. Biochem.* **170**, 115-123
29. Shivakumar, B.R.; Kolluri, S.V.R. and Ravindranath, V. 1995. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274**, 1167-1173.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil). S.S.F. was the recipient of a fellowship from CAPES-Brazil.

Reprint requests to: Dr. João J. F. Sarkis
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Rua Ramiro Barcelos, 2600 (anexo)
Cep: 90035-003 - Porto Alegre - RS - BRASIL

Figure legends:

Figure 1. Time-course of the inhibitory effect of the oxidant-generating system (0.5 mM H₂O₂ and 0.02 mM FeCl₂) on AMP (●) hydrolysis. Data represent mean ± SD percentage of the control enzyme activity for four different platelet preparations. * P < 0.05 compared to the control group without the oxidant-generating system (zero group), 5 and 15 min.

Figure 2. Effect of 50 U/ml superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) on AMP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H₂O₂ and 0.02 mM FeCl₂). Platelet preparations were incubated for 30 min with the oxidant generating system. Results are expressed as mean ± SD percentage of the control enzyme activity for four different platelet preparations. * P < 0.05 compared to the oxidant-generating system group (OGS) without superoxide dismutase and catalase.

Figure 3. Effect of varying concentrations of reduced glutathione on AMP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H₂O₂ and 0.02 mM FeCl₂). Platelet preparations were incubated for 30 min with the oxidant-generating system. Results are expressed as mean ± SD percentage of the control enzyme activity for five different platelet preparations. * P < 0.05 compared to the oxidant-generating system group (OGS) without glutathione.

Figure 4. Effect of varying concentrations of cysteine on AMP hydrolysis in the presence of the oxidant-generating system (OGS = 0.5 mM H₂O₂ and 0.02 mM FeCl₂). Platelet preparations were incubated for 30 min with the oxidant-generating system.

Results are expressed as mean \pm SD percentage of the control enzyme activity for five different platelet preparations. * $P < 0.05$ compared to the oxidant-generating system group (OGS) without cysteine.

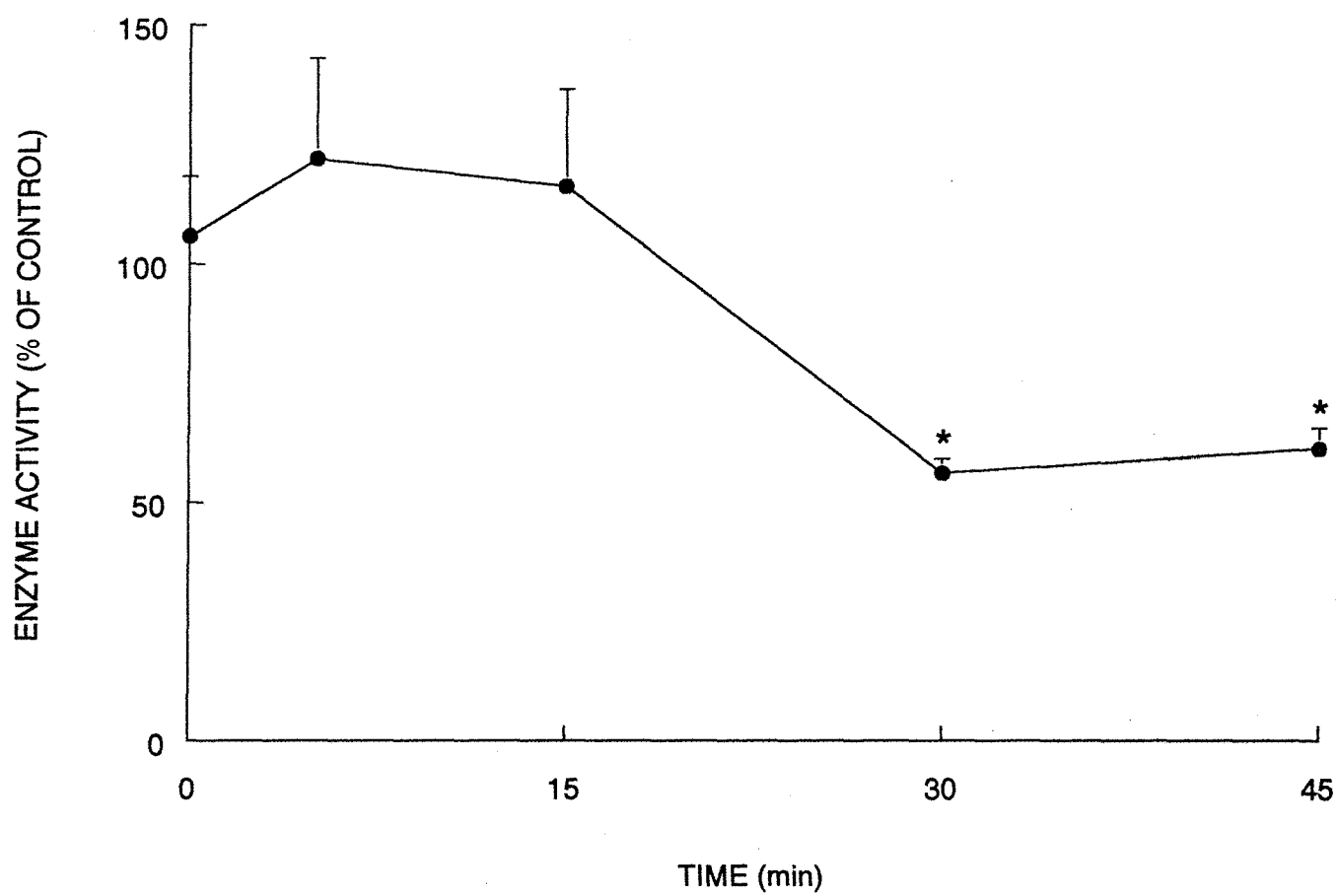


Figure 1 (Figura III.1.)

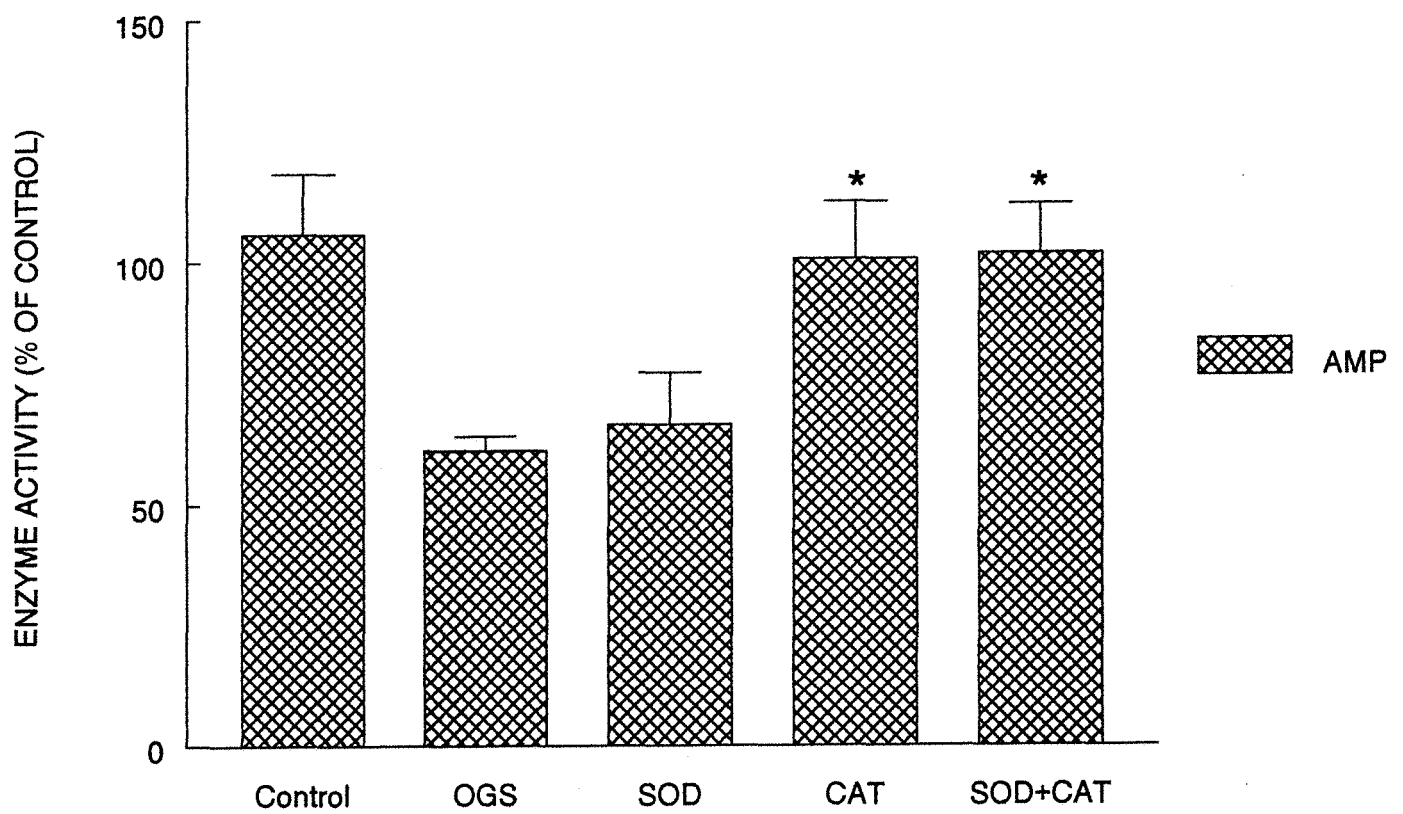


Figure 2 (Figura III.2.)

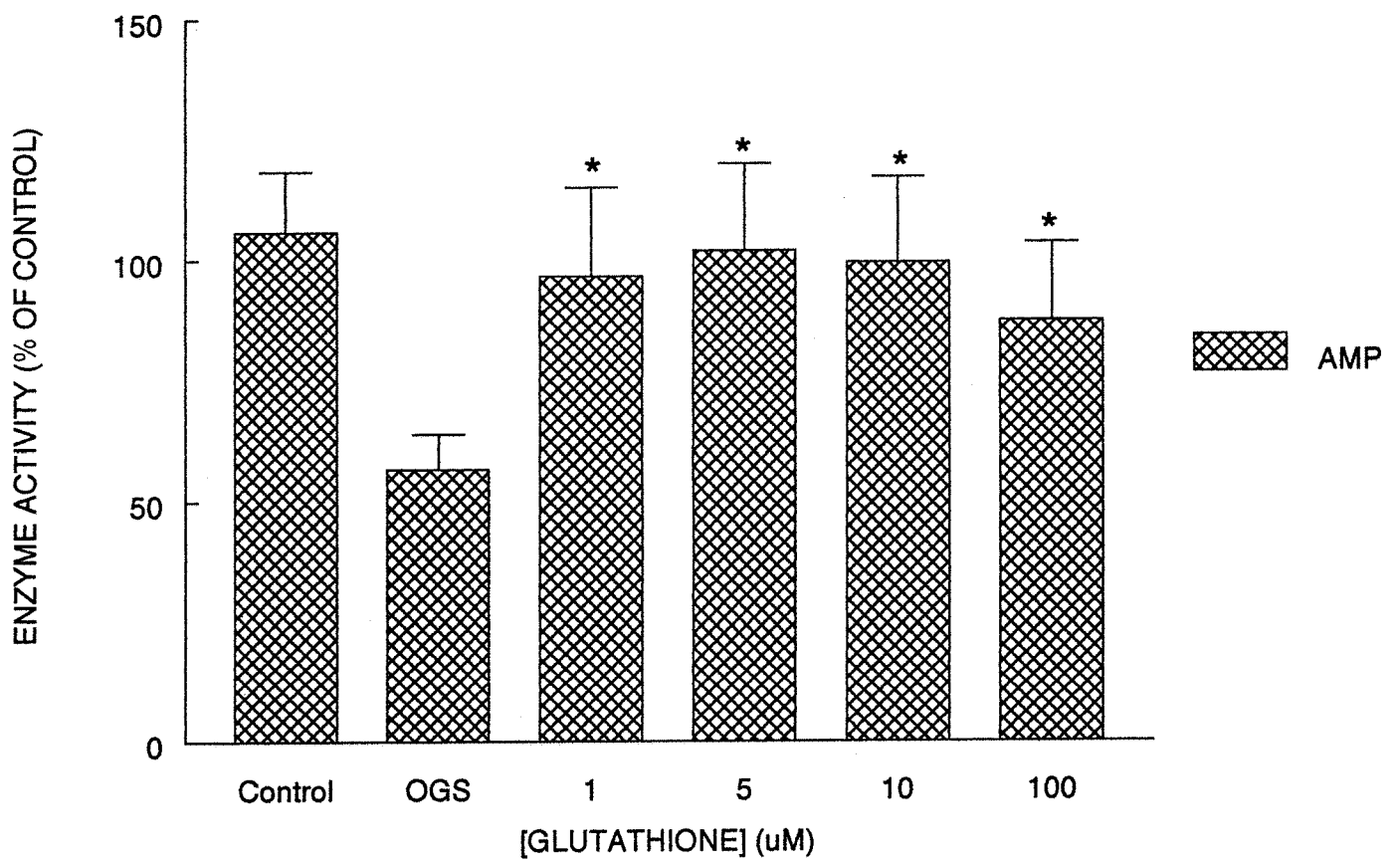


Figure 3 (Figura III.3.)

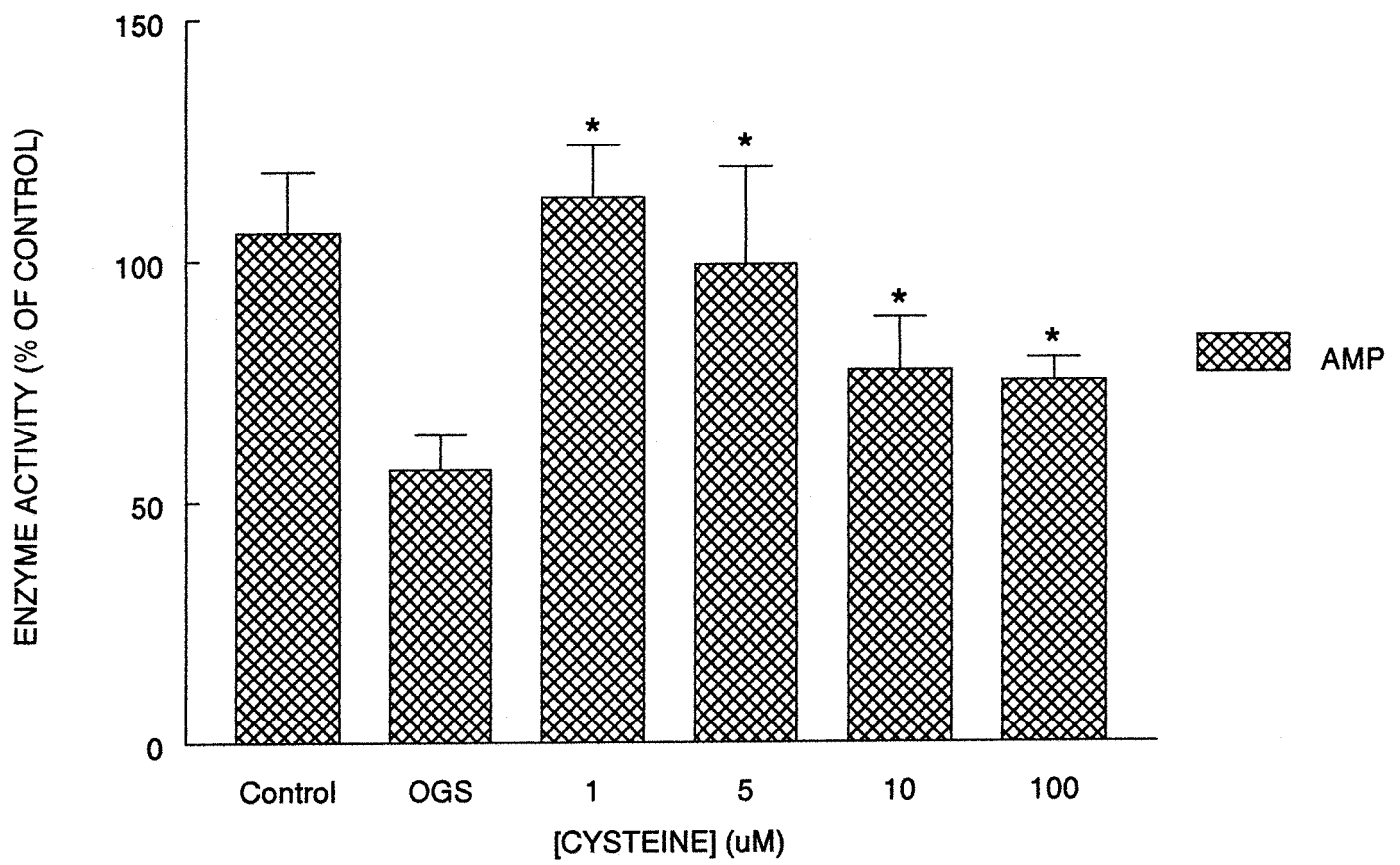


Figure 4 (Figura III.4.)

IV. CAPÍTULO 3

**BRAIN ISCHEMIA AND REPERFUSION ALTER PLATELET ATP
DIPHOSPHOHYDROLASE AND 5'-NUCLEOTIDASE ACTIVITIES IN NAIVE AND
PRECONDITIONED RATS
(submetido à FEBS Letters)**

BRAIN ISCHEMIA AND REPERFUSION ALTER PLATELET ATP
DIPHOSPHOHYDROLASE AND 5'-NUCLEOTIDASE ACTIVITIES IN NAIVE AND
PRECONDITIONED RATS.

SILVANA S. FRASSETTO ^a , MARIA ROSA C. SCHETINGER ^b , REJANE
SCHIERHOLT ^a , ANALUPE WEBBER ^a , CARLA D. BONAN ^a , ÂNGELA T. WYSE ^a ,
RENATO D. DIAS ^a , CARLOS ALEXANDRE NETTO ^a , AND JOÃO J. F. SARKIS ^{a, c} .

a. From the Department of Biochemistry, Basic Health Sciences Institute, Federal
University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 (anexo), Cep: 90035-003,
Porto Alegre, RS, Brasil.

b. From the Biochemistry Sector, Department of Chemistry, Natural and Exact
Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

c. To whom correspondence should be addressed. Fax: +55 51-3165535

Running title: Brain ischemia alters ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase from rat
platelets.

ABSTRACT

The effects of transient forebrain ischemia, reperfusion and ischemic preconditioning on rat blood platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities were evaluated. Adult Wistar rats were submitted to 2 or 10 min of single ischemic episodes, or to 10 min of ischemia 1 day after a 2 min ischemic episode (ischemic preconditioning) by the four-vessel occlusion method. Naive rats were reperfused for 60 min, 1, 2, 5, 10 and 30 days after ischemia; preconditioned rats were reperfused for 60 min, 1 and 2 days after the long ischemic episode. Brain ischemia (2 or 10 min) inhibited ATP and ADP hydrolysis by platelet ATP diphosphohydrolase. On the other hand, AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase was increased after 2 min of ischemia, whereas the long (10 min) ischemic event had no effect. Ischemic preconditioning caused activation of both enzymes. The effects of reperfusion were distinct for each experimental group. Enzyme activities returned to control levels in the 2 min group. However, the decrease in ATP diphosphohydrolase activity was maintained up to 30 days of reperfusion after 10 min ischemia. Sixty min and 1 day of reperfusion after 10 min ischemia inhibited 5'-nucleotidase activity when compared to ischemia without reperfusion. In contrast, enzymatic activity was activated after 10 min ischemia followed by 2 and 5 days of reperfusion, but returned to control levels after 10 and 30 days. Ischemic preconditioning cancelled the effects of 10 min ischemia and reperfusion on the enzymatic activities. These results indicate that brain ischemia, reperfusion and ischemic preconditioning induce peripheral effects on ecto-enzymes from rat platelets involved in nucleotide metabolism. Thus, ATP, ADP and AMP degradation and probably the generation of adenosine in the circulation may be altered, leading to regulation of

microthrombus formation since ADP aggregates platelets and adenosine is an inhibitor of platelet aggregation.

Index Terms: Modulation of ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase; rat platelets, brain ischemia and reperfusion; ischemic preconditioning; platelet aggregation.

INTRODUCTION

Studies on the biological role of ATP, ADP, AMP and adenosine in extracellular metabolism suggest that these compounds control different and often opposite metabolic processes. Therefore, the presence of enzymes that regulate their concentration is of biological importance. Ecto-ATP diphosphohydrolases (apyrases, EC 3.6.1.5) catalyze the hydrolysis of both di- and triphosphate nucleotides. In the case of ATP and ADP hydrolysis, the reaction products are AMP and inorganic phosphate (22). Ecto-5'-nucleotidases (EC 3.1.3.5) hydrolyze AMP to adenosine. The ubiquity and distribution of ATP diphosphohydrolases and 5'-nucleotidases suggest that these enzymes may play an important role in the regulation of nucleotides and adenosine levels (18,24).

Platelets express ecto-ATP diphosphohydrolase (9,11) and ecto-5'-nucleotidase (3) activities. In previous reports, our group has also described the presence of ATP diphosphohydrolases in human blood platelets (30), synaptosomes (2,35), rat brain synaptic plasma membranes (1) and sarcolemmal fraction (28). As regards the vascular system, we have suggested that the possible physiological role for ATP diphosphohydrolase is the participation in an "enzymatic chain" together with a 5'-nucleotidase for the complete hydrolysis of ATP to adenosine. Nucleotides and nucleosides may play a role in the regulation of vascular tone and platelet aggregation since ATP and ADP are vasoactive and platelet-active nucleotides (5,7), respectively, and adenosine is a vasodilator (8) and an inhibitor of platelet aggregation (16). Thus, we have proposed that ATP diphosphohydrolase may inhibit platelet aggregation when ADP is hydrolyzed and may control vascular tone and microthrombus formation working in combination with a 5'-nucleotidase to produce adenosine.

Platelet aggregability and haemostasis have been the subject of investigation in ischemic events. Studies have shown that patients with ischemic cerebrovascular disease

present vascular platelet activation and microthrombus formation (14,39). It is also known that brain ischemia causes cell death of vulnerable neurons (37), but such injury is markedly limited when an ischemic preconditioning phenomenon is induced. Several studies have suggested that protection against neuronal injury after preconditioning occurs because a brief episode of ischemia (that causes no cell death) induces tolerance to longer ischemic episodes (15). The mechanisms underlying the ischemic preconditioning phenomenon have been extensively investigated (17,20).

Since it has been postulated that the injury-limiting effect of preconditioning can be primarily attributable to adenosine (20), it is possible to speculate that enzymes involved in the production of adenosine in the nervous system and in the circulation should participate or even modulate such phenomenon. Along this line of reasoning, Schetinger et al (36) have demonstrated the activity of synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the hippocampus of rats tolerant to brain ischemia.

In the present study, we examined the hypothesis that brain ischemia may alter nucleotide peripheral metabolism. We investigated the effect of brain ischemia, reperfusion and ischemic preconditioning on ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities of rat platelets because of their role in the degradation of extracellular nucleotides and the production of adenosine. Our hypothesis is that ischemic preconditioning, known to cause cellular protection, would change these enzymatic activities leading to a possible increase in ADP degradation and adenosine formation, and the consequent regulation of microthrombus formation and vascular tissue oxygen supply.

MATERIALS AND METHODS

Materials.

Nucleotides were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sepharose 2B was obtained from Pharmacia and was de-aerated in a vacuum flask

before packing in a polyethylene column. All other reagents were of analytical grade. Polyethylene or siliconized labware was used for all platelet isolation and incubation procedures.

Brain ischemia and reperfusion.

We produced ischemia in Wistar rats weighing 180-200 g by the four-vessel occlusion method of Pulsinelli (4-VO) (31,36). Briefly, the vertebral arteries were electrocoagulated through the alar foramina on the first cervical vertebra, under halothane anesthesia, and silastic ties were inserted around the carotids and brought to the surface. Twenty-four h later the ties were tightly clamped for 2 or 10 min. Thus, rats were submitted to 2 or 10 min ischemia and to different periods (60 min, 1, 2, 5, 10 and 30 days) of reperfusion. The ischemic preconditioned group (double-ischemic rats) was submitted to 10 min ischemia 1 day after a 2 min ischemic episode (2' + 10'), followed by 60 min, 1 and 2 days of reperfusion. Any rat that did not lose the righting reflex or that convulsed during the ischemic or reperfusion period was discarded. Sham-operated and intact rats were used as controls. All animal use procedures were approved by the local Animal Care Committee.

Platelet isolation.

Male Wistar rats from our breeding stock were maintained on a 12h light/12h dark cycle in a constant temperature room. Platelets were isolated as described by Hantgan (13). The intact platelets were separated from plasma by gel filtration on a 1.5 x 7 cm Sepharose 2B column. The column was equilibrated with a buffer consisting of 140 mM NaCl, 2.5mM KCl, 10 mM HEPES, 5.5 mM dextrose, 0.2 mM EGTA, and 0.05 g% azide, pH 6.8. Platelets were eluted with the same buffer at room temperature, 0.5 ml fractions were collected and the tubes containing platelets (determined visually) were used for the experiments. The material was prepared fresh daily.

Determination of ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities.

ATP and ADP hydrolysis by platelet ATP diphosphohydrolase was carried out in a medium containing 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 6.0 mM glucose, 5.0 mM CaCl₂, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, as previously described by us (9). The enzyme reaction was started by the addition of ATP or ADP to a final concentration of 0.5 mM. Platelet 5'-nucleotidase activity was assayed as described by Nishio et al (25). AMP hydrolysis was carried out in a medium containing 134 mM NaCl, 5.0 mM glucose, 1.5 mM MgCl₂ and 15 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The enzyme reaction was started by the addition of AMP to a final concentration of 2.0 mM. Incubation times (60 min for ATP diphosphohydrolase and 120 min for 5'-nucleotidase) and protein concentration (0.1 - 0.15 mg/ml) were chosen in order to ensure the linearity of the enzyme reactions. The reactions were stopped by the addition of trichloroacetic acid to a final concentration of 5% (w/v). Controls with the enzyme preparation after the addition of trichloroacetic acid were used to correct for nonenzymatic hydrolysis of the substrate. All assays were run in duplicate with appropriate controls. Released Pi was measured by the method of Chan et al (6). A unit of activity (U) is expressed as 1.0 nmol Pi released/min at 37°C. Specific activities are defined as U/mg protein (nmol Pi released/min/mg protein).

Protein determination.

Protein was determined by the Coomassie Blue Method (4) with bovine serum albumin used as standard.

Statistical analysis.

Data were analyzed by one-way and two-way analysis of variance. Post hoc tests included the Duncan procedure for multiple intergroup comparisons. *P* values less than 0.05 were considered to be significant.

RESULTS

Effect of single and double episodes of brain ischemia without reperfusion on platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities.

Control ATPase and ADPase specific activities of ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase (AMPase) activity, that correspond to 100%, were 11.2 ± 2.0 (mean \pm S.D, n=8), 5.9 ± 1.0 (mean \pm S.D, n=8) and 1.8 ± 0.3 (mean \pm S.D, n=8) nmol phosphate (Pi) released/min/mg protein, respectively. ATP and ADP hydrolysis by ATP diphosphohydrolase activity was significantly decreased by 40-50% after 2 or 10 min of ischemia when compared to sham and control groups (Fig. 1). On the other hand, AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase activity was significantly increased by 30% after 2 min of ischemia when compared to the corresponding sham and control groups, but was similar to control levels after 10 min of ischemia (Fig. 1).

We next examined the effect of ischemia on the enzyme activities in preconditioned rats. These rats were submitted to a brief ischemic episode (2 min) inflicted 1 day before 10 min of ischemia, i. e., they were made tolerant to neuronal death caused by the longer ischemic insult. As shown in Fig. 1, there was a 40-50% increase in ATP and ADP hydrolysis in the double-ischemic group (2'+10') when compared to sham and control groups and to the group submitted to 2 min of ischemia followed by 1 day of reperfusion, in contrast with groups submitted to 2 or 10 min of ischemia alone. Interestingly, there was a marked activation of about 100% of AMP hydrolysis after the double-ischemic episode.

Considering that brain ischemia alters ATP, ADP and AMP hydrolysis by platelets, these results suggest that changes in ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities must be associated with molecular events that follow ischemia. The fact that the double-ischemic group showed activation of both enzyme activities suggests that induced tolerance to brain ischemia by the preconditioning phenomenon may be related to

enzymatic modulation for the inhibition of microthrombus formation in the peripheral circulation.

Effect of reperfusion after single episodes of brain ischemia on platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities.

In order to evaluate the effects of reperfusion after brain ischemia on the enzyme activities, we measured ATP, ADP and AMP hydrolysis in two situations, i. e., when rats were submitted to different periods of reperfusion after 2 min (Fig. 2) or 10 min (Fig. 3) ischemia. As shown in Fig. 2, 60 min of reperfusion after the 2 min ischemic episode was sufficient to bring ATP, ADP and AMP hydrolysis to control levels. However, ATP and ADP hydrolysis was significantly decreased by the 10 min ischemic episode even after 30 days of reperfusion (Fig. 3). ATP hydrolysis was still significantly lower after 30 days of reperfusion when compared to 10 min of ischemia without reperfusion (Fig. 3).

In relation to the effect of reperfusion after 10 min of ischemia on 5'-nucleotidase activity, 60 min and 1 day of reperfusion resulted in a decrease of AMP hydrolysis by 50% and 70%, respectively, when compared to control or 10 min of ischemia without reperfusion (Fig. 3). In contrast, in the 2 and 5 days reperfusion groups AMP hydrolysis was significantly higher (by 30% and 60%, respectively) than control or 10 min ischemia without reperfusion. Interestingly, ischemic animals submitted to 10 and 30 days reperfusion showed no changes in AMP hydrolysis when compared to control and non-reperfused rats (Fig. 3).

Results from reperfused animals indicate that there is an interaction between platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities and brain reperfusion. Considering that platelet turnover time is approximately 7 days, the sustained inhibition of ATP diphosphohydrolase activity by 10 min ischemia followed by 10 and 30 days reperfusion suggests that this effect could be related to the inhibition of enzyme synthesis

in the megakaryocyte. However, this hypothesis cannot be considered to explain the results of 5'-nucleotidase activity.

Effect of reperfusion after preconditioning to brain ischemia on platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities.

For the last set of experiments, we asked the question of what would be the peripheral effects of reperfusion after a brief ischemic episode (2 min) inflicted 1 day before a longer period of ischemia (10 min), i. e., ischemic preconditioning. As shown in Fig. 4, the double-ischemic episode (2'+ 10') resulted in a marked increase of ATP, ADP and AMP hydrolysis by platelets when compared to the respective controls and to the group submitted to only 2 min of ischemia followed by 1 day of reperfusion. In the 60 min reperfusion condition after the double-ischemic episode, ATP, ADP and AMP hydrolysis was significantly lower than in the respective controls and the double-ischemic groups. Interestingly, 1 and 2 days of reperfusion after the double-ischemic episode cancelled this inhibitory effect. After 1 day of reperfusion ATP hydrolysis was higher when compared to control and the double-ischemic group and after 2 days of reperfusion it was similar to control levels. In relation to ADP and AMP hydrolysis, 1 and 2 days reperfusion after the double-ischemic episode returned these activities to control levels (Fig. 4).

Considering the results of reperfusion after the double-ischemic episode (ischemic preconditioning) (Fig. 4), and remembering that 10 min of ischemia followed by 30 days of reperfusion still caused a marked inhibition of ATP diphosphohydrolase activity (Fig. 3), we suggest that protective mechanisms induced by preconditioning might be associated with the return of enzymatic activity to control levels after 2 days of reperfusion. In relation to 5'-nucleotidase activity, AMP hydrolysis immediately returned to control levels when rats were submitted to 1 day reperfusion after the ischemic preconditioning (Fig. 4) while 10 min ischemia alone followed by 1, 2 and 5 days reperfusion (Fig. 3) still resulted in changes of enzyme activity. Since ADP aggregates platelets (7) and adenosine is an

inhibitor of platelet aggregation and microthrombus formation (16), and may protect against these processes after ischemic cerebrovascular disease, and considering that platelet 5'-nucleotidase and ATP diphosphohydrolase activities may cause alterations in adenosine, ADP and ATP levels in the circulation, we suggest that such enzymes are possible mediators of peripheral effects of preconditioning to brain ischemia.

DISCUSSION

The main results of the present study were: (i) brain ischemia (2 or 10 min) inhibited ATP diphosphohydrolase activity from rat blood platelets (Fig. 1), whereas, 5'-nucleotidase was activated after 2 min of ischemia and this effect did not occur after a 10 min-ischemic episode (Fig. 1). In contrast, the double-ischemic episode (2' + 10') increased both enzyme activities (Fig. 1); (ii) enzymatic activities differed when rats were submitted to reperfusion after ischemia. Reperfusion after 2 min of ischemia caused a return of activities to control levels (Fig. 2). However, the inhibition of ATP diphosphohydrolase activity following 10 min of ischemia was still present after 30 days of reperfusion (Fig. 3). 5'-Nucleotidase activity was changed by reperfusion after 10 min of ischemia when compared to ischemia without reperfusion (Fig. 3); and (iii) the ischemic preconditioned group (2'+10') showed recovery of both enzymatic activities after 2 days of reperfusion, in contrast to altered activity after 10 min of ischemia followed by up to 30 days of reperfusion (Fig. 4). To our knowledge, this is the first demonstration of a peripheral effect of brain ischemia, reperfusion and ischemic preconditioning involving platelet ecto-enzymes related to adenosine formation.

The level of extracellular adenosine available to activate adenosine receptors increases during ischemia, and this is believed to confer cytoprotection (32). Functions mediated via these receptors such as vasodilation (29), inhibition of Ca^{2+} influx in cells populating the ischemic area (33), inhibition of the release of neurotransmitters such as

glutamate (33) and inhibition of platelet aggregation (16) may account for the beneficial effect of adenosine. The nucleoside also affords protection against ischemic reperfusion injuries associated with significant increases in reactive oxygen species (41).

Considering our results as a whole, the activation of 5'-nucleotidase activity after 2 min of ischemia (Fig. 1), after the ischemic preconditioning (2' + 10') (Fig. 1) and after 10 min of ischemia followed by 2 and 5 days reperfusion (Fig. 3) may correspond to a protective mechanism that leads to an increase of adenosine levels in the platelet microenvironment. Interestingly, in these situations, except for the ischemic preconditioning group, ATP and ADP hydrolysis by ATP diphosphohydrolase was decreased. These results may indicate that when ATP diphosphohydrolase is inhibited, ADP is present at sufficient concentrations to induce some platelet aggregation even when adenosine is produced. Probably, the preconditioning phenomenon may control this process when both ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities are increased (Fig. 1). Regarding the effect of 10 min of ischemia without reperfusion and followed by 10 or 30 days reperfusion (Fig. 3), AMP hydrolysis did not change when compared to controls, suggesting that it also occurs to maintain adenosine levels. These results are in agreement with studies that have shown platelet aggregability and *in vivo* platelet deposition in the circulation of patients with ischemic cerebrovascular disease (14).

Preconditioning involves brief periods of ischemia that confer protection against a prolonged ischemic challenge. It is known that 10 min of transient forebrain ischemia causes massive cell death in the CA₁ subfield of the rat hippocampus, while 2 min of ischemia causes no lesion. However, double-ischemia (preconditioning) results in 50-60% protection against cell necrosis (36,37). Whereas these studies have clearly demonstrated the effects of preconditioning in the nervous system, the mechanisms underlying such effects have not yet been established.

Ytrehus and co-workers (41) have demonstrated that adenosine receptors are involved in the beneficial effects of preconditioning. Our observation that platelet 5'-nucleotidase was highly activated after the ischemic preconditioning (2' + 10') (Fig. 4) suggests that adenosine was possibly formed to bind to its receptors and to protect against possible injuries. Interestingly, ATP and ADP hydrolysis by ATP diphosphohydrolase was activated after the ischemic preconditioning (Fig. 4). These data suggest that during brain ischemic preconditioning, platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase are probably modulated to inhibit platelet aggregation and microthrombus formation when ADP is hydrolyzed and adenosine is generated. Furthermore, data from animals reperfused after ischemic preconditioning (Fig. 4) indicate an interaction between enzyme activities and the protective effect of brain preconditioning against a longer period of ischemia (10 min) and reperfusion. As shown in Fig. 4, ATP diphosphohydrolase activity was not inhibited after the ischemic preconditioning followed by 1 or 2 days of reperfusion as it was after 10 min of ischemia followed by 1 or 2 days of reperfusion (Fig. 3). In the preconditioned group (2'+10') submitted to 1 or 2 days of reperfusion, 5'-nucleotidase activity did not change when compared to controls (Fig. 4). Thus, alterations of these enzyme activities when brain ischemia and reperfusion occur were prevented by the preconditioning phenomenon.

The findings that brain ischemia, reperfusion and preconditioning can induce peripheral alterations in ecto-enzymes involved in nucleotide metabolism, as is the case for the nervous system (36), are the most important point of our results. We are tempted to speculate that: (i) mechanisms operating in the modulation of ATP diphosphohydrolase activity in the ischemic hippocampus (36) might be the same as that operating in platelets; (ii) the peripheral (platelet) effect may be a marker of central (hippocampal) events. On the other hand, we must consider the possibility that the enzymatic chain (ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase) might be altered with ischemia of other organs.

In view of such clear effects, possible explanations may be offered regarding the peripheral modulation of these enzymatic activities from platelets induced by brain ischemia, reperfusion and ischemic preconditioning. Two possibilities seem to be the strongest. The first is a change in the characteristics of the active site, or in the conformation or synthesis of the enzyme in the megakaryocyte; and the second involves environmental changes caused by degradation of membrane phospholipids surrounding the enzyme molecules, generating free radical species. Neuronal damage following transient brain ischemia is mediated by various mechanisms among which oxygen radical-mediated processes play a central role; much of this damage is mediated by the hydroxyl radical (12). Recent studies have also suggested the production of nitric oxide (NO) within ischemic cerebral tissue (21). Thus, NO is generated within the ischemic brain and may diffuse into the intravascular space (19) to act as an inhibitor of platelet aggregation (23). However, other free radical species stimulate the aggregatory response of platelets (34). Recently, we have demonstrated *in vitro* that free radicals cause an inhibition of ATP diphosphohydrolase activity from rat platelets (10) and synaptic plasma membrane (40). Furthermore, nitrosylation or phosphorylation through an interaction with NO were recently reported to affect the activity of membrane-bound proteins (27,38). Node et al (26) have shown the activation of ecto-5'-nucleotidase by phosphorylation and its role in ischemic tolerance in the canine heart. Considering our results, the relevance of these suggestions must be examined in future experiments.

In summary, we have shown that brain ischemia and reperfusion induce alterations in ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities from rat blood platelets. The present findings support the hypothesis that the protection of ischemic preconditioning is probably mediated by enhanced hydrolysis of ATP, ADP and AMP and production of adenosine through the activation of these ecto-enzymes. Since both enzymatic activities studied and adenosine receptors are located on the platelet

membrane, adenosine possibly produced may act in the same environment. In any case, we believe that a modulation of these enzymes and, consequently, an alteration of platelet ATP, ADP and AMP hydrolysis as a peripheral effect of brain ischemia, reperfusion and preconditioning may be related to the regulation of microthrombus formation and vascular tissue oxygen supply.

Acknowledgments.

This work was supported in part by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil). S. S. F. was the recipient of a fellowship from CAPES-Brazil.

REFERENCES

1. Battastini, A. M. O., E. M. Oliveira, C. M. Moreira, C. D. Bonan, J. J. F. Sarkis, and R. D. Dias. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 37: 209-219, 1995.
2. Battastini, A. M. O., J. B. T. Rocha, C. K. Barcellos, R. D. Dias and J. J. F. Sarkis. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16: 1303-1310, 1991.
3. Bergamini, C., and E. Grazi. Human platelets 5'-nucleotidase: a cell membrane ectoenzyme with a possible regulatory role in the aggregation reaction. *Ital. J. Biochem.* 29: 273-288, 1980.
4. Bradford, M. M. 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, 1976.
5. Burnstock, G. Dual control of local blood flow by purines. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 603: 31-45, 1990.
6. Chan, K. M., D. Delfert, and K. D. Junger. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157: 375-378, 1986.
7. Colman, R. W. Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation. *FASEB J.* 4: 1425-1435, 1990.
8. Engler, R. L. Adenosine. The signal of life? *Circulation* 84: 951-954, 1991.
9. Frassetto, S. S., R. D. Dias, and J. J. F. Sarkis. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol. Cell. Biochem.* 129: 47-55, 1993.

10. Frassetto, S. S., R. D. Dias, and J. J. F. Sarkis. Free radical-induced inhibition of ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 41: 161-168, 1997.
11. Frassetto, S. S., R. D. Dias, and J. J. F. Sarkis. Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP and ADP of the ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 35: 499-506, 1995.
12. Globus, M. Y. T., R. Busto, B. Lin, H. Schnippering, and M. D. Ginsberg. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intransischemic brain temperature modulation. *J. Neurochem.* 65: 1250-1256, 1995.
13. Hantgan, R. R. A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change. *Blood* 64: 896-906, 1984.
14. Isaka, Y., K. Kimura, A. Uehara, K. Hashikawa, M. Mieno, M. Matsumoto, N. Handa, S. Nakabayashi, M. Imaizumi, and T. Kamada. Platelet aggregability and in vivo platelet deposition in patients with ischemic cerebrovascular disease. Evaluation by indium-111-platelet scintigraphy. *Thromb. Res.* 56: 739, 1989.
15. Kirino, T., Y. Tsujita, and A. Tamura. Induced tolerance to ischemia in gebril hippocampal neurons. *J. Cereb. Flow Metab.* 11: 299-307, 1991.
16. Kitakaze, M., M. Hori, H. Sato, S. Takashima, M. Inoue, A. Kitabatake, and T. Kamada. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. *Circ. Res.* 69: 1402-1408, 1991.
17. Kitakaze, M., T. Minamino, K. Node, K. Komamura, and M. Hori. Activation of ecto-5'-nucleotidase and cardioprotection by ischemic preconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 91: 23-26, 1996.
18. Komoszynski, M. A. Apyrases-enzymes involved in the control of nucleotides level in cells and tissues. *Adv. Biochem.* 40: 174-180, 1994.

19. Kumura, E., H. Kosaka, T. Shiga, T. Yoshimine, and T. Hayakawa. Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 487-491, 1994.
20. Losano, G., D. Gattullo, and P. Pagliaro. Myocardial, neural and vascular aspects of ischemic preconditioning. *Life Sci.* 59: 1185-1192, 1996.
21. Malinski, T., F. Bailey, Z. G. Zhang, and M. Chopp. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13: 355-358, 1993.
22. Meyerhof, O. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.* 157: 105-109, 1945.
23. Moncada, S., and A. Higgs. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 9: 1319-1330, 1995.
24. Najjar, S. M., D. Acilli, N. Philippe, J. Jernberg, R. Margolis, and S. I. Taylor. pp120/ecto-ATPase, an endogenous substrate of an insulin receptor tyrosine kinase, is expressed as two variably spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* 268: 1201-1206, 1993.
25. Nishio, H., K. Takeshita, K. Okugawa, and T. Segawa. Effect of concanavalin A on 5'-nucleotidase activity of rabbit blood platelets. *Japan. J. Pharmacol.* 43: 230-233, 1987.
26. Node, K., M. Kitakaze, T. Minamino, M. Tada, M. Inoue, M. Hori, and T. Kamada. Activation of ecto-5'-nucleotidase by protein kinase C and its role in ischaemic tolerance in the canine heart. *Brit. J. Pharmacol.* 120: 273-281, 1997.
27. Nolte, C., M. Eigenthaler, P. Schanzenbacher, and U. Walter. Endothelial cell-dependent phosphorylation of a platelet protein mediated by cAMP- and cGMP-elevating factors. *J. Biol. Chem.* 266: 14808-14812, 1991.
28. Oliveira, E. M., A. M. O. Battastini, M. N. L. Meirelles, C. M. Moreira, R. D. Dias, and J. J. F. Sarkis. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC

- 3.6.1.5) in sarcolemmal membrane from rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 170: 115-123, 1997.
29. Phillis, J. W. Adenosine in control of cerebral circulation. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1: 26-54, 1989.
30. Pilla, C., T. Emanuelli, S. S. Frassetto, A. M. O. Battastini, R. D. Dias, and J. J. F. Sarkis. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7: 225-230, 1996.
31. Pulsinelli, W. A., J. B. Brierley, and F. Plum. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* 11: 491-498, 1982.
32. Ramkumar, V., Z. Nie, L. P. Rybak, and S. B. Maggirwar. Adenosine, antioxidant enzymes and cytoprotection. *TIPS* 16: 283-285, 1995.
33. Rudolphi, K. A., P. Schubert, F. E. Parkinson, and B. B. Fredholm. Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 4: 346-369, 1992.
34. Salvemini, D., and R. Botting. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 36-42, 1993.
35. Sarkis, J. J. F and C. Salto. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26: 871-876, 1991.
36. Schetinger, M. R. C., C. K. Barcellos, A. Barlem, G. Swestch, A. Gubert, C. Bertuol, N. Arteni, R. D. Dias, J. J. F. Sarkis, and C. A. Netto. Activity of synaptosomal ATP diphosphohydrolase from hippocampus of rats tolerant to forebrain ischemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 1123-1128, 1994.
37. Schmidt-Kastner, R., and T. F. Freund. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40: 599-636, 1991.

38. Siegfried, G., C. Amiel, and G. Friedlander. Inhibition of ecto-5'-nucleotidase by nitric oxide donors. *J. Biol. Chem.* 271: 4659-4664, 1996.
39. Tanahashi, N., M. Tomita, M. Kobari, H. Takeda, M. Yokoyama, M. Takao, and Y. Fukuuchi. Platelet activation and erythrocyte aggregation rate in patients with cerebral infarction. *Clin. Hemorheol.* 16: 497-505, 1996.
40. Vieta, M., S. S. Frassetto, A. M. O. Battastini, A. Belló Klein, C. Moreira, R. D. Dias, and J. J. F. Sarkis. Sensitivity of ATPase-ADPase activities from synaptic plasma membranes of rat forebrain to lipid peroxidation in vitro and the protective effect of vitamin E. *Neurochem. Res.* 21: 299-304, 1996.
41. Ytrehus, K., Y. Liu, and J. M. Downey. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am. J. Physiol.* 266: H1145-H1152, 1994.

Figure legends

Figure 1. Activity of platelet ATP diphosphohydrolase (ATPase and ADPase) and 5'-nucleotidase (AMPase) after brain ischemia. Results are expressed as percentage of control activity. Data represent means \pm S.D. for six to eight different platelet preparations analyzed in duplicate. Sham values for ATPase, ADPase and AMPase activities were 103.2 ± 18 (n=8), 97.4 ± 24 (n=6) and 99.5 ± 22.8 (n=6), respectively.

* Significantly different from control group, $P < 0.05$. a, significantly different from the 2' (min) of ischemia + 1 D (day) of reperfusion group, $P < 0.05$.

Figure 2. Activity of platelet ATP diphosphohydrolase (ATPase and ADPase) and 5'-nucleotidase (AMPase) after 2' (min) brain ischemia followed by reperfusion. Results are expressed as percentage of control activity. Data represent means \pm S.D. for six to eight different platelet preparations analyzed in duplicate. Sham values for ATPase, ADPase and AMPase activities were 103.2 ± 18 (n=8), 97.4 ± 24 (n=6) and 99.5 ± 22.8 (n=6), respectively. * Significantly different from control group, $P < 0.05$.

Figure 3. Activity of platelet ATP diphosphohydrolase (ATPase and ADPase) and 5'-nucleotidase (AMPase) after 10' (min) brain ischemia followed by reperfusion. Results are expressed as percentage of control activity. Data represent means \pm S.D. for six to nine different platelet preparations analyzed in duplicate. Sham values for ATPase, ADPase and AMPase activities were 103.2 ± 18 (n=8), 97.4 ± 24 (n=6) and 99.5 ± 22.8 (n=6), respectively. * Significantly different from control group, $P < 0.05$. #, significantly different from the 10' (min) of ischemia without reperfusion group, $P < 0.05$.

Figure 4. Activity of platelet ATP diphosphohydrolase (ATPase and ADPase) and 5'-nucleotidase (AMPase) after brain ischemic preconditioning followed by reperfusion. Results are expressed as percentage of control activity. Data represent means \pm S.D. for six to eight different platelet preparations analyzed in duplicate. Sham values for ATPase, ADPase and AMPase activities were 103.2 ± 18 (n=8), 97.4 ± 24 (n=6) and 99.5 ± 22.8 (n=6), respectively. * Significantly different from control group, $P < 0.05$. a, significantly different from the 2' (min) of ischemia + 1D (day) of reperfusion group, $P < 0.05$. b, significantly different from the preconditioned group 2'+10' (min) without reperfusion, $P < 0.05$.

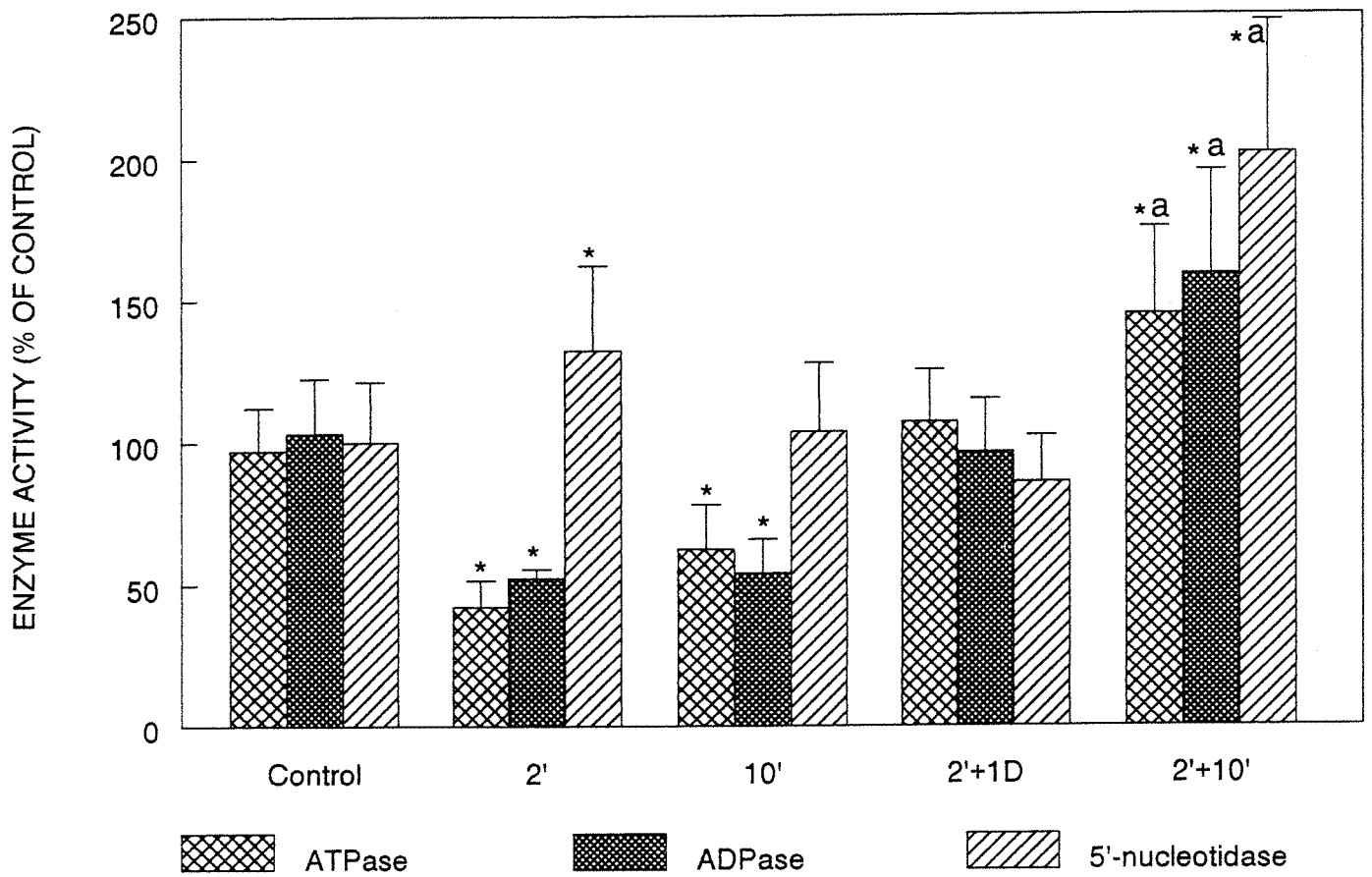


Figure 1 (Figura IV.1)

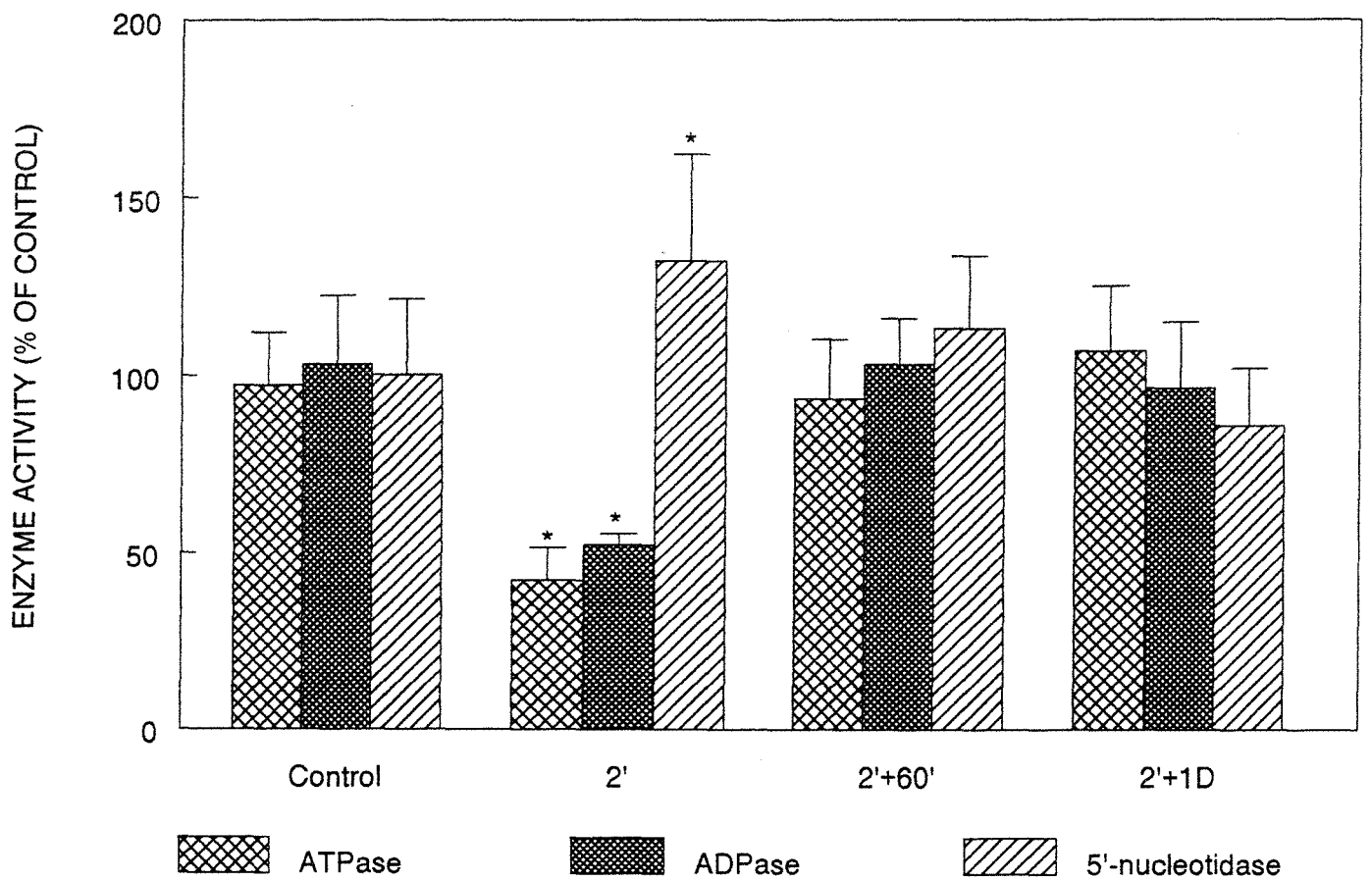


Figure 2 (Figura IV.2)

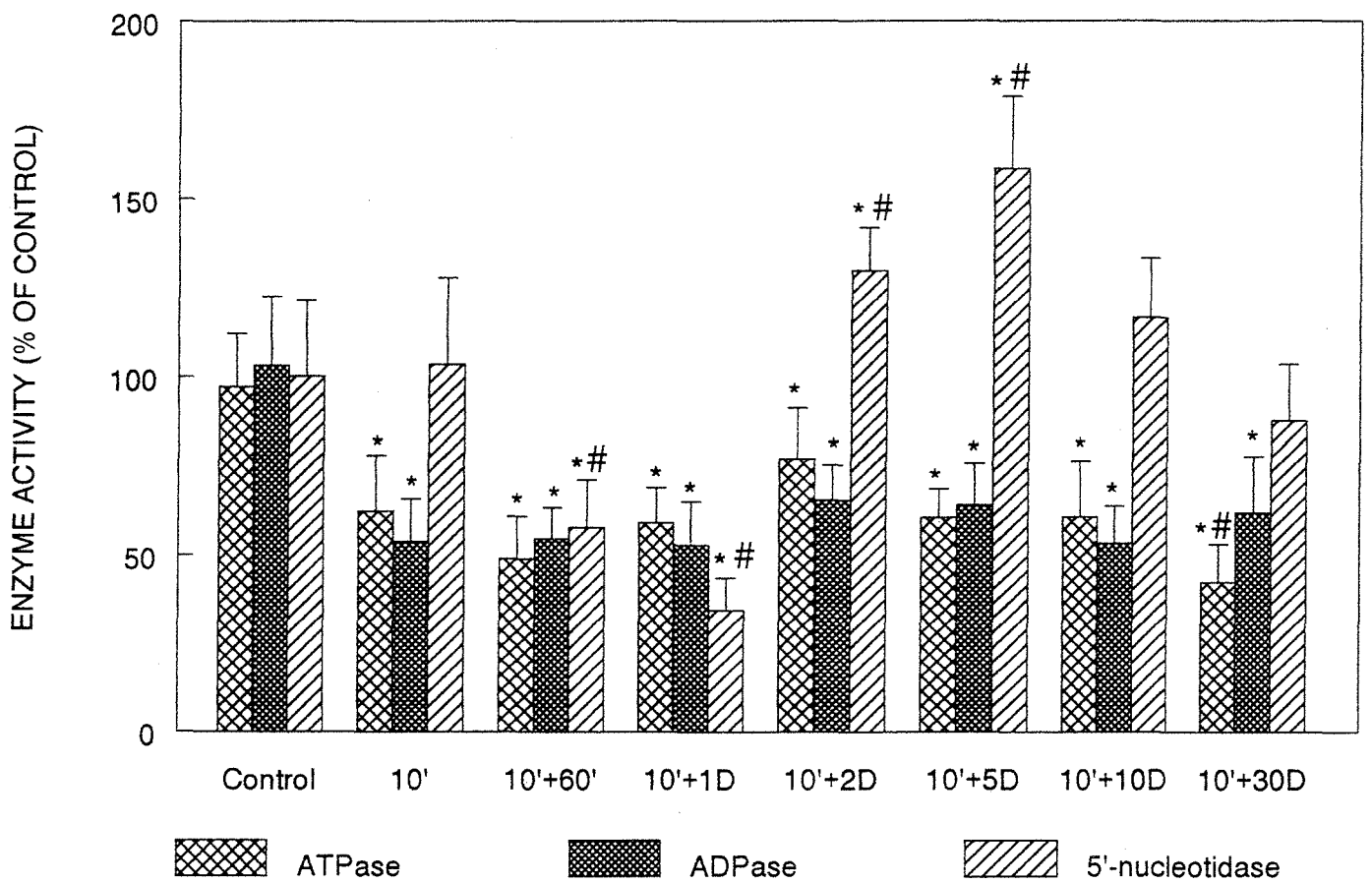


Figure 3 (Figura IV.3)

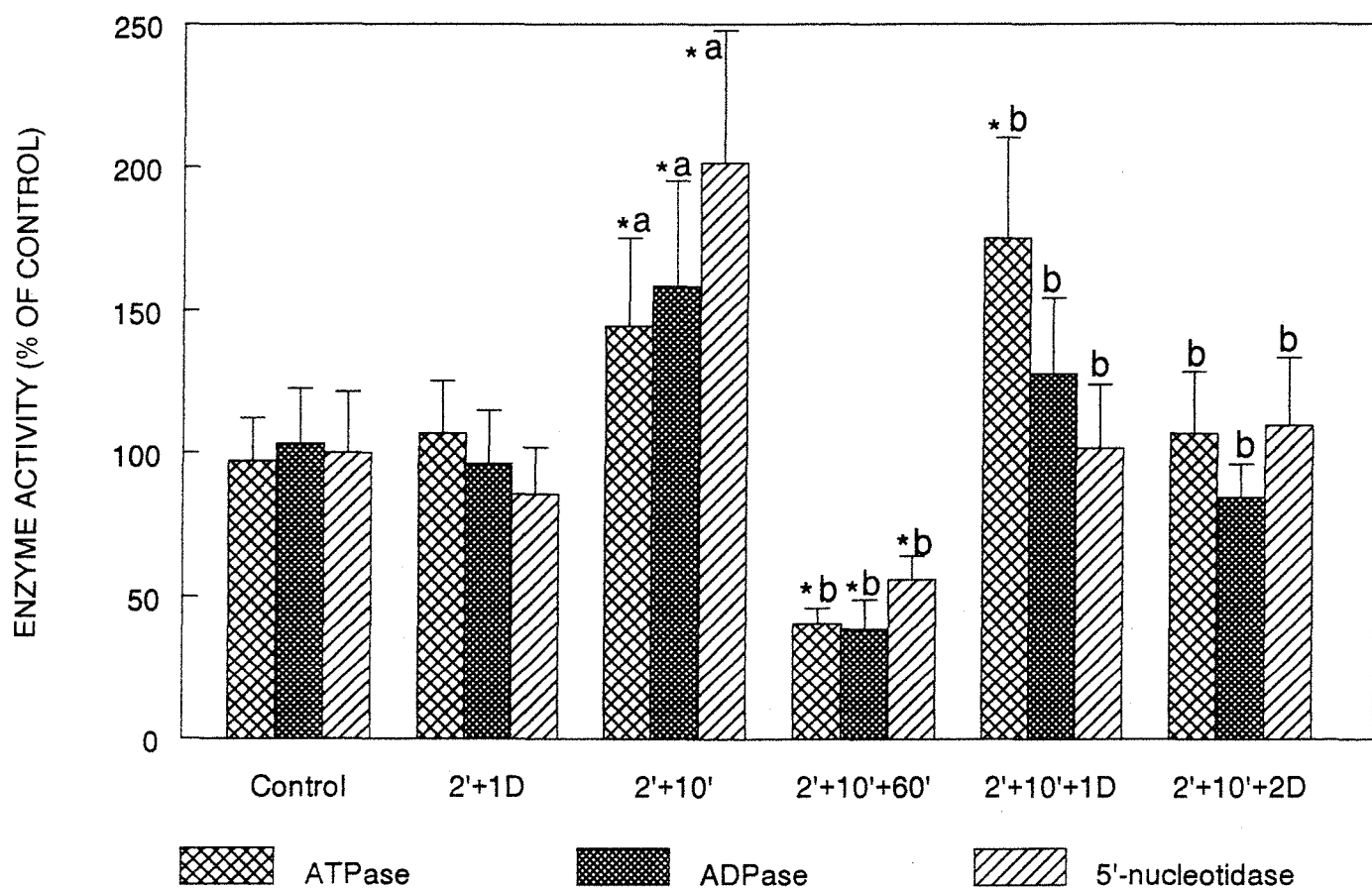


Figure 4 (Figure IV.4)

V. CAPÍTULO 4

**PRECONDITIONING CANCELS PERIPHERAL OXIDATIVE STRESS ASSOCIATED
WITH BRAIN ISCHEMIA FOLLOWED BY REPERFUSION IN RATS
(sendo submetido ao Free Radical Biology & Medicine)**

PRECONDITIONING CANCELS PERIPHERAL OXIDATIVE STRESS
ASSOCIATED WITH BRAIN ISCHEMIA FOLLOWED BY REPERFUSION IN RATS

SILVANA S. FRASSETTO ^a, MARIA ROSA C. SCHETINGER ^b, ANALUPE
WEBBER ^a, RENATO D. DIAS ^a, JOÃO J. F. SARKIS ^a AND CARLOS ALEXANDRE
NETTO ^{a,c}.

a. From the Department of Biochemistry, Basic Health Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 (anexo), Cep: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

b. From the Biochemistry Sector, Department of Chemistry, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

c. To whom correspondence should be addressed. Fax: +55 51-3165535

Running title: Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

Title: Preconditioning cancels peripheral oxidative stress associated with brain ischemia followed by reperfusion in rats.

ABSTRACT

Brain ischemia followed by reperfusion causes neuronal death due to excitotoxic-triggered oxidative stress. Furthermore, it has been reported that subjects suffering from ischemic cerebrovascular disorders exhibit changes in circulating platelet aggregation, a characteristic that might be important for their clinical outcome. In the present investigation we studied *tert*-butyl hydroperoxide-initiated plasma chemiluminescence and thiol content, as measures of peripheral oxidative stress, in naive and preconditioned rats submitted to forebrain ischemia produced by the 4-vessel occlusion method. Rats were submitted to 2 or 10 min of global transient forebrain ischemia followed by 60 min, 1, 2, 5, 10 or 30 days of reperfusion. Preconditioned rats were submitted to a 10 min ischemic episode 1 day after a 2 min ischemic event (2+10 min), followed by 60 min or 1 or 2 days of reperfusion. It has been demonstrated that such preconditioning model protects up to 50% of CA₁ pyramidal cells of the dorsal hippocampus in rats and gerbils submitted to a lethal (10 min) ischemic episode. The results show that both 2 and 10 min of ischemia cause an increase of plasma chemiluminescence when compared to control and sham rats. In the 2 min ischemic group, the effect was not present after reperfusion. In the 10 min ischemic group, the increase was present up to 1 day after recirculation and values returned to control levels after 2 days. However, rats preconditioned to ischemia (2+10 min) and reperfusion showed no differences in plasma chemiluminescence when compared to controls. We also analyzed plasma thiol content since it has been described that cysteine residues in albumin significantly contribute to the antioxidant capacity of plasma. There

was a significant decrease of plasma thiol content after 2, 10 min and 2+10 min of ischemia followed by reperfusion when compared to controls. We suggest that: a) ischemia causes, along with brain oxidative stress and cell death, a peripheral oxidative stress; b) rats protected against neuronal death by preconditioning do not exhibit ischemia-induced increases in plasma chemiluminescence; c) the decrease in thiol content in all reperfused groups indicates its antioxidant capacity.

Keywords: Brain Ischemia, Reperfusion, Plasma, Oxidative Stress, Ischemic Preconditioning, Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence, Plasma Thiols, Albumin.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

INTRODUCTION

Neuronal damage following transient brain ischemia is mediated by various mechanisms, among which reactive oxygen species-mediated processes play a central role. The injurious effect of free radicals in brain ischemia is evident from studies demonstrating that free radical scavengers confer protection from ischemic damage¹, and transgenic mice overexpressing superoxide dismutase exhibit less edema and smaller infarcts when subjected to ischemia.² Furthermore, damage to the brain is also observed during reperfusion after ischemia (when the oxygen supply is restored to the brain) and may be attributed primarily to the presence of reactive oxygen species that can induce oxidative stress.³ The sources of reactive oxygen species include: a) products from the arachidonic acid cascade; b) metabolism of xanthine by xanthine oxidase⁴ and c) release of excitatory amino acids.⁵

Besides the effects on the central nervous system, recent studies have reported that peripheral events also occur after ischemic cerebrovascular disease, such as changes of platelet surface glycoproteins⁶, platelet activation and erythrocyte aggregation in the circulation^{7,8}, and diffusion of NO (nitric oxide) produced by neurons into the bloodstream.⁹ Although these authors have shown that ischemic cerebrovascular disease induces peripheral effects, it has not been defined if a probable oxidative stress is related to these effects. Salvemini and colleagues¹⁰ have suggested that in ischemic heart disease, platelet activation is related to oxidative stress. Thus, superoxide anions (O_2^-) enhance platelet activation and aggregation in the circulation, while NO is able to inhibit the response of platelets to superoxide.¹¹

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

In the present study we suggest that cerebral ischemia and reperfusion may cause, along with brain oxidative stress and cell death, a peripheral oxidative stress that probably is related to important alterations such as microthrombus formation during this disease. However, it has been proposed that brain ischemic preconditioning (when brief periods of ischemia precede longer and injurious ischemic episodes) is responsible for attenuation of neural ischemic injury.¹² Thus, our objective was also to establish a relationship between brain ischemic preconditioning and a possible protection against the state of peripheral oxidative stress. To evaluate this possible relationship, we firstly measured the *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence emission in plasma of naive and preconditioned rats submitted to forebrain ischemia and reperfusion. This assay is based on the determination of stable products or byproducts of the reaction chain of lipid peroxidation, a process that follows the production of oxygen free radicals in biological systems. The assay has also been applied to detect the existence of oxidative stress associated with experimental pathological situations.¹³ We next examined the effect of brain ischemia and preconditioning on plasma thiols because extracellular protein sulphhydryls, such as albumin sulphhydryls, have been proposed to serve as scavenging antioxidants¹⁴ and are generally highly effective in reducing ischemia-reperfusion injury.¹⁵ In this study, our hypothesis is that brain ischemia and reperfusion lead to a peripheral oxidative stress and brain ischemic preconditioning protects against peripheral oxidative damage.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Tert-butyl hydroperoxide was obtained from Aldrich Chemicals Co (Milwaukee, WI) and 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A). All other reagents were of analytical grade.

Brain ischemia and reperfusion

Male Wistar rats from our breeding stock were maintained on a 12h light/12h dark cycle in a constant temperature room. We produced transient forebrain ischemia in rats weighing 180-200 g by the four-vessel occlusion method of Pulsinelli (4-VO).¹⁶ Briefly, the vertebral arteries were electrocoagulated through the alar foramina on the first cervical vertebra under halothane anaesthesia, and silastic ties were inserted around the carotids and brought to the surface. Twenty-four hours later the ties were tightly clamped for 2 or 10 min. Thus, rats were submitted to 2 or 10 min of ischemia. After ischemia, other rats were also submitted to different periods (60 min, 1, 2, 5, 10 and 30 days) of reperfusion. The double-ischemic group (ischemic preconditioning group) was submitted to 10 min injurious ischemia 1 day after a 2 min ischemic episode (2'+10'). Other animals received 60 min, 1 or 2 days of reperfusion after the double-ischemic episode. Any rat that did not lose the righting reflex or that convulsed during the ischemic or reperfusion period was discarded. Sham-operated and intact rats were used as controls.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

Plasma isolation

Plasma was obtained from fresh citrated rat blood. Red blood cells and buffy coat were removed by centrifugation at 200 *g* for 5 min at room temperature and platelets were removed by plasma centrifugation at 200 *g* for 20 min. The supernatant was used for subsequent experiments.

Determination of plasma tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence

Chemiluminescence emission was measured with an LKB Rack Beta liquid scintillation spectrometer model 1215 (LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden). Plasma samples in glass vials were kept in the dark up to the moment of assay and determinations were carried out in a dark room in order to avoid vial phosphorescence activated by fluorescent light. When *tert*-butyl hydroperoxide was added to plasma the emission increased with time to reach a maximal level after 30 min. Thus, we analyzed chemiluminescence emissions 30 min after the addition of *tert*-butyl hydroperoxide. Assay conditions as described by Flecha and colleagues¹⁷ were: 1 to 1.5 mg/ml of plasma protein in a reaction medium consisting of 120 mM KCl, 30 mM phosphate buffer, pH 7.4, with 3 mM *tert*-butyl hydroperoxide, in a final volume of 3 ml. Results are expressed as counts per second (cps)/mg protein.

Determination of plasma thiol groups

Plasma SH groups (which originate predominantly from plasma proteins, especially albumin) were measured spectrophotometrically after reaction with DTNB.¹⁸ Absorbance at 412 nm was measured after 20 min incubation at room temperature. Plasma SH groups were calculated using an absorptivity of 13600 cm⁻¹. M⁻¹.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

Protein determination

Protein was determined by the Comassie Blue method¹⁹ with bovine serum albumin used as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way and two-way analysis of variance. Post hoc tests included the Duncan procedure for multiple intergroup comparisons. *P* values less than 0.05 were considered to be significant.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

RESULTS

Effect of single and double-ischemic episodes on plasma tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence and plasma thiols

We studied plasma *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence emission in rats submitted to 2 and 10 min brain ischemia. We also studied the effect of a double-ischemic episode (2'+10'), a brief ischemic episode (2 min) inflicted 1 day before a longer period of ischemia (10 min). Several studies have suggested that the ischemic injury is markedly limited when the preconditioning phenomenon occurs, because the brief episode of ischemia that causes no neuronal death induces tolerance to the longer ischemic episode.²⁰ Plasma hydroperoxide-initiated chemiluminescence of rats submitted to 2 and 10 min brain ischemia was significantly increased by about 40-50% when compared to the photoemission of plasma from control rats (Fig. 1A). In contrast to 2 or 10 min ischemic episodes alone, plasma of rats submitted to the double-ischemic episode did not show an increase in emission when compared to control groups or to the group that was submitted to only 2 min ischemia followed by 1 day reperfusion (Fig. 1A). Considering that brain ischemia increases plasma hydroperoxide-initiated chemiluminescence, we next examined its effects on plasma sulphydryl (SH) groups. The thiols in plasma, particularly the cysteine residues of albumin, make a significant contribution to the peroxy-radical scavenging capacity of plasma.²¹ Brain ischemia (2 or 10 min) and the double-ischemic episode (2'+10') did not cause alteration of plasma SH groups (Fig. 1B). A decrease in plasma SH groups was only found after 2 min of ischemia followed by 1 day of reperfusion when compared to controls (Fig. 1B). Since 2 min ischemia followed by 1 day reperfusion

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

induces tolerance to a longer and injurious ischemic episode (10 min), we suggest that in this situation plasma SH groups were depleted as sacrificial antioxidants¹⁴ probably to protect more important targets such as proteins and lipids against oxidative damage. Probably, the plasma of rats submitted to 2 min ischemia followed by 1 day reperfusion and to the double-ischemic episode did not show an increase in chemiluminescence emission because plasma SH groups were consumed in the first situation. Thus, the results suggest that the brain preconditioning phenomenon may cause loss of plasma SH groups as a protective mechanism to avoid a possible peripheral oxidative damage. Since the majority of SH groups in plasma are associated with albumin that has been proposed to be a scavenging antioxidant,¹⁴ this protein is damaged but there is so much albumin in plasma that damage may be biologically insignificant. The fact that single ischemic episodes (2 or 10 min) show an increase in plasma chemiluminescence emission implies that brain ischemia may induce a peripheral oxidative stress.

Effect of reperfusion after single ischemic episodes on plasma tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence and plasma thiols

Figure 2A illustrates the effect of 60 min and 1 day reperfusion after 2 min brain ischemia on plasma chemiluminescence. As can be seen, reperfusion significantly decreased chemiluminescence emission to control levels when these data were compared to 2 min ischemia. In relation to the effect of reperfusion after 2 min ischemia on plasma thiols (Fig. 2B), 60 min and 1 day reperfusion resulted in a significant decrease of SH groups to levels below the control and 2 min ischemia values.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

On the other hand, 60 min and 1 day reperfusion after 10 min brain ischemia still resulted in a 30-40% increase of plasma chemiluminescence emission (Fig. 3A). Values for plasma chemiluminescence of rats submitted to 2, 5, 10 and 30 days reperfusion after 10 min ischemia were similar to controls (Fig. 3A). Similarly to the results of reperfusion after 2 min ischemia, reperfusion (60 min, 1, 2, 5 and 10 days) after 10 min ischemia also induced plasma SH depletion when compared to data from control and 10 min ischemia without reperfusion (Fig. 3B). Although the effect of reperfusion after 10 min ischemia on the depletion of plasma thiols was observed up to 10 days, values for plasma SH groups after 30 days reperfusion were not significantly different from controls (Fig. 3B), probably because albumin has a half-life of 20 days.¹⁴ A possible interpretation of these results is that reperfusion after brain ischemia may also induce peripheral alterations in plasma. The results from animals reperfused after 10 min ischemia indicate that there is a relationship between plasma oxidative stress and brain reperfusion when this injurious ischemic episode occurs, since 60 min and 1 day reperfusion still maintain the increase of chemiluminescence emission caused by 10 min ischemia even when plasma thiols are depleted (Fig. 3A). In contrast, reperfusion after a brief ischemic episode (2 min) led to the utilization of plasma thiols as antioxidants and, consequently, the decrease of chemiluminescence emission to control values (Fig. 2A). Thus, it seems that the decrease of plasma chemiluminescence emission to control levels during longer periods of reperfusion after 10 min ischemia (Fig. 3A) may also be related to the utilization of plasma thiols (Fig. 3B) as a long-term peripheral antioxidant control against a possible oxidative damage.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

Thus, the interesting aspects of the results illustrated in Figure 3A and 3B are the ability of plasma to recover from oxidative stress and the regeneration of thiols after 30 days reperfusion, even after depletion of about 50% of thiols levels after 5 days reperfusion.

Effect of reperfusion after a double-ischemic episode on plasma tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence and plasma thiols

The effect of 60 min, 1 and 2 days reperfusion on plasma of rats submitted to a 10 min brain ischemic episode after preconditioning (2'+10') is demonstrated in Figure 4A and 4B. As shown in Figure 4A, when chemiluminescence emission was measured, plasma of rats submitted to 10 min injurious ischemia after a preconditioning time (2'+1 day reperfusion) was not significantly different from controls or the preconditioned group. Reperfusion after the double-ischemic episode did not change plasma chemiluminescence emission when compared to the control and double-ischemic groups (Fig. 4A). Plasma thiol content was measured under the same conditions of reperfusion after the double-ischemic episode used to measure plasma chemiluminescence emission (Fig. 4B). As demonstrated in Figure 1B, Figure 4B also shows that preconditioning time (2'+1 day reperfusion) significantly decreased plasma SH groups when compared to control. On the other hand, 10 min ischemia after preconditioning (2'+10') was able to maintain plasma SH groups at control levels. Nevertheless, results with plasma of rats submitted to 60 min or 1 and 2 days reperfusion after the double-ischemic episode indicate that in this situation reperfusion causes a loss of SH groups (Fig. 4B). From a comparison of Figures 4A, 4B and other figures, we suggest that the permanence of plasma chemiluminescence emission at control levels after some situations is associated with the consumption of plasma thiols as antioxidants. Interestingly, it is clear that plasma

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

was protected from oxidative stress by a longer ischemic episode (10 min) and reperfusion when brain ischemic preconditioning occurred and also when thiols were depleted (Fig. 4A and 4B). The results of Figure 4A can be compared to the results of Figure 3A that shows the significant increase of plasma chemiluminescence emission when rats were submitted to 10 min ischemia and reperfusion without the protection of the preconditioning time. Thus, we conclude that brain ischemic preconditioning may also induce a protective peripheral effect against injurious brain ischemic episodes and reperfusion as it occurs in the central nervous system.²⁰

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

DISCUSSION

The findings of this study are that brain ischemia and reperfusion induce peripheral alterations demonstrated in plasma that are probably related to an increased formation of reactive oxygen species. Furthermore, it seems that brain ischemic preconditioning, as a phenomenon responsible for the protection of the central nervous system against injurious ischemic episodes and reperfusion,²⁰ also prevented plasma oxidative damage when chemiluminescence emission was measured. Anyway, the determination of plasma thiols, most of which associated with albumin as antioxidant, indicate a relationship between the consumption of SH groups and the permanence of plasma chemiluminescence emission at control levels. This relationship could be seen when rats were submitted to reperfusion after 2 min (Figs. 2A and 2B) or 10 min ischemia (Figs. 3A and 3B) and mainly after the preconditioning time followed by 10 min ischemia and reperfusion (Figs. 4A and 4B), which suggests that reperfusion is related to the depletion of thiols and, consequently, to normalization of plasma chemiluminescence emission as much after single ischemic episodes as after double-ischemic episodes (preconditioning). Thus, this is the first demonstration that a peripheral oxidative stress is associated with brain ischemia and reperfusion and that ischemic preconditioning induces protective effects. Considering the literature and our results, it seems that brain ischemia and preconditioning cause injurious and protective effects, respectively, in the central nervous system but also in the bloodstream as a possible peripheral indicator of central events.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

It has been suggested that neuronal damage in brain ischemia and reperfusion is partly due to oxidative damage caused by free radical formation.²² Free radicals are extremely reactive compounds that can react with lipids, enzymes^{23,24} or DNA to produce various harmful effects.²⁵ Recent studies have shown the simultaneous production of nitric oxide (NO) and superoxide anion (O_2^-) within reperfused ischemic cerebral tissue that might lead to the formation of cytotoxic peroxynitrite or an oxidant derived from it.²⁶ Interestingly, this NO produced by neurons that reacts with superoxide can also diffuse across the endothelium into the bloodstream upon reperfusion.²⁶ Indeed, both superoxide and NO are relatively unreactive towards most of the organic molecules, whereas peroxynitrite is a potent oxidant which is able to oxidize lipids²⁷ and thiols.²⁸ As a consequence, peroxynitrite is being recognized as a reactive intermediate that may participate in injury processes associated with oxidative damage. In plasma, peroxynitrite induces oxidative damage by its effects in decreasing the levels of antioxidants such as thiol groups.^{29,30} Plasma thiols, mostly albumin-thiol, are oxidized by peroxynitrite and this process may prevent attack of more critical plasma proteins such as enzymes and antibodies. For this reason, albumin has been regarded as a sacrificial antioxidant in plasma.¹⁴ On account of its high concentration (40 g/l) and rapid turnover rate (half-life of about 20 days) in plasma,¹⁴ albumin might be an important determinant of protection against oxidative stress since it was thought to play a role in the decreased mortality from coronary heart disease.³¹ In our study with plasma from rats submitted to brain ischemia, reperfusion and ischemic preconditioning, probably the depletion of albumin thiols provided protection against oxidative damage. The protective effect of albumin may be due to its antioxidative capacity, since oxidative stress demonstrated here by

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

chemiluminescence emission has been considered to be a consequence of the generation of reactive oxygen species.¹⁷ Our results are in accordance with findings reported by Strubelt and colleagues³², who demonstrated that albumin provided protection against liver ischemia and hypoxia-reoxygenation-induced oxidative damage.

The finding that brain ischemia and reperfusion can induce peripheral oxidative stress and depletion of plasma thiols, however, is one of the main points of our results. The biological significance of these findings is that probably reactive oxygen species are produced during brain ischemia and reperfusion and can induce neuronal damage^{3,5,26} but also plasma oxidative damage that may be related to microthrombus formation in this situation.^{7,8} On the other hand, only partial neuronal death occurs when brain ischemic preconditioning precedes an injurious ischemic episode and reperfusion²⁰ and, as we have shown with our results, the chemiluminescence emission measured indicated that plasma is also protected by the preconditioning phenomenon. Thus, we suggest that sacrifice reactions of plasma thiols (mostly, albumin thiol) with reactive oxygen species lead to oxidative deterioration of albumin itself but provide protection for plasma against oxidative stress.

In conclusion, although much work is needed to determine which oxidants participate in the development of plasma injury during cerebral ischemia, the present results support our aim to demonstrate that preconditioning cancels the peripheral oxidative stress associated with brain ischemia and reperfusion.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil). S. S. F. was the recipient of a CAPES (Brazil) fellowship.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

REFERENCES

1. Watanabe, T.; Yuki, S.; Egawa, M.; Nishi, H. Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**:1597-1604; 1994.
2. Kinouchi, H.; Epstein, C. J.; Mizui, T.; Carlson, E.; Chen, S. F.; Chan, P. H. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:11158-11162; 1991.
3. Globus, M. Y. T.; Busto, R.; Lin, B.; Schnippering, H.; Ginsberg, M. D. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intraschemic brain temperature modulation. *J. Neurochem.* **65**:1250-1256; 1995.
4. Traystman, R. J.; Kirsch, J. R.; Koehler, R. C. Oxygen radical mechanism of brain injury following ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.* **71**:suppl. 1185-1195; 1991.
5. Yang, C.; Lin, N.; Tsai, P.; Liu, L.; Kuo, J. In vivo evidence of hydroxyl radical formation induced by elevation of extracellular glutamate after cerebral ischemia in the cortex of anesthetized rats. *Free. Rad. Biol. Med.* **20**:245-250; 1996.
6. Legrand, C.; Woimant, F.; Caen, J. Platelet surface glycoprotein changes in patients with cerebral ischemia. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **33**:497-500; 1991.
7. Isaka, Y.; Kimura, K.; Uehara, A.; Hashikawa, K.; Mieno, M.; Matsumoto, M.; Handa, N.; Nakabayashi, S.; Imaizumi, M.; Kamada, T. Platelet aggregability and in vivo platelet deposition in patients with ischemic cerebrovascular disease. Evaluation by indium-111-platelet scintigraphy. *Thromb. Res.* **56**:739; 1989.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

8. Tanahashi, N.; Tomita, M.; Kobari, M.; Takeda, H.; Yokoyama, M.; Takao, M.; Fukuuchi, Y. Platelet activation and erythrocyte aggregation rate in patients with cerebral infarction. *Clin. Hemorheol.* **16**:497-505; 1996.
9. Kumura, E.; Kosaka, H.; Shiga, T.; Yoshimine, T.; Hayakawa, T. Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**:487-491; 1994.
10. Salvemini, D.; Botting, R. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**:36-42; 1993.
11. Sneddon, J. M.; Vane, J. R. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2800-2804; 1988.
12. Llesuy, S.; Milei, J.; Gonzalez Flecha, B.; Boveris, A. Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. *J. Free Radic. Biol. Med.* **8**:259-264; 1990.
13. Halliwell, B. Albumin - an important extracellular antioxidant? *Biochem. Pharmacol.* **37**:569-571; 1988.
14. Das, D. K.; Maulik, N. Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol.* **233**:601-610; 1994.
15. Losano, G.; Gattullo, D.; Pagliaro, P. Myocardial, neural and vascular aspects of ischemic preconditioning. *Life Sci.* **59**:1185-1192; 1996.
16. Pulsinelli, W. A.; Brierley, M. D.; Plum, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* **1**:491-498; 1982.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

17. Flecha, B. G.; Liesuy, S.; Boveris, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Rad. Biol. Med.* **10**:93-100; 1991.
18. Hu, M. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* **233**:380-385;1994.
19. Bradford, M. M. 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; 1976.
20. Kitigawa, K.; Matsumoto, M.; Tagaya, M.; Hata, R.; Ueda, H.; Niinobe, M.; Handa, N.; Fukunaga, R.; Kimura, K.; Mikoshiba, K.; Kamada, T. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res.* **528**:21-24; 1990.
21. DiSimplicio, P.; Cheeseman, K. H.; Slater, T. F. The reactivity of the SH group of bovine serum albumin with free radicals. *Free Rad. Res. Commun.* **14**:253-262; 1991.
22. Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**:1609-1623; 1992.
23. Vietta, M.; Frassetto, S. S.; Battastini, A. M. O.; Klein, A. B.; Moreira, C.; Dias, R. D.; Sarkis, J. J. F. Sensitivity of ATPase-ADPase activities from synaptic plasma membranes of rat forebrain to lipid peroxidation in vitro and the protective effect of vitamin E. *Neurochem. Res.* **21**:299-304; 1996.
24. Frassetto, S. S.; Dias, R. D.; Sarkis, J. J. F. Free radical-induced inhibition of ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **41**:161-168; 1997.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

25. Siesjo, B. K.; Agardh, C. -D.; Bengtsson, F. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1**:165-211; 1989.
26. Kumura, E.; Yoshimine, T.; Iwatsuki, K.; Yamanaka, K.; Tanaka, S.; Hayakawa, T.; Shiga, T.; Kosaka, H. Generation of nitric oxide and superoxide during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Am. J. Physiol.* **270** (Cell. Physiol. 39):C748:C752; 1996.
27. Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**:481-487; 1991.
28. Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**:4244-4250; 1991.
29. Van der Vliet, A.; Smith, D.; O'Neill, C. A.; Kaur, H.; Darley-Usmar, V.; Cross, C. E.; Halliwell, B. Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem. J.* **303**:295-301; 1994.
30. Vásquez-Vivar, J.; Santos, A. M.; Junqueira, V. B. C.; Augusto, O. Peroxynitrite-mediated formation of free radicals in human plasma: EPR detection of ascorbyl, albumin-thiyl and uric acid-derived free radicals. *Biochem. J.* **314**:869-876; 1996.
31. Luoma, P. V.; Nayha, S.; Sikkilä, K.; Hassi, J. High serum alpha-tocopherol, albumin, selenium and cholesterol, and low mortality from coronary heart disease in northern Finland. *J. Intern. Med.* **237**:49-54; 1995.
32. Strubelt, O.; Younes, M.; Li, Y. Protection by albumin against ischaemia- and hypoxia-induced hepatic injury. *Pharmacol. Toxicol.* **75**:280-284; 1994.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

Figure legends

Figure 1. Effect of transient forebrain ischemia in rats on (1A) *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence of plasma and (1B) plasma thiols. Rats were submitted to 2 min (2'), 10 min (10') and 10 min ischemia 1 day (D) after a 2 min ischemic episode (2'+10'). Values for 2 min ischemia followed by 1 day (D) reperfusion (2'+1D) were compared to those for the (2'+10') group. Data represent the mean \pm SD for six to eight different animals. * indicates values significantly different from control groups, $p < 0.05$. # indicates value significantly different from the (2'+1D) group, $p < 0.05$.

Figure 2. Effect of 2 min (2') transient forebrain ischemia and reperfusion in rats on (2A) *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence of plasma and (2B) plasma thiols. Rats were submitted to 2 min (2') ischemia followed by 60 min or 1 day (D) reperfusion. Data represent the mean \pm SD for six to nine different animals. * indicates values significantly different from control groups, $p < 0.05$. # indicates values significantly different from the 2 min (2') ischemic group, $p < 0.05$.

Figure 3. Effect of 10 min (10') transient forebrain ischemia and reperfusion in rats on (3A) *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence of plasma and (3B) plasma thiols. Rats were submitted to 10 min (10') ischemia followed by 60 min or 1, 2, 5, 10 and 30 days (D) reperfusion. Data represent the mean \pm SD for six to eight different animals.

Brain ischemia-induced peripheral oxidative stress in rats.

* indicates values significantly different from control groups, $p < 0.05$. # indicates values significantly different from 10 min (10') ischemic group, $p < 0.05$.

Figure 4. Effect of brain ischemic preconditioning and reperfusion in rats on (4A) *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence of plasma and (4B) plasma thiols. Rats were submitted to 2 min (2') ischemia followed by 1 day (D) reperfusion (2'+1D) and 10 min (10') ischemia 1 day (D) after a 2 min ischemic episode (2'+10'). Rats were also submitted to 60 min or 1 and 2 days (D) reperfusion after the double-ischemic episode (2'+10'). Data represent the mean \pm SD for six to nine different animals. * indicates values significantly different from control group, $p < 0.05$. # in 4B indicates a value significantly different from (2'+1D), $p < 0.05$. a in 4B indicates values significantly different from (2'+10') group, $p < 0.05$.

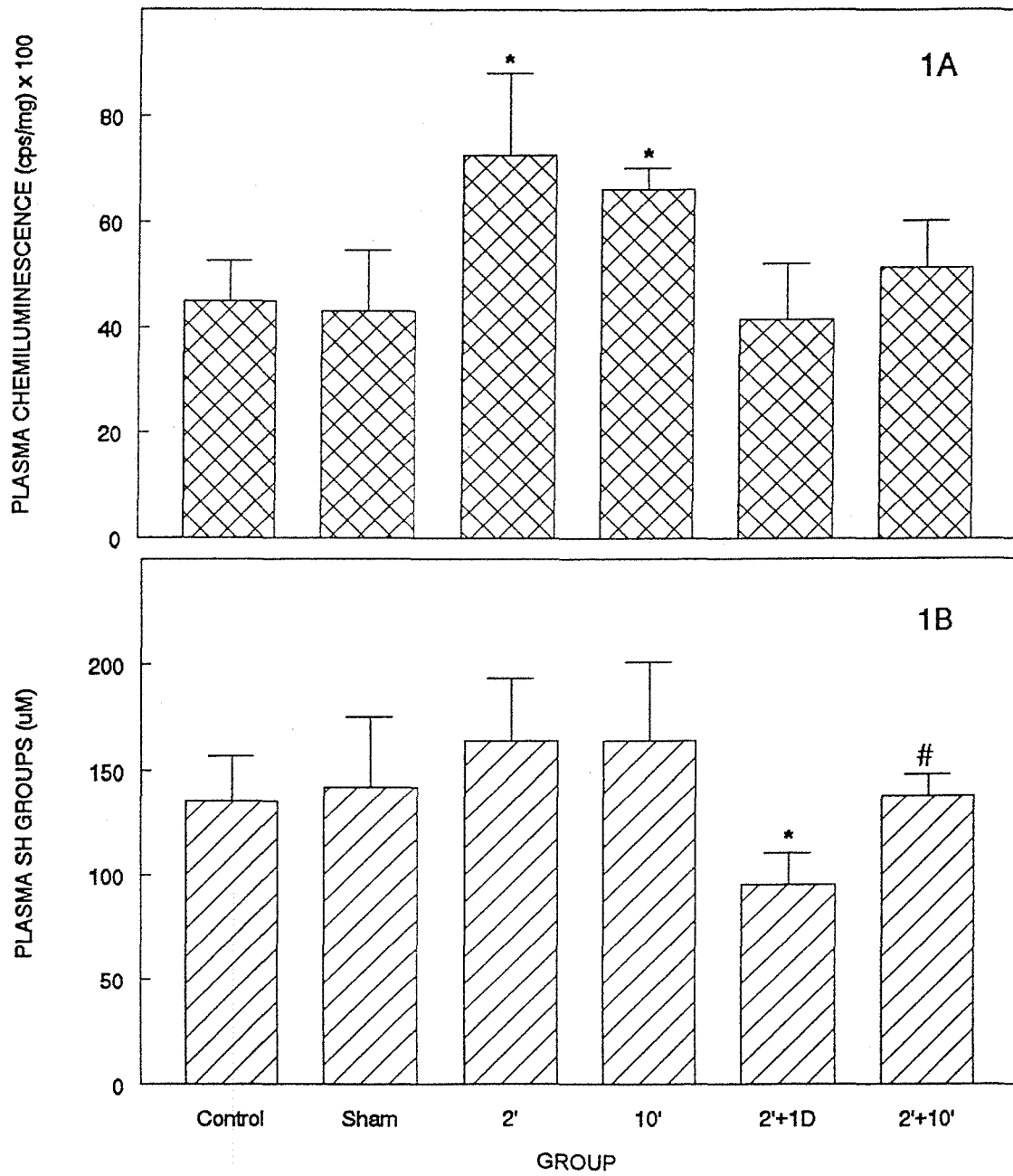


Figure 1 (Figura V.1)

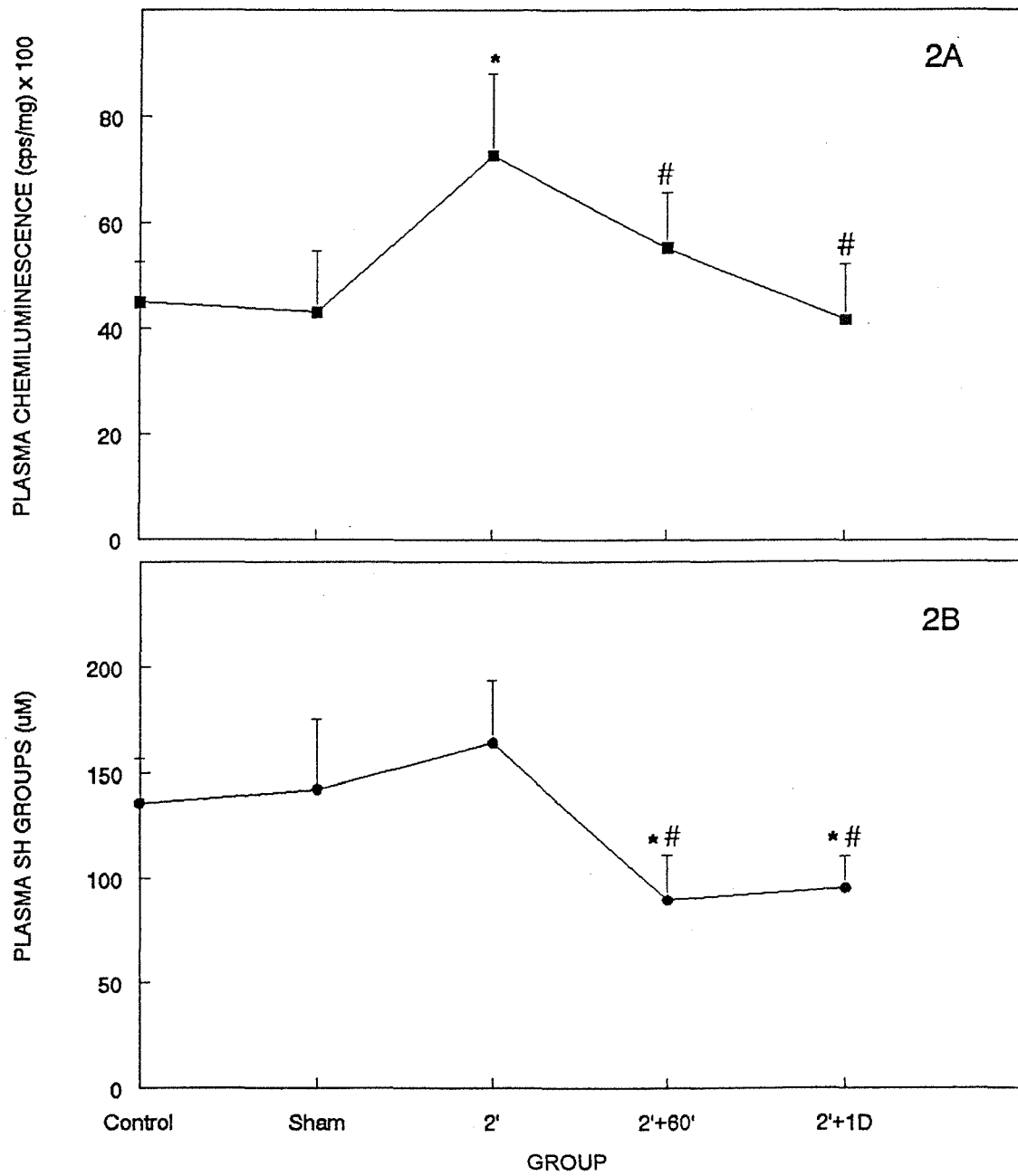


Figure 2 (Figura V.2)

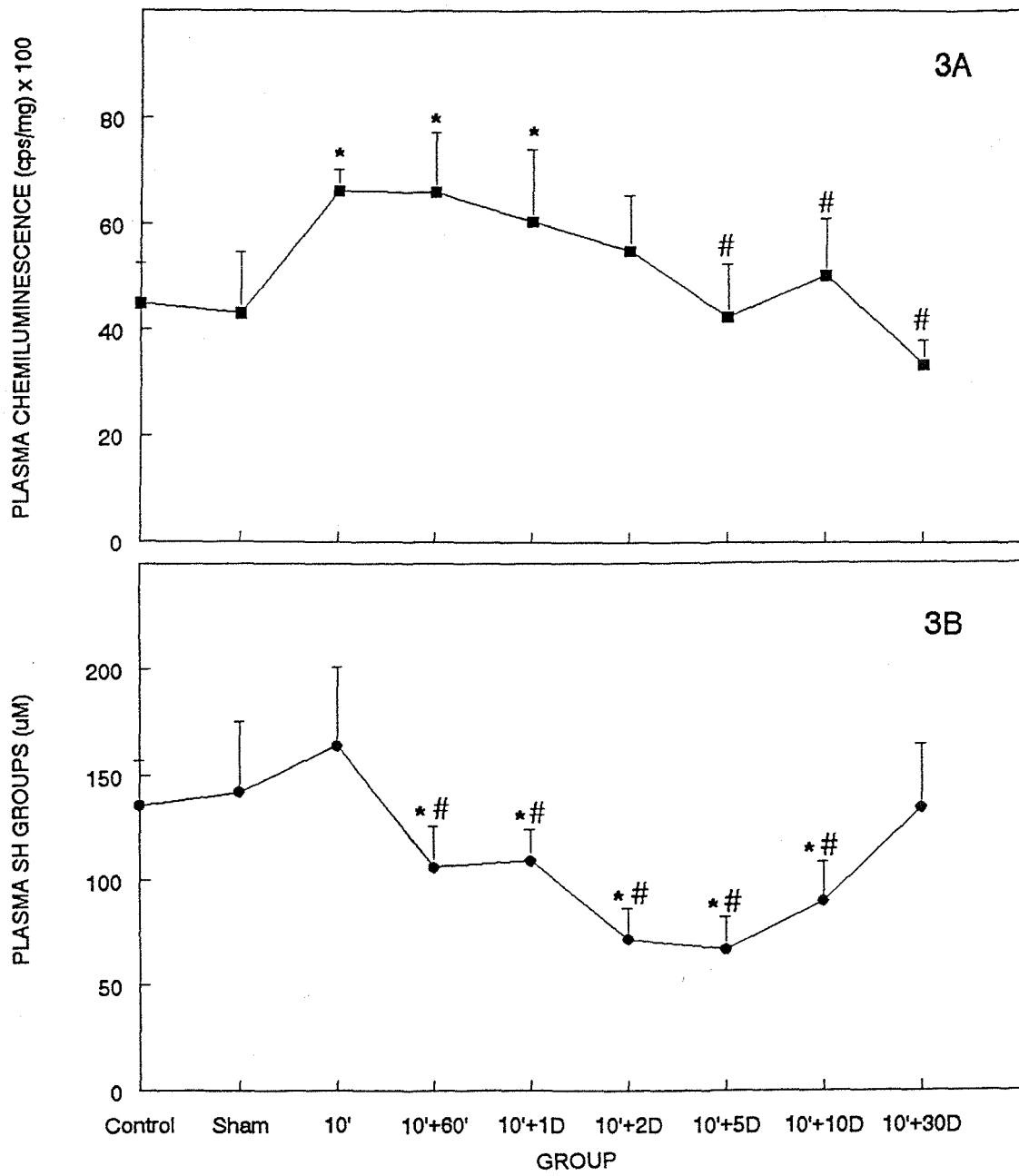


Figure 3 (Figura V.3)

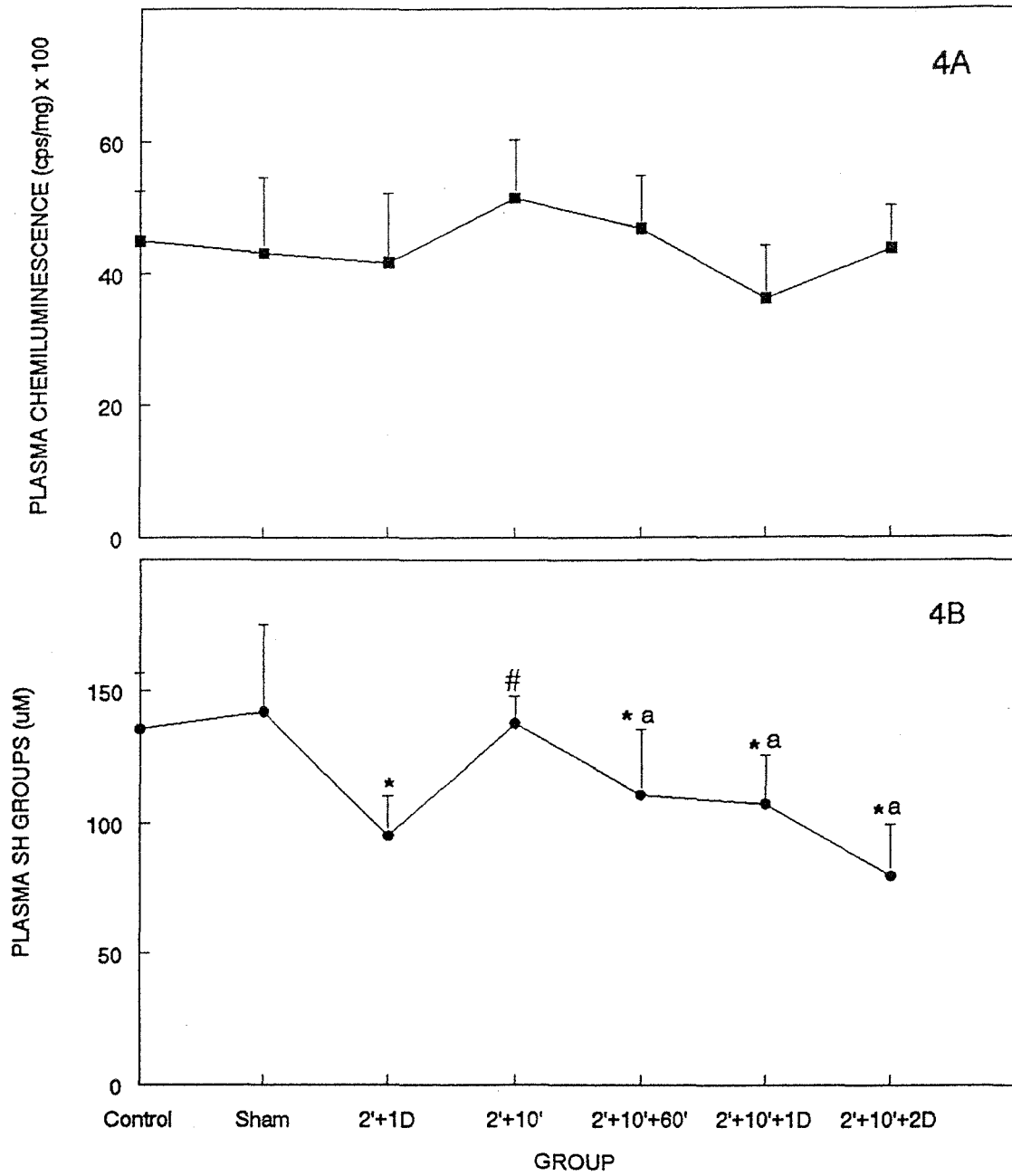


Figure 4 (Figura V.4)

VI. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com este estudo que relaciona a atividade da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas intactas de ratos adultos com os radicais livres, a isquemia cerebral global transitória e o estresse oxidativo periférico durante a isquemia nos levam às considerações abaixo.

As atividades de hidrólise de ATP e ADP pela ATP difosfoidrolase e AMP pela 5'-nucleotidase de plaquetas são inibidas "in vitro" por um sistema gerador de radicais livres (*Capítulos 1 e 2 da tese*). Os resultados indicam que estas atividades enzimáticas são inibidas no máximo 50% quando a preparação de plaquetas gel-filtradas é incubada por 30 minutos na presença do sistema que produz radicais livres. Uma vez que a ATP difosfoidrolase e a 5'-nucleotidase são enzimas localizadas na membrana plasmática das plaquetas e foram inibidas por radicais livres, nós investigamos a possibilidade desta inibição ser devida ao processo de peroxidação lipídica da membrana.

Recentemente, nós demonstramos que o processo de peroxidação lipídica pela presença de radicais livres induz uma inibição da atividade ATPásica e ADPásica da ATP difosfoidrolase de membrana sináptica de cérebro de ratos [VIETTA et alii, 1996]. Para investigar esta possibilidade, foi utilizado um método para determinar a peroxidação lipídica através da formação de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) em plaquetas em repouso e ativadas quando em presença do sistema que forma radicais livres. Sabe-se que a abundância de ácidos graxos poliinsaturados em plaquetas de rato, que são o alvo para que o processo de peroxidação lipídica por radicais livres ocorra, está presente na superfície interna da plaqueta em repouso [JOO et alii, 1993]. Então, a ativação de plaquetas de rato aumenta a exposição de ácidos graxos poliinsaturados na superfície externa da membrana plasmática facilitando a

peroxidação lipídica [JOO et alii, 1993]. O teste TBARS mostrou que a incubação de plaquetas em repouso por 30 minutos com o sistema que forma radicais livres não aumentou a peroxidação lipídica quando comparado ao controle (sem a presença de radicais livres). Por outro lado, quando as plaquetas são ativadas, a incubação com o sistema que produz radicais livres aumenta significativamente a peroxidação lipídica acima dos valores do controle. Estes dados indicam que este sistema que produz radicais livres não induz a peroxidação lipídica em plaquetas em repouso e sugerem que as atividades da ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase não são inibidas pelo processo de peroxidação. Além disso, a vitamina E (trolox), um antioxidante que protege contra o processo de peroxidação lipídica [ROSS & MOLDEUS, 1991], não preveniu a inibição das atividades enzimáticas de plaquetas em repouso pelo dano oxidativo.

Considerando que o processo de peroxidação lipídica pode ocorrer em plaquetas ativadas, provavelmente as atividades da ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase também são alteradas por este processo quando há ativação plaquetária na circulação sanguínea.

Como a inibição da atividade da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase não parecia ser devido à peroxidação lipídica, nós investigamos a possibilidade de que resíduos com grupos sulfidril (-SH) poderiam ser importantes para estas atividades uma vez que a oxidação desses grupamentos poderia causar a inibição enzimática. Tem sido descrito que grupos sulfidril são grandes alvos para os radicais livres [ARMSTRONG & BUCHANAN, 1978]. Foram testados tióis como a cisteína e a glutathione reduzidas na tentativa de proteger as atividades enzimáticas contra o efeito de inibição pelos radicais livres. A glutathione e a cisteína foram capazes de proteger as atividades enzimáticas mas a glutathione não protegeu os grupos sulfidril, determinados

em plaquetas de rato, que foram oxidados pelos radicais livres. Por outro lado, a cisteína protegeu os grupos sulfidril contra a oxidação. Este dados sugerem que tióis presentes no plasma como a glutatona e a cisteína [SORIANI et alii, 1994] protegem as atividades da ATP difosfohidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas de rato contra a inibição provavelmente como "scavengers" de radicais livres [SALVEMINI & BOTTING, 1993]. Como a glutatona não protege os grupos sulfidril contra a oxidação mas protege as atividades enzimáticas, este resultado sugere que os resíduos com grupamentos -SH não são importantes para as atividades enzimáticas sendo que a sua oxidação não é responsável pela inibição. Assim, provavelmente outros resíduos de aminoácidos que são essenciais para as funções da ATP difosfohidrolase e da 5'-nucleotidase foram modificados, ou ainda outro mecanismo desconhecido foi responsável pela inibição.

ATP difosfohidrolases e 5'-nucleotidasas têm sido descritas como sendo sensíveis aos radicais livres [MISHRA et alii, 1990; POELSTRA et alii, 1990; CANDINAS et alii, 1996; SIEGFRIED et alii, 1996; VIETTA et alii, 1996]. No sistema circulatório, sabe-se que o ADP é um nucleotídeo que induz agregação plaquetária [COLMAN, 1990] e que a ATP difosfohidrolase em conjunto com um 5'-nucleotidase é um importante mecanismo enzimático que degrada ADP até adenosina, um inibidor da agregação plaquetária [KITAKAZE, 1991]. Assim, sabe-se que a degradação de concentrações micromolares de nucleotídeos plasmáticos circulantes está envolvida na regulação da trombogênese [HOLMSEN & HOLMSEN, 1971; LUTJE et alii, 1988; COTÉ et alii, 1992]. A participação de atividades extracelulares que degradam o ADP com uma função antitrombótica, exercendo assim um mecanismo de proteção vascular, tem sido proposta em várias patologias sendo que a influência do dano por radicais livres a estas atividades enzimáticas é evidente. Em um trabalho realizado em ratos com glomerulonefrite experimental, radicais livres produzidos por neutrófilos ativados

reduziram a atividade ADPásica glomerular facilitando a formação de trombos plaquetários, o que indica segundo os autores, que a atividade ADPásica glomerular de rim de rato é sensível aos radicais livres e pode funcionar como um potente tromboregulador celular [POELSTRA et alii, 1990].

A agregação plaquetária com formação de microtrombos é uma das principais consequências da formação de radicais livres na micro-circulação cardíaca e cerebral [SALVEMINI & BOTTING, 1993]. Sendo assim, a inibição de atividades enzimáticas tromboreguladoras, capazes de degradar o ADP extracelular, pela formação de radicais livres provavelmente é um dos fatores que proporciona a formação de microtrombos em algumas doenças como a isquemia. Portanto, a alteração de atividades enzimáticas que degradam o ADP e que participam na formação de adenosina, como a ATP difosfoidrolase e a 5'-nucleotidase de plaquetas, deve ser um importante fator que induz a agregação plaquetária durante o processo de estresse oxidativo. Nesta condição, provavelmente estas enzimas estariam inibidas pela maior formação de radicais livres e a formação de microtrombos seria acentuada uma vez que a degradação de ADP e a formação de adenosina estariam prejudicadas.

Considerando a importância da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas na degradação do ADP até adenosina, tornou-se importante investigar o que poderia ocorrer com a atividade dessas enzimas em uma patologia onde há a formação de radicais livres e a agregação plaquetária. Sendo assim, uma mudança nestas atividades enzimáticas representaria um fator que poderia contribuir para o dano vascular em doenças como a isquemia e reperfusão [SOUTHORN & POWIS, 1988; HALLIWELL, 1993].

Atualmente, existem poucos dados na literatura sobre efeitos periféricos da isquemia e reperfusão cerebral mas sabe-se que pacientes com doenças isquêmicas

cerebrovasculares possuem ativação plaquetária na circulação [ISAKA et alii, 1989; TANAHASHI et alii, 1996]. Para os nossos estudos, utilizamos ratos com isquemia cerebral global transitória (*Capítulo 3 da tese*). A isquemia cerebral foi realizada pelo método de oclusão dos quatro vasos (carótidas e vertebrais) por 2 ou 10 minutos. Um grupo com duplo episódio isquêmico foi submetido a 10 minutos de isquemia 1 dia após 2 minutos de isquemia. Assim, este grupo sofreu 1 dia de reperfusão entre os episódios de 2 e 10 minutos de isquemia. Outros grupos de ratos também foram submetidos a 60 minutos, 1 ou 2 dias de reperfusão após o duplo episódio isquêmico. Grupos de ratos com um único episódio isquêmico de 2 minutos também foram submetidos a 60 minutos ou 1 dia de reperfusão. Além disso, grupos de ratos com 10 minutos de isquemia também foram submetidos a 60 minutos, 1, 2, 5, 10 ou 30 dias de reperfusão. Todos os grupos foram estatisticamente comparados com os grupos controle e “sham” (ratos que foram submetidos somente à cirurgia). O objetivo de aumentarmos o tempo de reperfusão para cada grupo era para analisarmos se as atividades enzimáticas haviam voltado aos níveis normais.

A atividade da ATP difosfoidrolase de plaquetas de ratos submetidos a 2 minutos de isquemia foi significativamente inibida enquanto que a atividade da 5'-nucleotidase foi ativada quando comparados ao controle. Quando os ratos foram submetidos a 10 minutos de isquemia, a atividade da ATP difosfoidrolase também foi inibida enquanto que a 5'-nucleotidase não foi alterada. As atividades dos grupos que sofreram 2 minutos de isquemia e 60 minutos ou 1 dia de reperfusão não foram diferentes do controle, indicando que a reperfusão após um episódio breve de isquemia induz um retorno das atividades aos níveis normais. Por outro lado, a atividade da ATP difosfoidrolase continuou inibida durante os tempos de reperfusão (60 minutos, 1, 2, 5, 10 ou 30 dias) após o episódio longo de isquemia (10 minutos). Com relação à 5'-

nucleotidase, 60 minutos ou 1 dia de reperfusão foram capazes de inibir a atividade quando comparados ao controle e após 10 minutos de isquemia sem reperfusão. Após 2 ou 5 dias de reperfusão a enzima foi ativada, voltando aos níveis normais após 10 ou 30 dias de reperfusão.

O episódio de 1 dia de reperfusão após 2 minutos de isquemia proporciona aos animais um pré-condicionamento ou uma tolerância induzida a outro episódio isquêmico longo de 10 minutos (2 + 10 minutos = episódio isquêmico duplo). Sabe-se que 10 minutos de isquemia cerebral transitória causa uma intensa morte celular na região CA₁ do hipocampo de ratos, enquanto que 2 minutos de isquemia não é lesivo. Entretanto, o episódio isquêmico duplo (pré-condicionamento) induz uma proteção de 50-60% contra a necrose celular quando comparado ao episódio isquêmico longo (10 minutos) [SCHETINGER et alii, 1994; SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991]. Após o duplo episódio isquêmico, a ATP difosfohidrolase e a 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos foram significativamente ativadas quando comparadas ao controle e ao grupo que foi submetido somente a 2 minutos de isquemia e 1 dia de reperfusão. Este resultado indica que provavelmente a hidrólise de ADP e a formação de adenosina por plaquetas estão aumentadas para promover uma inibição ou modulação da agregação plaquetária, o que não acontece quando estas atividades estão inibidas.

A proteção do pré-condicionamento sobre as atividades enzimáticas fica evidente quando compara-se o efeito da reperfusão em ratos que foram submetidos ao episódio isquêmico duplo com os que foram submetidos somente ao episódio longo de 10 minutos. No grupo que foi submetido ao episódio isquêmico duplo e 60 minutos de reperfusão as atividades foram inibidas quando comparadas aos grupos controle, mas logo após 2 dias de reperfusão as atividades voltaram aos níveis normais. Por outro lado, a atividade da ATP difosfohidrolase de ratos que foram submetidos a 10 minutos

de isquemia permaneceu inibida mesmo após 30 dias de reperfusão enquanto que a atividade da 5'-nucleotidase voltou ao nível normal somente depois de 10 dias de reperfusão. Estes dados sugerem que provavelmente o episódio isquêmico duplo (pré-condicionamento isquêmico) protege as atividades contra a alteração provocada por longos períodos de reperfusão, uma vez que esta proteção não acontece nos ratos submetidos a somente um episódio isquêmico longo (10 minutos) e longos períodos de reperfusão. Além disso, os resultados indicam que há um efeito periférico, demonstrado pela alteração das atividades enzimáticas de plaquetas que degradam nucleotídeos extracelulares, quando os processos de isquemia e reperfusão cerebral ocorrem.

A modificação de atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo extracelular de nucleotídeos no sistema nervoso também acontece durante a isquemia cerebral [SCHETINGER et alii, 1994]. Assim, o fato da isquemia cerebral induzir alterações periféricas em ecto-enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, como no sistema nervoso [SCHETINGER et alii, 1994], é um dos pontos mais importantes deste trabalho. A partir destes resultados nós podemos imaginar que talvez os mecanismos responsáveis pela modulação das atividades no sistema nervoso durante a isquemia [SCHETINGER et alii, 1994] sejam os mesmos que atuam em plaquetas. Além disso, o efeito periférico da isquemia cerebral poderia ser um marcador dos efeitos no sistema nervoso central. Considerando estas hipóteses, estudos posteriores serão necessários para explicar a modulação periférica destas atividades enzimáticas de plaquetas induzida pela isquemia cerebral, reperfusão e pré-condicionamento.

Na tentativa de investigar a causa da injúria periférica induzida pela isquemia cerebral sobre as atividades da ATP difosfohidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas e, por outro lado, a proteção pelo pré-condicionamento, surgiram as seguintes perguntas:

a) seria possível acontecer um estresse oxidativo periférico durante a isquemia

cerebral ?; b) a proteção pelo pré-condicionamento contra um possível estresse oxidativo também poderia acontecer a nível periférico ?; c) o estresse oxidativo periférico induzido pela isquemia cerebral e a proteção pelo pré-condicionamento estariam relacionados com a menor ou maior degradação de ADP e formação de adenosina, respectivamente, pela ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase de plaquetas ?.

Para tentar responder estas perguntas, foi analisada a quimioluminescência e o conteúdo de tióis do plasma de ratos isquêmicos e pré-condicionados (*Capítulo 4 da tese*). A análise de quimioluminescência é utilizada para expressar o processo de formação de radicais livres em sistemas biológicos. Além disso, é aplicada para detectar a existência de um estresse oxidativo associado a situações patológicas experimentais [LLESUY et alii, 1990]. O conteúdo de tióis do plasma foi analisado porque os grupos sulfidril de proteínas como a albumina têm sido propostos como sendo antioxidantes [HALLIWELL, 1988] e efetivos na redução da injúria causada pela isquemia e reperfusão [DAS & MAULIK, 1994]. Nos nossos resultados, o aumento da quimioluminescência do plasma de ratos submetidos a 2 ou 10 minutos de isquemia, quando comparada estatisticamente aos grupos controle e sham, indica a presença de radicais livres e provavelmente um estresse oxidativo periférico quando a isquemia cerebral acontece. Por outro lado, 60 minutos ou 1 dia de reperfusão após 2 minutos de isquemia induz um retorno da quimioluminescência plasmática aos níveis normais. Da mesma maneira, a quimioluminescência plasmática de ratos que foram submetidos a 10 minutos de isquemia volta aos níveis do controle após 5 dias de reperfusão.

A medida do conteúdo de grupos sulfidril plasmáticos mostra que durante a reperfusão após 2 ou 10 minutos de isquemia há uma depleção de tióis associada à diminuição da quimioluminescência. Este resultado sugere que provavelmente a

reperfusão está relacionada ao consumo de tióis e conseqüentemente ao retorno da emissão de quimioluminescência aos níveis normais uma vez que os tióis plasmáticos, a maioria associados à albumina, são descritos como antioxidantes [HALLIWELL, 1988]. A depleção de tióis plasmáticos também acontece durante a reperfusão após o fenômeno de pré-condicionamento isquêmico (episódio isquêmico duplo = 2+10 minutos). Quando analisamos a emissão de quimioluminescência, dois minutos de isquemia seguidos de 1 dia de reperfusão é capaz de proteger o plasma contra o possível estresse oxidativo periférico provocado por 10 minutos de isquemia e pela reperfusão. Assim, parece que o pré-condicionamento isquêmico cerebral além de proteger o sistema nervoso central contra o dano neuronal de um episódio isquêmico longo e da reperfusão [KITIGAWA, 1990; RESHEF et alii, 1996], também evita o dano oxidativo plasmático como foi demonstrado com os dados da medida de quimioluminescência. Além disso, provavelmente o consumo de tióis como antioxidantes plasmáticos é realmente importante para manter a quimioluminescência plasmática nos níveis normais também durante o pré-condicionamento uma vez que houve uma diminuição significativa da concentração de grupos sulfidril após 2 minutos de isquemia seguidos de 1 dia de reperfusão, o tempo necessário para ocorrer a proteção contra a injúria dos 10 minutos de isquemia posteriores.

Entre os antioxidantes plasmáticos, a albumina tem sido considerada um dos mais importantes porque além de possuir grupos sulfidril associados à sua estrutura, está em alta concentração na circulação e tem um "turnover" rápido. Por este motivo, é denominada de antioxidante de sacrifício, ou seja, é oxidada ou sacrificada para preservar estruturas mais nobres (proteínas, anticorpos...) [HALLIWELL, 1988]. Desta maneira, provavelmente os tióis plasmáticos (albumina na sua maioria) reagem com

radicais livres durante a reperfusão levando à sua própria oxidação mas com isso protegem o plasma contra um dano oxidativo maior.

Entre os efeitos periféricos da doença cerebrovascular isquêmica, e que certamente tem a contribuição dos radicais livres, é a ativação plaquetária [ISAKA et alii, 1989; TANAHASHI et alii, 1996]. Sabe-se que os radicais livres estimulam a resposta de agregação de plaquetas enquanto que antioxidantes regulam a função plaquetária [SALVEMINI & BOTTING, 1993]. Relacionando a trombogênese pós-isquêmica citada acima com o estresse oxidativo periférico (*Capítulo 4 da tese*) e a alteração das atividades da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas pela isquemia cerebral (*Capítulo 3 da tese*), é possível sugerir que a inibição da hidrólise de ADP no microambiente de plaquetas durante episódios isquêmicos em função do estresse oxidativo periférico poderia contribuir para a trombogênese mesmo quando a adenosina é produzida pela 5'-nucleotidase. Se observarmos o efeito periférico do pré-condicionamento isquêmico, podemos constatar que além de proteger o tecido neuronal contra a injúria de um episódio longo de isquemia [KITIGAWA, 1990; RESHEF et alii, 1996] também evita o aumento da quimioluminescência plasmática e induz um aumento significativo das atividades de hidrólise de ADP e formação de adenosina por plaquetas. Estes resultados podem ser muito importantes porque indicam que em função do pré-condicionamento isquêmico cerebral e, conseqüentemente, pela proteção contra um possível estresse oxidativo periférico, as atividades da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas são moduladas para degradar mais ADP e produzir mais adenosina, contribuindo provavelmente como fatores anti-trombogênicos.

Algumas hipóteses relacionadas à alteração ou modulação das atividades da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase podem ser discutidas. Analisando os

resultados dos experimentos (*Capítulo 3 da tese*) em que os ratos foram submetidos a episódios de isquemia e reperfusão até 7 dias, pode-se concluir que alterações de síntese das enzimas nos megacariócitos não foram responsáveis pela modificação das atividades enzimáticas uma vez que o "turnover" de plaquetas é de 7 dias. Por outro lado, parece que as atividades da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase são realmente moduladas sendo que este efeito depende do tempo do episódio isquêmico e da reperfusão. Assim, o comportamento das enzimas frente a 2 minutos de isquemia e 60 minutos ou 1 dia de reperfusão é muito diferente quando compara-se com os resultados de 10 minutos de isquemia seguidos de até 30 dias de reperfusão. Para a ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase, a alteração das atividades durante 2 minutos de isquemia parece ser reversível com a reperfusão. Após 10 minutos de isquemia, a reperfusão de até 30 dias mostra que a inibição da ATP difosfoidrolase provavelmente é irreversível. A partir deste resultado pode-se sugerir que ocorreu uma alteração da síntese da enzima nos megacariócitos uma vez que mesmo após 7 dias de reperfusão a atividade permaneceu inibida. Por outro lado, se a atividade enzimática continua modificada mesmo depois da síntese da nova proteína, também pode-se concluir que talvez tenha ocorrido mudanças nas características do sítio ativo ou na conformação da enzima em resposta a alterações no microambiente plaquetário após vários dias de reperfusão.

Com relação à 5'-nucleotidase, a reperfusão de até 5 dias induziu a enzima a diferentes respostas. O mesmo ocorreu durante a reperfusão após o pré-condicionamento isquêmico para as duas atividades enzimáticas. Quando compara-se os resultados da reperfusão após 2 ou 10 minutos de isquemia ou após o pré-condicionamento, podemos observar que realmente é o tipo de episódio isquêmico (se provoca injúria celular ou não) que determina se a modificação das atividades

enzimáticas é reversível ou irreversível, ou ainda determina quanto tempo de reperfusão é necessário para a normalização das atividades.

Estudos relacionados com a ecto-5'-nucleotidase de coração têm demonstrado que esta enzima é ativada durante o pré-condicionamento isquêmico cardíaco. Assim, a proteção pelo pré-condicionamento contra uma injúria mais intensa é atribuída à atividade de uma proteína quinase C que fosforila e ativa a ecto-5'-nucleotidase produzindo mais adenosina [NODE et alii, 1997]. Com estes estudos de NODE et alii, podemos imaginar que talvez a ATP difosfohidrolase e a 5'-nucleotidase de plaquetas também sejam covalentemente modificadas durante o pré-condicionamento cerebral. Certamente estudos futuros irão mostrar como é a modulação destas enzimas durante a isquemia e o pré-condicionamento cerebral ou ainda se há uma modificação da síntese enzimática nos megacariócitos.

VII. CONCLUSÕES GERAIS

1. O sistema gerador de radicais livres inibiu as atividades da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos enquanto que a glutathiona e a cisteína protegeram estas atividades contra a inibição. A peroxidação lipídica e a oxidação de grupos sulfidril não foram responsáveis pela inibição das enzimas.

2. A isquemia cerebral global transitória e a reperfusão alteraram a atividade da ATP difosfoidrolase de plaquetas de ratos. Houve diminuição na atividade da ATP difosfoidrolase de plaquetas de animais submetidos a 2 ou 10 minutos de isquemia. Por outro lado, a atividade não foi diferente do controle quando os animais foram submetidos à reperfusão após 2 minutos de isquemia. A inibição da atividade após 10 minutos de isquemia foi mantida até 30 dias de reperfusão.

3. A isquemia cerebral global transitória e a reperfusão também alteraram a atividade da 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos. Houve um aumento na atividade após 2 minutos de isquemia, enquanto que o episódio isquêmico de 10 minutos não mostrou nenhum efeito. A atividade não foi diferente do controle quando os animais foram submetidos à reperfusão após 2 minutos de isquemia. Entretanto, a resposta da enzima aos tempos de reperfusão após 10 minutos de isquemia foi variada sendo que a atividade somente voltou aos níveis normais após 10 dias de reperfusão. Sendo assim, após 60 minutos ou 1 dia de reperfusão houve uma inibição da atividade da 5'-nucleotidase enquanto que após 2 ou 5 dias de reperfusão houve um aumento da atividade.

4. O episódio duplo de isquemia cerebral (2 + 10 minutos = pré-condicionamento) e a reperfusão alteraram as atividades da ATP difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase de plaquetas de ratos. Houve um aumento das atividades após o pré-condicionamento. Por outro lado, a reperfusão de 60 minutos após o pré-condicionamento inibiu as atividades quando comparadas ao controle. Houve um aumento da atividade ATPásica da ATP difosfoidrolase após 1 dia de reperfusão. Após 2 dias de reperfusão, esta atividade não foi diferente do controle. A atividade ADPásica da ATP difosfoidrolase e a 5'-nucleotidase não estavam alteradas após 1 dia de reperfusão.

Assim, houve um aumento pelo pré-condicionamento isquêmico cerebral da atividade de degradação de nucleotídeos extracelulares por plaquetas, e provavelmente da produção de adenosina. Além disso, o pré-condicionamento protegeu as atividades enzimáticas contra o efeito dos 10 minutos de isquemia e da reperfusão.

5. A isquemia cerebral global transitória alterou a quimioluminescência do plasma de ratos. Houve um aumento da quimioluminescência após 2 ou 10 minutos de isquemia. Durante a reperfusão após 2 minutos de isquemia, a quimioluminescência não foi diferente do controle. Por outro lado, o aumento da quimioluminescência após 10 minutos de isquemia foi mantido até 1 dia de reperfusão.

6. O episódio duplo de isquemia cerebral (2 + 10 minutos = pré-condicionamento) não alterou a quimioluminescência do plasma de ratos. Portanto, o pré-condicionamento evitou o estresse oxidativo periférico associado à isquemia cerebral em ratos.

7. A isquemia cerebral global transitória de 2 ou 10 minutos não alterou a concentração de tióis plasmáticos. Entretanto, a reperfusão após 2 minutos de isquemia diminuiu a concentração de tióis no plasma. A reperfusão de até 10 dias após 10 minutos de isquemia também diminuiu a concentração de tióis plasmáticos, sendo que não houve diferença após 30 dias de reperfusão quando comparado ao controle.

8. O episódio duplo de isquemia cerebral (2 + 10 minutos = pré-condicionamento) não alterou a concentração de tióis no plasma. A reperfusão de até dois dias após o pré-condicionamento diminuiu a concentração de tióis.

9. A diminuição da concentração de tióis plasmáticos está associada à reperfusão e à manutenção da quimioluminescência nos níveis normais.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO, M. P.; CERUTI, S.; BARBIERI, D.; FRANCESCHI, C.; MALORNI, W.; BIONDO, L.; BURNSTOCK, G.; CATTABENI, F. A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213: 908-915, 1995.
- AGARDH, C. D.; ZHANG, H.; SMITH, M. L.; SIESJÖ, B. L. Free radical production and ischemic brain damage: influence of post-ischemic oxygen tension. *Int. J. Develop. Neurosci.*, 9: 127-138, 1991.
- BARCELLOS, C. K.; SCHETINGER, M. R. C.; BATTASTINI, A. M. O.; SILVA, L. B.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Inhibitory effect of cadmium acetate on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) from adult rat cerebral cortex. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27: 1111-1115, 1994.
- BATTASTINI, A. M. O.; OLIVEIRA, E. M.; MOREIRA, C. M.; BONAN, C. D.; SARKIS, J. J. F.; DIAS, R. D. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 37: 209-219, 1995.
- BATTASTINI, A. M. O.; ROCHA, J. B. T.; BARCELLOS, C. K.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.*, 16: 1303- 1310, 1991.
- BONAN, C. D.; BATTASTINI, A. M. O.; SCHETINGER, M. R. C.; MOREIRA, C. M.; FRASSETTO, S. S.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Effects of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) on ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) and 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) from rat brain synaptosomes. *Gen. Pharmac.*, 28: 761-766, 1997.
- BROMONT, C.; MARIE, C.; BRALET, J. Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke*, 20: 918-924, 1989.
- CANDINAS, D.; KOYAMADA, N.; MIYATAKE, T.; SIEGEL, J.; HANCOCK, W. W.; BACH, F. H.; ROBSON, S. C. Loss of rat glomerular ATP diphosphohydrolase activity during reperfusion injury is associated with oxidative stress reactions. *Thromb. Haemostas.*, 76: 807-812, 1996.
- CHAVKO, M.; NEMOTO, E. M. Regional differences in rat brain lipids during global ischemia. *Stroke*, 23: 1000-1004, 1992.
- CLARK, E. A.; BRUGGE, J. S. Tyrosine phosphorylation in platelets. Potential role in intracellular signal transduction. *Trends. Cardiovasc. Med.*, 3: 218-227, 1993.
- COLMAN, R. W. Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation. *FASEB J.*, 4: 1425-1435, 1990.

- COTÉ, Y. C.; FILEP, J. G.; BATTISTINI, B.; GAUVREAU, J.; SIROIS, P.; BEAUDOIN, A. R. Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovine aorta: evidence for a regulatory role in platelet activation in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1139: 133-142, 1992.
- CRISTALLI, G.; MILLS, D. C. Identification of a receptor for ADP on blood platelets by photoaffinity labelling. *Biochem. J.*, 291: 875-881, 1993.
- CRONSTEIN, B. N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.*, 76:5-13, 1994.
- CRONSTEIN, B. N.; LEVIN, R. I.; BELANOFF, J.; WEISSMANN, G.; HIRSCHHORN, R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 78: 760-770, 1986.
- DARLEY-USMAR, V.; HALLIWELL, B. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmaceut. Res.*, 13: 649-661, 1996.
- DARVISH, A.; POMERANTZ, R. W.; ZOGRAFIDES, P. G.; METTING, P. J. Contribution of cytosolic and membrane-bound 5'-nucleotidases to cardiac adenosine production. *Am. J. Physiol.*, 271: H2162-H2167, 1996.
- DAS, D. K.; MAULIK, N. Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol.*, 233: 601-610, 1994.
- DEL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.*, 492: 153-167, 1980.
- DEL PRINCIPE, D.; MENICHELLI, A.; DE MATTEIS, W.; Di CORPO, M. L.; Di GIULIO, S.; FINAZZI-AGRÒ, A. Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. *FEBS Lett.*, 185: 142-146, 1985.
- DI MARCO, J.; SELLER, D. T.; LERMAN, B. B. Diagnostic and therapeutic use of adenosine in patients with supraventricular tachyarrhythmias. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 6: 417-425, 1985.
- DOBSON, J. G.; FENTON, R. A.; ROMANO, F. D. The antiadrenergic actions of adenosine in the heart. In: *Topic and Perspectives in Adenosine Research*. ed. by E. Gerlach; B. F. Becker. Berlin, Springer, 1987.
- DOLPHIN, A. C.; ARCHER, E. R. An adenosine agonist inhibits and a cyclic AMP analogue enhances the release of glutamate, but not GABA from slices of rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.*, 43: 49, 1983.
- DRURY, A. N.; SZENT-GYORGI, A. The physiological activity of adenosine compounds with special reference to their actions upon the mammalian heart. *J. Physiol. (London)*, 68: 213-237, 1929.
- DUNWIDDIE, T. V. Endogenously released adenosine regulates excitability in vitro hippocampus. *Epilepsia*, 21: 541-548, 1980.

- ELY, S. W.; BERNE, R. M. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation*, 85: 893-904, 1992.
- ENGLER, R. L. Adenosine. The signal of life? *Circulation* 84: 951-954, 1991.
- ENGLER, R. L.; DAHLGREN, M. A.; MORRIS, D. D.; PETERSON, M. A.; SCHMID-SCHOENBEIN, G. W. Role of leucocytes in the response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am. J. Physiol.*, 251: H314-H323, 1986.
- EVANS, R. J.; DERKACH, V.; SURPRENANT, A. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*, 357: 503-505, 1992.
- FAROOQUI, A. Q.; HAUN, S. E.; HORROCKS, L. A. Ischemia and hypoxia. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. ed. by G. J. Siegel. Raven Press Ltd, New York, 1994.
- FRASSETTO, S. S. Adenosine: a protective nucleoside in cardiac and cerebral injuries. *Ciência e Cultura J. Braz. Assoc. Adv. Sci.*, 47: 218-220, 1995.
- FRASSETTO, S. S.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol. Cell. Biochem.*, 129: 47-55, 1993.
- FRASSETTO, S. S.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Free radical-induced inhibition of ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 41: 161-168, 1997.
- FRASSETTO, S. S.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP and ADP of the ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 35: 499-506, 1995.
- GAARDER, A.; JONSEN, J.; LALAND, S.; HELLEM, A.; OWREN, P. A. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in adhesiveness of human platelets. *Nature (London)*192: 531-532, 1961.
- GACHET, C.; HECHLER, B.; LÉON, C.; VIAL, C.; OHLMANN, P.; CAZENAVE, J. P. Purinergic receptors on blood platelets. *Platelets*, 7: 261-267, 1996.
- GACHET, C.; SAVI, P.; OHLMANN, P.; MAFFRAND, J. P.; JAKOBS, K. H.; CAZENAVE, J. P. ADP receptor-induced activation of guanine nucleotide binding proteins in rat platelet membranes. An effect selectively blocked by the thienopyridine clopidogrel. *Thromb. Haemost.*, 68: 79-83, 1992.
- GATTI, R. M.; RADU, R.; AUGUSTO, O. Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. *FEBS Lett.*, 348: 287-290, 1994.
- GLOBUS, M. Y-T.; BUSTO, R.; LIN, B.; SCHNIPPERING, H.; GINSBERG, M. D. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intras ischemic brain temperature modulation. *J. Neurochem.*, 65: 1250-1256, 1995.

- GLOBUS, M. Y-T.; BUSTO, R.; LIN, B.; SCHNIPPERING, H.; GINSBERG, M. D. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intraischemic brain temperature modulation. *J. Neurochem.*, 65: 1250-1256, 1995.
- GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium derived vascular relaxing factor. *Nature*, 320: 454-456, 1986.
- HALL, E. D. Cerebral ischaemia, free radicals and antioxidant protection. *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 334-339, 1993.
- HALLIWELL, B. Albumin - an important extracellular antioxidant ? *Biochem. Pharmacol.*, 37: 569-571, 1988.
- HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 49: 1341-1348, 1995.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 59: 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91 (sup 3C): 14S-22S, 1991.
- HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, 23(suppl. 1): 118-126, 1993.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57: 715S-725S, 1993.
- HARDEN, T. K.; BOYER, J. L.; NICHOLAS, R. A. P₂-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 541-579, 1995.
- HEEMSKERK, J. W. M.; SAGE, S. O. Calcium signalling in platelets and other cells. *Platelets* 5: 295-316, 1994.
- HOLMSEN, H. Activation of human platelets in vitro. *Platelets* 7: 336-341, 1996.
- HOLMSEN, I.; HOLMSEN, H. Partial purification and characterization of an ADP phosphohydrolase from human plasma. *Thromb. Diathes. Haemorrhag.*, 26: 177-191, 1971.
- HOURANI, S. M. O.; CUSACK, N. J. Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacol. Rev.* 43: 243-298, 1991.
- HOURANI, S. M. O.; HALL, D. A. Receptors for ADP on human blood platelets. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 103-108, 1994.

- HUNTER, A. J.; GREEN, A. R.; CROSS, A. J. Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *TIPS*, 16: 123-128, 1995.
- IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *TINS*, 20: 132-139, 1997.
- ISAKA, Y.; KIMURA, K.; UEHARA, A.; HASHIKAWA, K.; MIENO, M.; MATSUMOTO, M.; HANDA, N.; NAKABAYASHI, S.; IMAIZUMI, M.; KAMADA, T. Platelet aggregability and in vivo platelet deposition in patients with ischemic cerebrovascular disease. Evaluation by Indium-111-platelet scintigraphy. *Thromb. Res.*, 56: 739, 1989.
- IULIANO, L.; COLAVITA, A. R.; LEO, R.; PRATICÒ, D.; VIOLI, F. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Rad. Biol. Med.*, 22: 999-1006, 1997.
- IULIANO, L.; PEDERSEN, J. Z.; PRATICÒ, D.; ROTILIO, G.; VIOLI, F. Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur. J. Biochem.*, 221: 695-704, 1994.
- IULIANO, L.; PRATICÒ, D.; BONAVITA, M. S.; VIOLI, F. Involvement of phospholipase A₂ in H₂O₂-dependent platelet aggregation. *Platelets*, 2: 87-90, 1992.
- JOO, F.; CHEVY, F.; COLARD, O.; WOLF, C. The activation of rat platelets increases the exposure of polyunsaturated fatty acid enriched phospholipids on the external leaflet of the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1149: 231-240, 1993.
- KACZMAREK, E.; KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; SIEGEL, J. B.; ANRATHER, J.; BEAUDOIN, A. R.; BACH, F. H.; ROBSON, S. C. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.*, 271: 33116-33122, 1996.
- KETTLUN, A. M.; LEYTON, M.; VALENZUELA, M. A.; MANCILLA, M.; TRAVERSO-CORI, A. Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, 31: 1889-1894, 1992.
- KINOUCI, H.; EPSTEIN, C. J.; MIZUI, T.; CARLSON, E.; CHEN, S. F.; CHAN, P. H. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:11158-11162, 1991.
- KIRINO, T.; TSUJITA, Y.; TAMURA, A. Induced tolerance in gerbil hippocampal neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 11: 299-307, 1991.
- KITAKAZE, M.; HORI, M.; SATO, H.; TAKASHIMA, S.; INOUE, M.; KITABATAKE, A.; KAMADA, T. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. *Circ. Res.*, 69: 1402-1408, 1991.
- KITAKAZE, M.; NODE, K.; MINAMINO, T.; KOMAMURA, K.; FUNAYA, H.; SHINOZAKI, Y.; CHUJO, M.; MORI, H.; INOUE, M.; HORI, M.; KAMADA, T. Role of activation of protein kinase C in the infact size-limiting effect of ischemic preconditioning through activation of ecto-5'-nucleotidase. *Circulation*, 93: 781-796, 1996b.
- KITIGAWA, K.; MATSUMOTO, M.; TAGAYA, M.; HATA, R.; UEDA, H.; NIINOBE, M.; HANDA, N.; FUKUNAGA, R.; KIMURA, K.; MIKOSHIBA, K.; KAMADA, T. "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. *Brain Res.*, 528: 21-24, 1990.

- KNOWLES, A. F.; ISLER, R. E.; REECE, J. F. The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 731: 88-96, 1983.
- KOMOSZYNSKI, M. A. Apyrases - enzymes involved in the control of nucleotides level in cells and tissues. *Adv. Biochem.*, 40: 174-180, 1994.
- KOMOSZYNSKI, M. A.; WOJTCZAK, A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1310: 233-241, 1996.
- KRISTIÁN, T.; SIESJÖ, B. K. Calcium-related damage in ischemia. *Life Sci.*, 59: 357-367, 1996.
- KULLER, L.H.; EICHNER, J. E.; ORCHARD, T. J.; GRANDITS, G. A.; Mc CALLUM, L.; TRACY, R. P. The relation between serum albumin levels and risk of coronary heart disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am. J. Epidemiol.*, 134: 1266-1277, 1991.
- KUMURA, E.; KOSAKA, H.; SHIGA, T.; YOSHIMINE, T.; HAYAKAWA, T. Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 14: 487-491, 1994.
- KUMURA, E.; YOSHIMINE, T.; IWATSUKI, K-I.; YAMANAKA, K.; TANAKA, S.; HAYAKAWA, T.; SHIGA, T.; KOSAKA, H. Generation of nitric oxide and superoxide during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Am. J. Physiol.*, 270: C 748-C752, 1996.
- KÜNZEL, J. K.; ZEE, J.; IJZERMANN, A. P. Radical scavenging properties of adenosine and derivatives *in vitro*. *Drug. Develop. Res.*, 37: 48-54, 1996.
- LANDER, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.*, 11: 118-124, 1997.
- LEBEL, D.; POIRIER, G. G.; PHANEUF, S.; ST-JEAN, P.; LALIBERTE, J. F.; BEAUDOIN, A. R. Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. *J. Biol. Chem.*, 255: 1227-1233, 1980.
- LEGRAND, C.; WOIMANT, F.; HAGUENAU, M.; CAEN, J. Platelet surface glycoprotein changes in patients with cerebral ischemia. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 33: 497-500, 1991.
- LI, J-M.; FENTON, R. A.; CUTLER, B. S.; DOBSON, J. G. Adenosine enhances nitric oxide production by vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 269: C519-C523, 1995.
- LINDSBERG, P.; HALLENBECK, J. M.; FEUERSTEIN, G. Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann. Neurol.* 30: 117-129, 1991.

- LIU, G. S.; THORNTON, J.; VAN WINKLE, D. M.; STANLEY, A. W. H.; OLSSON, R. A.; DOWNEY, J. M. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, 84: 350-356, 1991.
- LLESUY, S.; MILEI, J.; GONZALEZ FLECHA, B.; BOVERIS, A. Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. *J. Free Rad. Biol. Med.*, 8: 259-264, 1990.
- LOSANO, G.; GATTULLO, D.; PAGLIARO, P. Myocardial, neural and vascular aspects of ischemic preconditioning. *Life Sci.*, 59: 1185-1192, 1996.
- LUTHJE, J.; SCHOMBURG, A.; OGILVIE, A. Demonstration of a novel ecto-enzyme on human erythrocytes, capable of degrading ADP and of inhibiting ADP-induced platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.*, 175: 285-289, 1988.
- LYNDEN, J. P. Purinergic system. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. ed. by G. J. Siegel et al.; Raven Press, New York, 1994.
- MACKENZIE, A. B.; MAHAUT-SMITH, M. P.; SAGE, S. O. Activation of receptor-operated channels via P_{2X1} and P_{2T} purinoceptors in human platelets. *J. Biol. Chem.*, 271: 2879-2881, 1996.
- MAGNMUSSON, B. C.; HEYDEN, G.; SVENNISON, S. E. Histochemical observations on 5'-nucleotidase activity in squamous cell carcinomas of the rat. *Histochemistry*, 42: 1-8, 1974.
- MARANGOS, P. J.; LUBITZ, D.; DAVAL J-L.; DECKERT, J. In: *Current and Future Trends in Anticonvulsant, Anxiety, and Stroke Therapy*. ed. by B. S. Meldrum; M. Williams, Wiley-Liss, New York, 1990.
- MARCUS, A. J.; SILK, S. T.; SAFIER, L. B.; ULLMANN, H. L. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J. Clin. Invest.*, 59: 149-158, 1977.
- MARTIN, P. L.; LLOYD, H. G. E.; COWAN, A. I. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *TINS*, 17: 251-257, 1994.
- MATSUO, Y.; KIHARA, T.; IKEDA, M.; NINOMIYA, M.; ONODERA, H.; KOGURE, K. Role of platelet-activating factor and thromboxane A₂ in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain. *Brain Res.*, 709: 296-302, 1996.
- MEGHLI, P.; TUTTLE, J. B.; RUBIO, R. Adenosine formation and release by embryonic chick neurons and glia in cell culture. *J. Neurochem.*, 53: 1852-1861, 1989.
- MEYERHOF, O. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.*, 157: 105-109, 1945.
- MISHRA, O. P.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; CAHILLANE, G.; WAGERLE, L. C. Lipid peroxidation as the mechanism of modification of the affinity of the Na⁺, K⁺-ATPase active sites for ATP, K⁺, Na⁺, and Strophanthidin *in vitro*. *Neurochem. Res.*, 14: 845-851, 1989.

- MISHRA, O. P.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; CAHILLANE, G.; WAGERLE, L. C. Lipid peroxidation as the mechanism of modification of brain 5'-nucleotidase activity *in vitro*. *Neurochem. Res.*, 15: 237-242, 1990.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43: 109-142, 1991.
- MÜLLER, J.; ROCHA, J. B.T.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F.; DIAS, R. D. Postnatal development of ATPase-ADPase activities in synaptosome fraction from cerebral cortex of rats. *Neurochem. Int.*, 23: 935-939, 1990.
- MURGO, A. J.; CONTRERA, J. G.; SISTARE, F. D. Evidence for separate calcium signaling P_{2T} and P_{2U} purinoceptors in human megakaryocytic Dami cells. *Blood*, 83: 1258-1267, 1994.
- MURGO, A. J.; SISTARE, F. D. k562 leukemia cells express P_{2T} adenosine diphosphate purinergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261: 580-585, 1992.
- MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74: 1124-1136, 1986.
- NISHIO, H.; TAKESHITA, K.; OKUGAWA, K.; SEGAWA, T. Effect of concanavalin A on 5'-nucleotidase activity of rabbit blood platelets. *Japan. J. Pharmacol.*, 43: 230-233, 1987.
- NODE, K.; KITAKAZE, M.; MINAMINO, T.; TADA, M.; INOUE, M.; HORI, M.; KAMADA, T. Activation of ecto-5'-nucleotidase by protein kinase C and its role in ischaemic tolerance in the canine heart. *Brit. J. Pharmacol.*, 120: 273-281, 1997.
- OHLMANN, P.; LAUGWITZ, K.; NÜRNBERG, B.; SPICHER, K.; SCHULTZ, G.; CAZENAVE, J.; GACHET, C. The human platelet ADP receptor activates G_{i2} proteins. *Biochem. J.*, 312: 775-779, 1992.
- OLAH, M. E.; STILES, G. L. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 581-606, 1995.
- OLIVEIRA, E. M.; BATTASTINI, A. M. O.; MEIRELLES, M. N. L.; MOREIRA, C. M.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarcolemmal membrane from rat heart. *Mol. Cell. Biochem.*, 170: 115-123, 1997.
- OLIVEIRA, E. M.; ROCHA, J. B.; SARKIS, J. J. F. *In vitro* and *in vivo* effects of $HgCl_2$ on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.*, 102: 251-254, 1994.
- ORFORD, M. R.; SAGGERSON, E. D. A low- K_m 5'-nucleotidase from rat brain cytosolic fraction: purification, kinetic properties, and description of regulation by a novel factor that increases sensitivity to inhibition by ATP and ADP. *J. Neurochem.*, 67: 795-804, 1996.

- PÉREZ-PINZÓN, M. A.; LUTZ, P. L.; SICK, T. J.; ROSENTHAL, M. Adenosine, a "retaliatory" metabolite, promotes anoxia tolerance in turtle brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 13: 728-732, 1993.
- PHILLIPS, A. N.; SHAPER, A. G.; WHINCUP, P. H. Association between serum albumin and mortality from cardiovascular disease, cancer and other causes. *Lancet*, II: 1434-1436, 1989.
- PHILLIS, J. W. Adenosine in the control of the cerebral circulation. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1: 26-54, 1989.
- PHILLIS, J. W. The effects of selective A₁ and A_{2a} adenosine receptor antagonists on cerebral ischemic injury in the gerbil. *Brain Res.*, 705: 79-84, 1995.
- PHILLIS, J. W.; O'REGAN, M. H. Mechanisms of glutamate and aspartate release in the ischemic rat cerebral cortex. *Brain Res.*, 730: 150-164, 1996.
- PHILLIS, J. W.; WU, P. H. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.*, 16: 187-239, 1981.
- PIANTADOSI, C. A.; ZHANG, J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke*, 27: 327-332, 1996.
- PICHER, M.; COTÉ, Y. P.; BÉLIVEAU, R.; POTIER, M.; BEAUDOIN, A. R. Demonstration of a novel type ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in the bovine lung. *J. Biol. Chem.*, 268: 4699-4703, 1993.
- PIEBER, M.; VALENZUELA, M. A.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; ARANDA, E.; COLLADOS, L.; TRAVERSO-CORI, A. ATPase-ADPase activities of rat placental tissue. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B: 281-285, 1991.
- PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S. S.; BATTASTINI, A. M. O.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets*, 7: 225-230, 1996.
- POELSTRA, K.; HARDONK, M. J.; KOUDSTAAL, J.; BAKKER, W. W. Intraglomerular platelet aggregation and experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 37: 1500-1508, 1990.
- PORCELLATI, S.; GRESELE, P.; STASI, M. et alli. Albumin prevents TXB₂ formation from thrombin-stimulated human platelets by sequestering the liberated arachidonic acid in the extracellular space. *Platelets*, 6: 381-387, 1995.
- PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B.; PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals Neurol.*, 11: 491-498, 1982.
- PULSINELLI, W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet*, 339: 533-536, 1992.
- RAMKUMAR, V.; NIE, Z.; RYBAK, L. P.; MAGGIRWAR, S. B. Adenosine, antioxidant enzymes and cytoprotection. *TIPS*, 16: 283-285, 1995.

- RESHEF, A.; SPERLING, O.; ZOREF-SHANI, E. Preconditioning of primary rat neuronal cultures against ischemic injury: characterization of the "time window of protection". *Brain Res.*, 741: 252-257, 1996.
- RIBEIRO, J. M. C.; ENDRIS, T. M.; ENDRIS, R. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A: 109-112, 1991.
- RIBEIRO, J. M. C.; GARCIA, E. S. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 26: 303-307, 1980.
- RIBEIRO, J. M. C.; MODI, G. B.; TESH, R. B. Salivary apyrase activity of some old world phlebotomine sand flies. *Insect Biochem.*, 19: 409-412, 1989.
- RIBEIRO, J. M. C.; SARKIS, J. J. F.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B: 81-86, 1984.
- RIBEIRO, J. M. C.; VAUGHAN, J.; AZAD, A. F. Characterization of the salivary apyrase activity of three rodent flea species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B: 215-219, 1990.
- ROCHA, J. B. T.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F.; DIAS, R. D. Effects of chronic treatment with high doses of chlorpromazine on ATP and ADP hydrolysis by synaptosomal fraction from the rat caudate nucleus. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 23: 969-973, 1990a.
- ROCHA, J. B. T.; MELLO, C. F.; SARKIS, J. J. F.; DIAS, R. D. Undernutrition during the preweaning period changes calcium ATPase and ADPase activities of synaptosomal fractions of weaning rats. *British J. Nutr.*, 63: 273-284, 1990b.
- ROHN, T. T.; HINDS, T. R.; VINCENZI, F. F. Ion transport ATPases as targets for free radical damage. *Biochem. Pharmacol.*, 46: 525-534, 1993.
- ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: *Membrane lipid oxidation*. ed. by C. Vigo-Pelfrey. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991.
- ROY, R. S.; McCORD, J. M. Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In: *Oxy-radicals and their Scavenger Systems, Cellular and Molecular Aspects*. ed. by R. Greenwald; G. Cohen. Elsevier, New York, 1983.
- RUDOLPHI, K. A.; SCHUBERT, P.; PARKINSON, F. E.; FREDHOLM, B. B. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischemia. *TIPS*, 13:439-445, 1992b.
- SALVEMINI, D.; BOTTING, R. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *Trends Pharmacol. Sci.*, 14: 36-42, 1993.

- SANIABADI, A. R.; LOWE, G. D. O.; MADHOK, R.; SPOTWART, K.; SHAW, B.; BARBENEL, J. C.; FORBES, C. D. Red blood cells mediate spontaneous aggregation of platelets in whole blood. *Atherosclerosis*, 66: 175-180, 1987.
- SARKIS, J. J. F.; BONAN, C. D.; FRASSETTO, S. S.; PILLA, C.; BATTASTINI, A. M. O.; DIAS, R. S. ATP diphosphohydrolase: a possible relation of this enzyme with Alzheimer's disease and thrombosis. In: *Ecto-ATPases. Recent Progress on Structure and Function*. ed. by L. Plesner; T. L. Kirley; A. F. Knowles. Plenum Press, New York, 1997.
- SARKIS, J. J. F.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*: kinetics and purification. *Biochem. J.*, 233: 885-891, 1986.
- SCHADECK, R. J. G.; SARKIS, J. J. F.; DIAS, R. D.; ARAÚJO, H. M.; SOUZA, D. O. G. Synaptosomal apyrase in the hypothalamus of adult rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22: 303-314, 1989.
- SCHETINGER, M. R. C.; BARCELLOS, C. K.; BARLEM, A.; ZWETSCH, G.; GUBERT, A.; BERTUOL, C.; ARTENI, N.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F.; NETTO, C. A. Activity of synaptosomal ATP diphosphohydrolase from hippocampus of rats tolerant to forebrain ischemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27: 1123-1128, 1994.
- SCHETINGER, M. R. C.; WYSE, A. T.; SILVA, L. B.; BARCELLOS, C. K.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Effect of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5). *Biol. Trace Elem. Res.*, 50: 209-220, 1995.
- SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, 40: 599-636, 1991.
- SCHRADER, J. Adenosine - a homeostatic metabolite in cardiac energy metabolism. *Circulation*, 81: 389-391, 1990.
- SÉVIGNY, J.; BEAUDOIN, A. R. Le monde des nucléotides extracellulaires. *Médecine Sci.*, 10: 836-844, 1994.
- SÉVIGNY, J.; LEVESQUE, F. P.; GRONDIN, G.; BEAUDOIN, A. R. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localization by immunological techniques. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1334: 73-88, 1997.
- SIEGFRIED, G.; AMIEL, C.; FRIEDLANDER, G. Inhibition of ecto-5'-nucleotidase by nitric oxide donors. Implications in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 271: 4659-4664, 1996.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.*, 91(Suppl. 3C): 31S-38S, 1991.
- SLIVKA, A.; COHEN, G. Brain ischemia markedly elevates levels of the neurotoxic amino acid, cysteine. *Brain Res.*, 608: 33-37, 1993.

- SORIANI, M.; PIETRAFORTE, D.; MINETTI, M. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch. Biochem. Biophys.*, 312: 180-188, 1994.
- SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin. Proc.*, 63: 390-408, 1988.
- STRUBELT, O.; YOUNES, M.; LI, Y. Protection by albumin against ischaemia- and hypoxia-induced hepatic injury. *Pharmacol. Toxicol.*, 75: 280-284, 1994.
- SWEENEY, M. I.; YAGER, J. Y.; WALZ, W.; JUURLINK, B. H. J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 1525-1535, 1995.
- TANAHASHI, N.; TOMITA, M.; KOBARI, M.; TAKEDA, H.; YOKOYAMA, M.; TAKAO, M.; FUKUUCHI, Y. Platelet activation and erythrocyte aggregation rate in patients with cerebral infarction. *Clin. Hemorheol.*, 16: 497-505, 1996.
- TOGNOLI, L.; MARRÉ, E. Purification and characterization of a divalent cation-activated ATP-ADPase from pea stem microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 642: 1-14, 1981.
- TOOMBS, C. F.; MCGEE, D. S.; JOHNSTON, W. E.; VINTON-JOHANSON, J. Myocardial protective effects of adenosine: infarct-size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia. *Circulation*, 86: 986-994, 1992.
- TRAVERSO-CORI, A.; CHAIMOVICH, H.; CORI, O. Kinetic studies and properties of potato apyrase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 109: 173-184, 1965.
- TRUELOVE, D.; SHUAIB, A.; IJAZ, S.; ISHAQZAY, R.; KALRA, J. Neuronal protection with superoxide dismutase in repetitive forebrain ischemia in gerbils. *Free Rad. Biol. Med.*, 17: 445-450, 1994.
- TSUCHIDA, A.; LIU, Y.; LIU, G. S.; COHEN, M.V.; DOWNEY, J. M. α_1 -Adrenergic agonists precondition rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. *Circ. Res.*, 75: 576-585, 1994.
- VALENZUELA, M. A.; LOPEZ, J.; DEPIX, M.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A. M.; CATALAN, L.; CHIONG, M.; GARRIDO, J.; TRAVERSO-CORI, A. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 93B, 911-919, 1989.
- VALENZUELA, M. A.; COLLADOS, L.; KETTLUN, A. M.; LARA, H.; PUENTE, J.; ARANDA, E.; CHEYET, L.; ALVAREZ, A.; TRAVERSO-CORI, A. Changes in apyrase activity in uterus and mammary gland during lactogenic cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103B; 113-118, 1992.
- VAN WYLEN, D. G. L.; PARK, T. S.; RUBIO, R.; BERNE, R. M. Increases in cerebral interstitial fluid adenosine concentration during hypoxia, local potassium infusion, and ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 6: 522-528, 1986.

- VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T. M. U.; SOUZA, W.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.*, 271: 22139-22145, 1996.
- VASCONCELOS, E. G.; NASCIMENTO, P. S.; MEIRELLES, M. M. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FERREIRA, S. T. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 58: 205-215, 1993.
- VÁSQUEZ-VIVAR, J.; SANTOS, A. M.; JUNQUEIRA, V. B. C.; AUGUSTO, O. Peroxynitrite-mediated formation of free radicals in human plasma: EPR detection of ascobyl, albumin-thiyl and uric acid-derived free radicals. *Biochem. J.*, 314: 869-876, 1996.
- VIETTA, M.; FRASSETTO, S. S.; BATTASTINI, A. M. O.; BELLÓ-KLEIN, A.; MOREIRA, C. M.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Sensitivity of ATPase-ADPase activities from synaptic plasma membranes of rat forebrain to lipid peroxidation *in vitro* and the protective effect of vitamin E. *Neurochem. Res.*, 21: 299-304, 1996.
- VLIET, A.; EISERICH, J. P.; O'NEILL, C. A.; HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch. Biochem. Biophys.*, 319: 341-349, 1995.
- VOLKNANDT, W.; VOGEL, M.; PEVSNER, J.; MISUMI, Y.; IKEHARA, Y.; ZIMMERMANN, H. 5'- Nucleotidase from the electric ray electric lobe. *Eur. J. Biochem.*, 202: 855-861, 1991.
- VON LUBITZ, D. K. J. E.; LIN, R. C. S.; JACOBSON, K. A. Cerebral ischemia in gerbils: effects of acute and chronic treatment with adenosine A_{2a} receptor agonist and antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 287: 295-302, 1995.
- WATANABE, T.; YUKI, S.; EGAWA, M.; NISHI, H. Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 1597-1604, 1994.
- WILLIAMS, M. Adenosine - a selective neuromodulator in the mammalian CNS? *Trends Neurosci.*, 7: 164-168, 1984.
- WINDSCHEIF, U. Purinoceptors: from history to recent progress. A review. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48: 993-1011, 1996.
- WINN, H. R.; RUBIO, R.; BERNE, R. M. Brain adenosine production in the rat during 60 seconds of ischemia. *Circ. Res.*, 45: 486-492, 1979.
- WINN, H. R.; WELSH, J. E.; RUBIO, R.; BERNE, R. M. Changes in brain adenosine during biacolline-induced seizures in rats. Effects of hypoxia and altered systemic blood pressure. *Circ. Res.*, 47: 568-577, 1980.

- WOLFF, S. P.; GARNER, A.; DEAN, R. T. Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS*, 11: 27-31, 1986.
- WYSE, A. T.; SARKIS, J. J. F.; CUNHA-FILHO, J. S.; TEIXEIRA, M. V.; SCHETINGER, M. R.; WAJNER, M.; MILTON, C.; WANNMACHER, C. Effect of phenilalanine and its metabolites on ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.*, 19: 1175-1180, 1994.
- YAGI, K.; ARAI, Y.; KATO, N.; HIROTA, K.; MIURA, Y. Purification of ATP diphosphohydrolase from bovine aorta microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 180: 509-513, 1989.
- YAGI, K.; KATO, N.; SHINBO, M.; SHIMBA, L. S.; MIURA, Y. Purification and characterization of adenosine diphosphatase from human umbilical vessels. *Chem. Pharm. Bull.*, 40: 2143-2146, 1992.
- YAGI, K.; SHINBO, M.; HASHIZUME, M.; SHIMBA, L. S.; KURIMURA, S.; MIURA, Y. ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180: 1200-1206, 1991.
- YANG, C-S.; LIN, N-N.; TSAI, P-J.; LIU, L.; KUO, J-S. *In vivo* evidence of hydroxyl radical formation induced by elevation of extracellular glutamate after cerebral ischemia in the cortex of anesthetized rats. *Free Rad. Biol. Med.*, 20: 245-250, 1996.
- YOKOI, I.; TOMA, J.; LIU, J.; KABUTO, H.; MORI, A. Adenosines scavenged hydroxyl radicals and prevented posttraumatic epilepsy. *Free Rad. Biol. Med.*, 19: 473-479, 1995.
- YTREHUS, K.; LIU, Y.; DOWNEY, J. M. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am. J. Physiol.* 266: H1145-H1152, 1994.
- ZHAO, W.; RICHARDSON, J. S.; MOMBOURQUETTE, M. J.; WEIL, J. A.; IJAZ, S.; SHUAIB, A. Neuroprotective effects of hypothermia and U-78517F in cerebral ischemia are due to reducing oxygen-based free radicals: and electron paramagnetic resonance study with gerbils. *J. Neurosci. Res.*, 45: 282-288, 1996.
- ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.*, 285: 345-365, 1992.
- ZIMMERMANN, H.; VOGEL, M.; LAUBE, U. Hippocampal localization of 5'-nucleotidase as revealed by immunocytochemistry. *Neuroscience*, 55: 105-112, 1993.