

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE RATOS ADULTOS E  
INTERAÇÕES COM O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

**CRISTINA RIBAS FÜRSTENAU**

Orientador:

Profº Dr. João José Freitas Sarkis

Co-orientadora:

Profª Dra. Maria Luiza Moraes Barreto-Chaves

Departamento de Anatomia – ICBIII

Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional

Universidade de São Paulo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2006

*Ao Junior, o amor da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*"Meu filho, não te esqueças do meu ensinamento, que o teu coração siga os meus preceitos. Eles aumentam-te os dias e anos de vida, e também a paz. Que não te abandonem a amizade e lealdade. Ata-as ao pescoço, grava-as na tábua do teu coração... Confia no Senhor com todo o teu coração e não te fies em tua própria inteligência. Saibas reconhecê-Lo em toda a tua caminhada e Ele dirigirá os teus passos" (Provérbios, 3:1-6).*

A Deus pelo discernimento, pela bondade e pela proteção.

Ao querido Professor Sarkis por todos os ensinamentos: os da Bioquímica e os da vida. Obrigada pela amizade, pelas conversas, pelas risadas, pelas trocas, pelo convívio e pelo carinho. Obrigada pela aposta, pelo incentivo, pelo suporte e pela confiança. Obrigada pelos exemplos de ser humano e de profissional, de amigo e de chefe. Obrigada pela orientação clara e tranqüila. Obrigada por me permitir voar, experimentar, errar e acertar.

Ao meu amor, Junior, obrigada por existir! Agradeço por todos os momentos que passamos juntos e por todos os que iremos passar. Muito obrigada pelas alegrias, pelos sonhos, pelos planos, pelas realizações... Obrigada pelo incentivo e pelo suporte. Obrigada pela serenidade, pelo conforto e pela doação. Obrigada por todo o amor, pela compreensão e pela paciência.

À minha mãe, Maria Lúcia, pelos exemplos de doçura, firmeza e fé. Obrigada pela preocupação, pelo apoio e pela presença. Obrigada pelo cuidado, pelo carinho e pelos sorrisos.

Ao meu pai, Harry, pelos exemplos de perseverança e disciplina. Obrigada por todo o esforço e pela educação recebida. Obrigada pelo cuidado, pelo carinho e pelos sorrisos.

Aos meus irmãos, Luciana, Carina e Roberto, pela convivência, pela divisão e pelo carinho.

À Professora Maria Luiza pela juventude e pela experiência. Obrigada pela consciência e pela maneira como fazes pesquisa. Obrigada pelo carinho, pela amizade e pela oportunidade.

À Dani Trentin pela preciosa ajuda na realização deste trabalho. Obrigada por todas as tuas dúvidas e angústias. Obrigada pela energia e disposição. Muito obrigada pela amizade, pelo convívio e pelo carinho.

À Bárbara, minha grande amiga! Muito obrigada pela ternura, pelo carinho, pelo incentivo e pela amizade.

À Grace que, mesmo de longe, esteve sempre comigo. Muito obrigada pela amizade, pela coragem e pela perseverança.

À Vanessinha, pela alegria de viver! Obrigada pelos incontáveis sorrisos, pela preocupação, pelo carinho e pela amizade.

À Heloisa pela amizade e cuidado.

Ao Seu Eduardo e à Dona Marli por todo o carinho e preocupação.

Ao Dani e à Elisa, à Ciça e ao Nando pela amizade, convivência e carinho.

À Carla Bonan pelo exemplo de conduta e pela amizade.

À Professora Ana Battastini pela ajuda sempre que necessário.

À Fê Vuaden pela gentileza, companheirismo e amizade.

Aos amigos e colegas dos laboratórios 22 e 24: Joséli, Daniela, Giana, Rosane, Andréia, Émerson, Sandra, Jean, Laila, Manoela, Denise, Ana Paula, Tiana, Luci, Vanessa, Elizandra, Alessandra, Andressa e Lucimara.

Obrigada aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional do Departamento de Anatomia, ICBIII, USP, pela receptividade e disponibilidade. Agradeço, em especial, à Tatiana Fonseca pela acolhida, ao Guilherme pela preciosa contribuição nos experimentos e à Marcela pelas dicas no laboratório.

A todos os professores, funcionários e colegas da Pós-Graduação que, de alguma maneira, contribuíram para a consecução deste trabalho. Obrigada especialmente ao Valeri pela solicitude, e à Cléia pela organização.

Ao CNPq pela bolsa concedida desde a iniciação científica e pelo financiamento do projeto.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I.....</b>	<b>1</b>
1. RESUMO.....	2
2. ABSTRACT.....	3
3. LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
4. INTRODUÇÃO.....	5
4.1. PLAQUETAS.....	5
4.1.1. Características Estruturais das Plaquetas.....	5
4.1.2. Adesão, Ativação e Agregação Plaquetária.....	6
4.2. SISTEMA PURINÉRGICO.....	9
4.2.1. O Papel das Purinas e dos Purinoceptores no Sistema Vascular.....	9
4.2.2. Plaquetas e Nucleotídeos.....	12
4.2.3. Ectonucleotidasas.....	14
4.2.3.1. Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase.....	15
4.2.3.2. Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase.....	17
4.2.3.3. Ecto-5'-nucleotidase.....	18
4.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.....	19
4.3.1. Angiotensina II (ANGII).....	19
4.3.2. Angiotensina II e Ativação Plaquetária.....	20
4.3.3. Angiotensina II e Sistema Purinérgico.....	21
5. OBJETIVOS.....	22

<b>PARTE II.....</b>	<b>23</b>
<b>1. CAPÍTULO I.....</b>	<b>24</b>
Ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties – Publicado em <i>Platelets 17(2): 84-91, 2006.....</i>	25
<b>2. CAPÍTULO II – ARTIGO EM PREPARAÇÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>PARTE III.....</b>	<b>46</b>
<b>1. DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>2. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>70</b>

## PARTE I



## 1. RESUMO

As plaquetas sangüíneas são fragmentos citoplasmáticos, oriundos da ruptura dos megacariócitos, cuja principal função está relacionada à manutenção da integridade vascular. Os nucleotídeos extracelulares, ATP e ADP, bem como a adenosina, têm sido implicados em um grande número de funções fisiológicas: o ADP é o principal fator recrutador de plaquetas, enquanto que o ATP é um inibidor competitivo da agregação induzida por ADP. A adenosina é uma molécula capaz de induzir vasodilatação e inibir a agregação plaquetária. Desta maneira, a manutenção da sinalização purinérgica normal tem se mostrado importante para o tratamento de doenças cardiovasculares. Os nucleosídeos di e trifosfatos circulantes podem ser hidrolisados por membros de várias famílias de ectonucleotidases de membrana e solúveis, incluindo as ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) e ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs), que em conjunto com a ecto-5'-nucleotidase, levam à formação de adenosina. Na superfície das plaquetas, ambas enzimas, E-NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, estão descritas. O sistema renina-angiotensina é o principal regulador da função renal e cardiovascular, desenvolvendo um papel fundamental na homeostasia da pressão arterial e do balanço eletrolítico. A angiotensina II (ANGII) induz fisiologicamente a ativação das plaquetas, possivelmente devido às suas propriedades vasoconstritoras. Os objetivos deste trabalho foram, portanto: 1) caracterizar cineticamente a enzima E-NPP em plaquetas de ratos, utilizando o substrato marcador *p*-Nph-5'TMP e 2) esclarecer, mesmo que em parte, os possíveis efeitos da ANGII sobre a hidrólise extracelular de nucleotídeos por plaquetas de ratos. No primeiro capítulo deste trabalho, descrevemos uma atividade enzimática em plaquetas de ratos que compartilha as principais características bioquímicas já descritas para as E-NPPs: pH ótimo alcalino; valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  calculados de aproximadamente  $106.22 \pm 17.83 \mu M$  e  $3.44 \pm 0.18 \text{ nmol } p\text{-nitrophenol/min/mg}$ , respectivamente; e dependência de cátions divalentes. Além disso, o AMP inibiu somente a hidrólise do *p*-Nph-5'TMP. Por outro lado, a azida de sódio, em altas concentrações, a angiotensina II e o cloreto de gadolínio alteraram apenas as hidrólises de ATP ou ADP ou de ambos. No segundo capítulo, mostramos que a ANGII foi capaz de aumentar as hidrólises de ATP, ADP e AMP em plaquetas em todas as doses testadas (5, 50, 500 e 5000 picomóis). Entretanto, nenhuma alteração foi observada com relação à hidrólise do *p*-Nph-5'TMP. Em adição, observamos um aumento na hidrólise de AMP e uma diminuição na hidrólise de *p*-Nph-5'TMP em plaquetas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) quando comparados a ratos *Wistar* normotensos. De maneira geral, esta dissertação traz a caracterização bioquímica da enzima E-NPP na superfície de plaquetas intactas de ratos como sendo parte de um complexo sistema para a hidrólise de nucleotídeos nestes fragmentos citoplasmáticos, podendo, assim, contribuir para o desenvolvimento de terapias antiplaquetárias e para o tratamento de doenças vasculares. Adicionalmente, apresentamos alguns resultados demonstrando interações entre os sistemas angiotensinérgico e adenosinérgico de plaquetas de ratos, o que poderá contribuir para o entendimento e o tratamento de doenças cardiovasculares como hipertensão e arteriosclerose.

## 2. ABSTRACT

Platelets are cytoplasmic fragments derived from bone marrow megakaryocytes rupture, whose major role is related to the vascular integrity maintenance. The extracellular nucleotides ATP and ADP as well as adenosine have been implicated in a great number of physiological functions: ADP is the major factor recruiting platelet, whereas ATP has been considered as a competitive inhibitor of ADP-induced platelet aggregation. Adenosine is a molecule able to induce vasodilatation and to inhibit platelet aggregation. Thus, the maintenance of normal purinergic signalling has been showed as an important issue for the treatment of cardiovascular diseases. The nucleoside di and triphosphate can be hydrolyzed by members of several families of membrane-bound or soluble ectonucleotidases, including ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) and ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterases (E-NPPs), that together with an ecto-5'-nucleotidase lead to adenosine formation. On the platelets ecto-surface, both E-NTPDase and ecto-5'-nucleotidase are already described. The renin-angiotensin system is the most important regulator of renal and cardiovascular function developing a fundamental role in the arterial blood pressure homeostasis and in the electrolytic balance. Angiotensin II (ANGII) induces physiologically the platelet activation, probably due to its vasoconstrictors properties. The aims of this study were: 1) to kinetically characterize the enzyme E-NPP from rat blood platelet, using the artificial marker substrate *p*-Nph-5'TMP and 2) to clarify, even though in part, the effects of ANGII upon extracellular nucleotide hydrolysis by rat platelets ectoenzymes. In the first chapter, we describe an enzymatic activity that shares the major characteristics already described for E-NPPs: optimum alkaline pH;  $K_M$  and  $V_{max}$  calculated values of approximately  $106.22 \pm 17.83 \mu\text{M}$  and  $3.44 \pm 0.18 \text{ nmol } p\text{-nitrophenol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectively; and divalent cation dependence. Besides, AMP inhibited only *p*-Nph-5'TMP hydrolysis. On the other hand, sodium azide, in high concentrations, ANGII and gadolinium chloride just changed ATP or ADP or both hydrolysis. In the second chapter, we show that ANGII was able to increase ATP, ADP and AMP hydrolysis in platelets from rats in all tested dosis (5, 50, 500 e 5000 picomoles). However, no modification was observed regarding *p*-Nph-5'TMP hydrolysis. Additionally, we verified an increase on AMP hydrolysis and a reduction on *p*-Nph-5'TMP hydrolysis in platelets from spontaneously hypertensive rats (SHR) when compared to *Wistar* normotensive rats. Finally, this work shows the kinetic and biochemistry characterization of an E-NPP enzyme on the intact platelet surface as being part of a complex system for nucleotide hydrolysis that could contribute for the antiplatelet therapies and vascular diseases treatment. In addition, we present some results showing interactions between rat platelet angiotensinergic and adenosinergic systems that could contribute to the understanding and treatment of cardiovascular diseases such as hypertension and atherosclerosis.

### 3. LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina 5'-difosfato

AMP – adenosina 5'-monofosfato

AMPC – adenosina 5'-monofosfato cíclico

ANGII – angiotensina II

Ap<sub>n</sub>A – diadenosina 5', 5'''- P<sup>1</sup>, P<sup>n</sup>- n fosfato

ATP – adenosina 5'-trifosfato

DAG – diacilglicerol

ECA – enzima conversora de angiotensina

(E-)NPP – (Ecto-)nucleotídeo pirofosfato/fosfodiesterase

(E-)NTPDase – (Ecto-)nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

i.p. - intraperitoneal

IP<sub>3</sub> – inositol-1,4,5-trifosfato

LOS – losartan

Pi – fosfato inorgânico

PKC – proteína cinase C

p-Nph-5'-TMP – p-nitrofenil-5'-timidina monofosfato éster

SHR – (*spontaneously hypertensive rats*) / ratos espontaneamente hipertensos

SRA – sistema renina-angiotensina

TCA – ácido tricloroacético

TXA<sub>2</sub> – tromboxano A<sub>2</sub>

## 4. INTRODUÇÃO

### 4.1. PLAQUETAS

#### 4.1.1. Características Estruturais das Plaquetas

As plaquetas sangüíneas ou trombócitos são fragmentos citoplasmáticos anucleados produzidos em conseqüência da ruptura dos megacariócitos - células precursoras extraordinariamente grandes e altamente especializadas da medula óssea (Italiano Jr & Shivdasani, 2003; Silbernagl & Despopoulos, 2003). As plaquetas circulam no sangue na forma de disco biconvexo e medem aproximadamente  $3.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$  de diâmetro por  $0.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$  de largura. Além disso, sua concentração sangüínea normal é de 150.000 a 350.000 por milímetro cúbico e seu tempo médio de vida na corrente sangüínea é de 7 a 10 dias (Mesa & Alfonso, 2000).

Na membrana externa da plaqueta, que se constitui por uma bicamada lipídica, estão presentes glicoproteínas, proteínas adesivas e fosfolípídeos. Adicionalmente, microtúbulos estão dispostos de maneira concêntrica na periferia da plaqueta, garantindo sua forma discóide e sua resistência à deformação (Mesa & Alfonso, 2000). Os trombócitos exibem um sistema de túbulos e vesículas derivados de invaginações da membrana plasmática que possibilita a livre comunicação entre a plaqueta e a sua superfície – o sistema canalicular aberto -, o qual atua como um canal para a liberação de substâncias endógenas durante a ativação plaquetária (Davey, 1982). Além da membrana plasmática e do sistema

canalicular aberto, a plaqueta apresenta membranas internas derivadas do retículo endoplasmático, denominadas sistema tubular denso, o qual serve, segundo alguns autores, para o estoque e liberação de cálcio (Herbener & Dean, 1988).

O citoplasma da plaqueta é constituído por quatro tipos de grânulos delimitados por membrana (grânulos  $\alpha$ , lisossomos, microperoxissomos e grânulos densos ou  $\delta$ ), algumas mitocôndrias e glicogênio. As proteínas dos grânulos  $\alpha$  incluem fatores plaquetários específicos (fator IV), proteínas plasmáticas comuns (fibrinogênio e fibronectina) e proteínas sintetizadas pelos trombócitos (trombospondina, fator de von Willebrand e vários fatores de crescimento). As enzimas lisossomais incluem N-acetilglicosaminidases,  $\beta$ -galactosidases, catepsinas e colagenases. Os microperoxissomos possuem atividade peroxidásica. Os grânulos densos contêm ADP, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ , serotonina e pirofosfato (Bennett, 1990; Qawi & Robson, 2000). Nestes grânulos estão presentes cerca de 60% da quantidade total dos nucleotídeos da adenina contidos nas plaquetas. Entretanto, estas moléculas podem também ser encontradas no citosol e nas mitocôndrias dos trombócitos. ATP e ADP são liberados para o meio extracelular em resposta à estimulação ou ativação plaquetária (Holmsen, 1985).

#### 4.1.2. Adesão, Ativação e Agregação Plaquetária

A principal função das plaquetas sangüíneas está relacionada à manutenção da integridade vascular. Normalmente, elas circulam intactas no sangue sem serem ativadas pelo endotélio vascular. Isto ocorre devido à carga negativa das superfícies das plaquetas e das células endoteliais vasculares, as

quais são eletrostaticamente repulsivas, dificultando a formação de trombos (Rodrigues, 1992).

Os trombócitos promovem a hemostasia primária e secundária que acontecem posteriormente a alguma lesão nos vasos sanguíneos. Desta maneira, os eventos iniciais são modulados pela exposição dos componentes do vaso sanguíneo, tais como microfibrilas, membrana basal e colágeno. Concomitantemente, ocorre a adesão plaquetária à matriz subendotelial (Figura 1) e acontece a ativação plaquetária (Marcus *et al.*, 2003a). A palavra "adesão" descreve a interação entre as plaquetas e qualquer outro tipo celular diferente, enquanto que "agregação" se refere exclusivamente à interação entre duas plaquetas (Lopez-Farré, 2001).

A ativação plaquetária é, em geral, iniciada pela exposição a um agonista plaquetário que se liga a receptores de superfície e engatilha uma cascata de eventos bioquímicos. A trombina, o colágeno, o ADP, a epinefrina e o tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) são estímulos fisiológicos para a ativação plaquetária. Os eventos posteriores têm elementos comuns e outros que se diferenciam, especialmente como resultado da estimulação de receptores específicos (Mesa & Alfonso, 2000).

Após a ligação do agonista ao receptor, os segundos-mensageiros inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG) são formados e modulam vias de ativação independentes, podendo atuar sozinhos ou sinergisticamente. O  $IP_3$  se liga a receptores do sistema tubular denso, principal local de estoque de  $Ca^{2+}$ , fazendo com que as concentrações citoplasmáticas deste íon aumentem, o qual, por interagir com a calmodulina, acaba por promover o rearranjo do citoesqueleto das plaquetas. Além disso, a ligação do  $IP_3$  ao sistema tubular denso e o aumento

do cálcio intracelular, medeiam a oxidação citosólica do ácido araquidônico a TXA<sub>2</sub>, que posteriormente é liberado da plaqueta. As altas concentrações de Ca<sup>2+</sup> também promovem a secreção dos grânulos α e denso através do sistema canalicular aberto, o que ativa as plaquetas vizinhas e leva à agregação e à formação do "tampão" plaquetário. O DAG causa a ativação da proteína cinase C (PKC), o que contribui para a liberação do conteúdo dos grânulos α e denso, sendo este processo denominado de secreção (Jin *et al.*, 2005).



**FIGURA 1:** As plaquetas em repouso apresentam uma forma discóide (esquerda). Quando são expostas a agentes pró-agregantes, elas aderem ao substrato, estendem numerosos filopódios (centro) e, então, se espalham (direita). As mudanças na morfologia resultam de complexos rearranjos do citoesqueleto de actina que se liga à membrana plasmática. Adaptado de *Molecular Cell Biology*, Lodish, 5ª edição.

A agregação ocorre depois da adesão e é definida como uma reação de plaquetas ativadas entre si. Um elemento que distingue os agentes indutores de agregação plaquetária é o peso relativo que têm a síntese de TXA<sub>2</sub> e a secreção do conteúdo dos grânulos no resultado final. O ADP, por exemplo, em baixas concentrações (0.1 a 1.0 μM), produz uma primeira fase de agregação reversível, com duração de cerca de 30 segundos, e que é consequência do sinal de ativação do receptor (Mesa & Alfonso, 2000). A esta primeira fase, se segue uma segunda, que ocorre em altas concentrações de ADP (2 a 5 μM), a qual é irreversível, dependente da síntese de tromboxano A<sub>2</sub> e acompanhada da liberação do conteúdo dos grânulos α e densos (Colman, 1990).

## 4.2. SISTEMA PURINÉRGICO

### 4.2.1. O Papel das Purinas e dos Purinoceptores no Sistema Vascular

É amplamente reconhecido que a sinalização purinérgica é um sistema primitivo envolvido em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo secreção exócrina e endócrina, respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (Burnstock, 2004).

Os receptores purinérgicos foram definidos pela primeira vez em 1976 e, dois anos mais tarde, foram distinguidos dois tipos de purinoceptores, identificados como P1 e P2 (Burnstock, 2004). Os receptores P1 preferencialmente reconhecem a adenosina e são identificados quatro subtipos de receptores acoplados à proteína G: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (Fredholm *et al.*, 1997). Com base em diferenças moleculares, bem como nos mecanismos de transdução de sinal, os receptores P2, seletivos para ATP e ADP, foram subdivididos em duas famílias principais: a família P2X, que são receptores ligados a um canal iônico, e a família P2Y, à qual pertencem purinoceptores metabotrópicos acoplados à proteína G (Abbraccio & Burnstock, 1994). Todas as células do sistema cardiovascular expressam um ou mais subtipos de receptores de purinas e os efeitos extracelulares das mesmas, em geral, estão relacionados à cardioproteção (Ralevic & Burnstock, 2003).



Os nucleotídeos extracelulares, ATP e ADP, bem como a adenosina, têm sido implicados em um grande número de funções fisiológicas (Kunapuli & Daniel, 1998; Ralevic & Burnstock, 1998). ATP e ADP podem ser liberados de cinco diferentes fontes no corpo e, subseqüentemente, alcançar órgãos-alvo: 1) o ATP é liberado juntamente com a norepinefrina dos neurônios simpáticos; 2) ATP e ADP são estocados nos grânulos densos das plaquetas e são liberados na corrente sangüínea sob ativação; 3) as células da medula adrenal também liberam nucleotídeos; 4) tanto as células musculares vasculares lisas como as células endoteliais transportam nucleotídeos do citosol através da membrana; e, finalmente, 5) o rompimento de células libera nucleotídeos celulares que têm vários efeitos sobre as plaquetas, células endoteliais, leucócitos e células vasculares musculares lisas durante uma injúria vascular (Kunapuli & Daniel, 1998).

Apesar de funções para as purinas extracelulares terem sido descritas logo após a descoberta do ATP, o interesse sobre esta molécula tinha como base o conceito de "ligação fosfato de alta energia" (Vassort, 2001). O ATP extracelular pode exibir efeitos opostos dependendo da concentração, da célula e do receptor em que atua. Quando é liberado como neurotransmissor pelos nervos simpáticos, atua sobre os receptores P2X localizados na musculatura lisa, produzindo vasoconstrição. Contrariamente, quando é liberado por células endoteliais, em situações de hipóxia, por exemplo, atua sobre os receptores P2Y destas células, levando à produção de óxido nítrico e, conseqüentemente, à vasodilatação. Este nucleotídeo também é capaz de exercer outros efeitos sobre o sistema vascular,

tais como: controle da proliferação celular em células endoteliais e musculares lisas, arritmia, hipertrofia cardíaca e apoptose (Ralevic & Burnstock, 2003).

O principal efeito funcional do ADP é a estimulação da agregação das plaquetas, uma parte importante do processo hemostático (Boarder & Hourani, 1998). Portanto, o controle dos níveis extracelulares de ADP, principalmente por ectonucleotidases de membrana ou na forma solúvel, é fundamental para a regulação dos processos trombóticos e/ou hemorrágicos. A relação deste nucleotídeo com os trombócitos será apresentada no tópico seguinte. Em adição, o ADP pode atuar nos receptores P2Y<sub>1</sub> das células endoteliais e musculares lisas, causando dilatação (Ralevic & Burnstock, 2003).

A adenosina é tanto um precursor quanto um metabólito dos nucleotídeos da adenina. As fontes de adenosina na circulação incluem o ATP e o ADP liberados pelas plaquetas, o AMP liberado pelos neutrófilos, o ATP liberado pelas células endoteliais, a adenosina que é carregada das células sanguíneas para o plasma por transportadores de nucleosídeos e a adenosina do interstício que se difunde para o espaço vascular através de fendas entre as células endoteliais adjacentes na parede dos capilares (Shryock & Belardinelli, 1997). A adenosina exerce múltiplos efeitos protetores em diferentes processos fisiopatológicos, tais como: proteção tecidual contra isquemia em casos de reperfusão; diminuição da pressão arterial através da vasodilatação em casos de hipertensão; proteção contra a arteriosclerose por meio da vasodilatação, da proliferação celular e do aumento na expressão de fatores de crescimento endoteliais; controle da taquicardia através da bradicardia mediada pelos receptores A<sub>1</sub> sinoatriais; diminuição da dor por meio dos receptores A<sub>1</sub> inibitórios dos nervos sensoriais;

inibição da agregação plaquetária, entre outros (Mubagwa *et al.*, 1996; Shryock & Belardinelli, 1997; Ralevic & Burnstock, 2003).

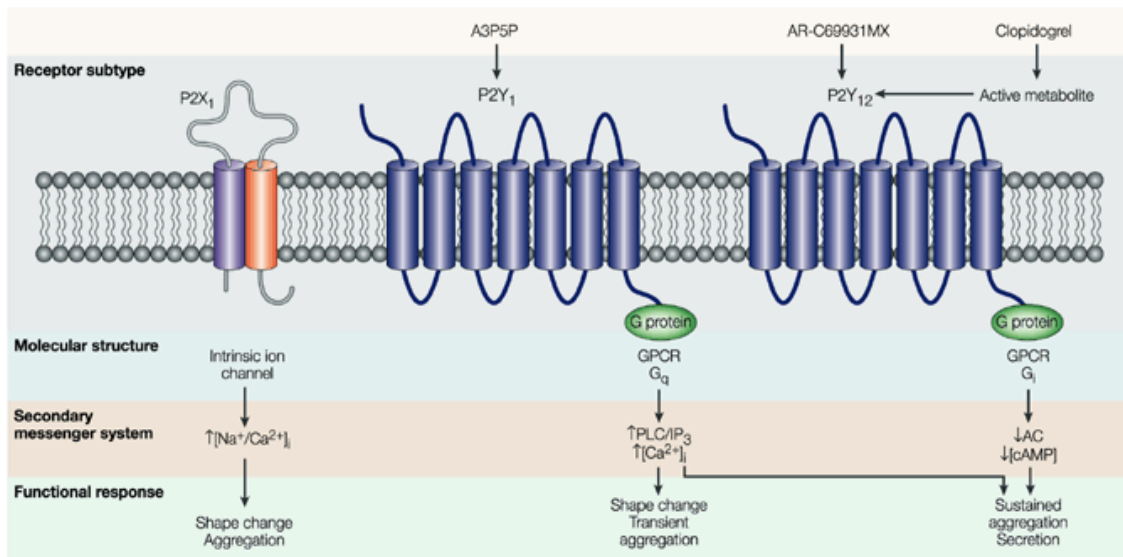
#### 4.2.2. Plaquetas e Nucleotídeos

Cerca de 90% dos nucleotídeos presentes nas plaquetas são constituídos por nucleotídeos da adenina. Outros componentes são os nucleotídeos da guanina e os dinucleotídeos (Ap<sub>3</sub>A e Ap<sub>4</sub>A) (Luthje & Ogilvie, 1983). O reservatório metabólico, localizado no citosol e nas mitocôndrias, é utilizado para a manutenção do consumo energético da plaqueta. Por outro lado, os nucleotídeos da adenina estão presentes em altas concentrações nos grânulos densos das plaquetas e são liberados para a circulação quando estas são expostas a agentes pró-agregantes, reforçando a agregação plaquetária (Bithell, 1993; Gachet, 2005).

O ATP tem sido considerado como um inibidor da agregação plaquetária induzida por ADP (Coade & Pearson, 1989). O ADP é conhecido desde 1961 por ativar os trombócitos e por desempenhar um papel chave na função plaquetária porque, quando é secretado dos grânulos densos, amplifica as respostas das plaquetas induzidas por outros agonistas (Cattaneo & Gachet, 2001).

Tem sido demonstrado que os nucleotídeos da adenina atuam sobre as plaquetas através de três receptores purinérgicos: P2X<sub>1</sub> (receptor ionotrópico que leva ao rápido influxo de cálcio para o citosol), P2Y<sub>1</sub> (receptor metabotrópico que mobiliza cálcio dos estoques internos, o que acaba por engatilhar o processo de agregação) e P2Y<sub>12</sub> (receptor acoplado à proteína G que estabiliza os agregados de plaqueta) (André *et al.*, 2003) (Figura 2). Este último é o alvo molecular das

drogas anti-agregação plaquetária seletivas para ADP, ticlopidina e clopidogrel. Além disso, o P2Y<sub>12</sub> é defectivo em pacientes com doenças de sangramento, caracterizadas por um prejuízo seletivo das respostas plaquetárias ao ADP (Cattaneo & Gachet, 2001).



**FIGURA 2:** Diferentes subtipos de receptores de ADP. Existem três principais receptores de ADP na plaqueta. Através de vários sistemas de segundos-mensageiros, estes receptores contribuem para a ativação, mudança de forma, secreção e agregação plaquetária. Adaptado de *Bhatt & Topol, Nature Reviews 2: 15-28, 2002.*

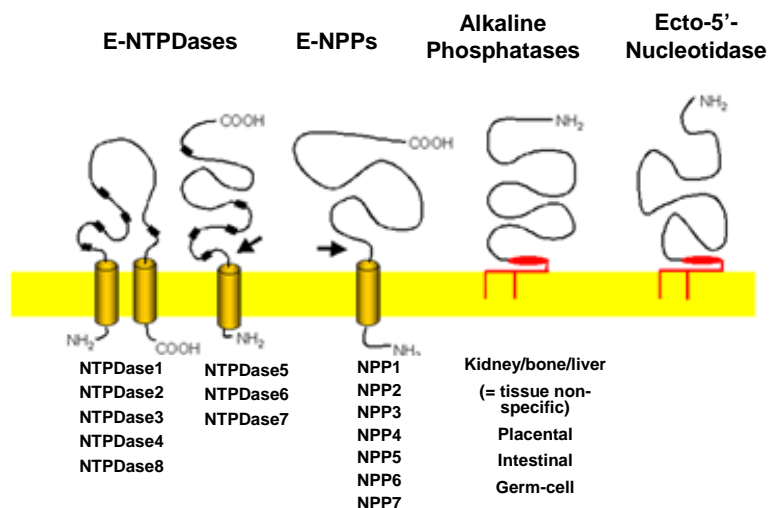
Tendo em vista a evidente participação das purinas em diferentes processos envolvidos na funcionalidade cardiovascular normal, deve-se atentar para o fato de que distúrbios ou prejuízos na sinalização purinérgica podem estar relacionados ao desenvolvimento de patologias vasculares. Desta maneira, a manutenção da sinalização purinérgica normal, incluindo desde as moléculas sinalizadoras, até seus receptores e suas enzimas de degradação, têm se mostrado importantes alvos para o tratamento de doenças cardiovasculares (Ralevic & Burnstock, 2003).

#### 4.2.3. Ectonucleotidasas

Os nucleotídeos extracelulares são degradados por uma cascata de hidrólise extracelular que resulta na formação do respectivo nucleosídeo e fosfato livre. O sítio catalítico das ectonucleotidasas está voltado para o meio extracelular. Elas são, em geral, proteínas ligadas à membrana, porém isoformas extracelulares clivadas e solúveis também existem. A atividade catalítica máxima é adaptada ao meio extracelular e requer a presença de cátions divalentes, tais como cálcio ou magnésio, e um pH levemente alcalino. Além disso, na maioria dos casos, os valores de  $K_M$  estão na faixa micromolar. O principal papel funcional destas enzimas é o término da sinalização por nucleotídeos, acompanhado pela recaptção de purinas (Zimmermann, 2000).

Alguns trabalhos têm demonstrado que membros de várias famílias de ectonucleotidasas podem contribuir para a degradação extracelular dos nucleotídeos. Estas famílias revelam não somente uma sobreposição de distribuição tecidual, mas também de especificidades por substratos. Desta forma, nucleosídeos di e trifosfatos podem ser hidrolisados por membros das famílias E-NTPDase (Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, apirase, ATP-difosfohidrolase, EC 3.6.1.5), E-NPP (Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase, PDEase, EC 3.1.4.1) e fosfatases alcalinas. Os nucleotídeos monofosfatos estão sujeitos à hidrólise pela ecto-5'-nucleotidase e pelas fosfatases alcalinas (Zimmermann, 2001). Embora haja controvérsia, alguns

autores acreditam que os nucleotídeos monofosfatos também possam ser hidrolisados por alguns membros da família E-NPP (Figura 3).



**FIGURA 3:** Prognóstico da topografia das ectonucleotidases de membrana. As NTPDases 1 – 4 são ligadas à membrana plasmática por dois domínios transmembrana (N e C-terminal). As NTPDases 5 e 6 perdem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas próximo ao domínio N-terminal (setas) para formar uma proteína solúvel e liberada. Os quadros escuros representam a posição das cinco regiões conservadas da apirase. As NTPDases 1 – 3 são ectonucleotidases típicas. A NTPDase 4 está localizada intracelularmente. As NTPDases 5 e 6 estão localizadas intracelularmente, mas podem ser clivadas e liberadas das células. A NTPDase 7 está localizada em vesículas intracelulares e a NTPDase 8 prefere sutilmente o ATP ao ADP. Os membros da família E-NPP são proteínas transmembrana tipo II com potencial para se tornar formas solúveis. As quatro formas de fosfatases alcalinas, bem como a ecto-5'-nucleotidase são ancoradas por glicosilfosfatidil inositol (GPI). Todas as proteínas listadas são glicoproteínas. Adaptado de Zimmermann H. *Drug Develop Res* 52: 44-56, 2001.

Diversos estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa têm evidenciado a importância das ectonucleotidases, caracterizando estas atividades enzimáticas e verificando o efeito de diferentes compostos sobre as mesmas em diferentes frações biológicas (Sarkis & Saltó, 1991; Battastini *et al.*, 1991; Frassetto *et al.*, 1993; Bonan *et al.*, 2001; Oses *et al.*, 2004; Fürstenau *et al.*, 2004; Buffon *et al.*, 2004; Rücker *et al.*, 2005).

#### 4.2.3.1. Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase)

Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, apirase, ATP-difosfohidrolase, EC 3.6.1.5) designa uma família de proteínas transmembrana que catalisa a hidrólise dos fosfatos  $\gamma$  e/ou  $\beta$  dos nucleotídeos (Zimmermann H, 2001),

produzindo AMP. A atividade das NTPDases tem sido relacionada a diferentes processos, tais como neurotransmissão, função cardíaca, agregação plaquetária, adesão celular, tônus vascular, secreção hormonal, resposta imune, entre outros (Zimmermann, 1996).

Estas enzimas hidrolisam ATP e ADP com diferentes velocidades. A NTPDase 1 (CD 39) hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, enquanto que a NTPDase 2 (CD39L1) prefere os trifosfonucleosídeos, numa proporção de 30:1. A NTPDase 3 e 8 preferem o ATP ao ADP, numa relação de cerca de 3:1 e 2:1, respectivamente (Lavoie *et al.*, 2004).

As NTPDases 4 – 7 estão associadas com membranas de organelas intracelulares. A NTPDase 4 prefere UDP como substrato e está ancorada à membrana do aparelho de Golgi; já as NTPDases 5 e 6 têm preferência por nucleosídeos difosfatos e possuem um único domínio transmembrana próximo ao N-terminal, sendo que a forma 5 está ligada ao retículo endoplasmático e a forma 6 encontra-se ancorada ao aparelho de Golgi. Além disso, uma forma solúvel destas enzimas pode ser secretada após sofrer uma clivagem proteolítica. Finalmente, a NTPDase 7 prefere nucleosídeos trifosfatos e está localizada em vesículas intracelulares (Lavoie *et al.*, 2004).

As NTPDases modulam efeitos fisiológicos e patológicos dos nucleotídeos liberados, o que é, particularmente, interessante para a hemostasia e tromborregulação. Além disso, as NTPDases são um importante sistema de controle para vários aspectos da transdução de sinal purinérgica (Marcus *et al.*, 2003b). Diferentes grupos de pesquisa têm evidenciado a importância das ectonucleotidases no sistema vascular. A NTPDase 1 (CD39) tem sido apontada

como a nucleotidase mais abundante na superfície luminal dos vasos sanguíneos (Kaczmarek *et al.*, 1996), sendo, portanto, a principal NTPDase envolvida na regulação intravascular dos níveis de ATP e ADP, podendo modular possíveis efeitos patológicos dos nucleotídeos liberados na reatividade plaquetária (Marcus *et al.*, 2005).

#### 4.2.3.2. Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP)

A família das ecto-nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases (E-NPP, PDEase, EC 3.1.4.1) consiste de sete ecto-enzimas estruturalmente relacionadas (Stefan *et al.*, 2005). As E-NPPs são glicoproteínas transmembrana tipo II capazes de hidrolisar 3'-5'-AMPc a AMP; ATP a AMP e PP<sub>i</sub>; ADP a AMP e P<sub>i</sub>; NAD<sup>+</sup> a AMP e nicotinamida mononucleotídeo; e AP<sub>n</sub>A a Ap<sub>n-1</sub>A e AMP (Zimmermann, 2001). Membros da família E-NPP incluem o antígeno de diferenciação celular de murinos (NPP1), a NPP2 (PD-1 $\alpha$ , autotaxin) e a NPP3 (PD-1 $\beta$ , B10, gp130<sup>RB13-6</sup>) (Zimmermann, 2000). Elas apresentam uma distribuição distinta, mas que se sobrepõe e têm sido detectadas em quase todos os tecidos (Bollen *et al.*, 2000).

Múltiplos papéis fisiológicos para as E-NPPs têm sido descritos: mineralização óssea, digestão, proliferação e motilidade celular, reciclagem de nucleotídeos e modulação da sinalização purinérgica (Bollen *et al.*, 2000; Goding *et al.*, 2003). Em associação com outras ecto-enzimas que hidrolisam nucleotídeos, as E-NPPs podem modular a sinalização por nucleotídeos. Por exemplo, a NPP1 e a ecto-5'-nucleotidase têm sido implicadas na mediação da sinalização via purinoceptores em várias linhagens celulares devido à sua ação



combinada que converte uma sinalização pelo ATP via purinoceptores P2 em uma sinalização por adenosina via purinoceptores P1 (Grobben *et al.*, 2000, Lazarowski *et al.*, 2000). Além disso, importantes estudos envolvendo esta atividade enzimática no sistema circulatório também foram realizados, evidenciando sua contribuição como um marcador bioquímico para uma doença hepática e para a supressão da agregação plaquetária induzida por ADP (Sakura *et al.*, 1998), bem como sua associação com o desenvolvimento da síndrome coronariana aguda (Sakura *et al.*, 2003).

#### 4.2.3.3. Ecto-5'-nucleotidase

A ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) também participa do metabolismo dos nucleotídeos da adenina, atuando em conjunto com as NTPDases ou NPPs. O AMP, resultante da hidrólise do ATP e ADP, é convertido à adenosina pela 5'-nucleotidase. Esta enzima é amplamente distribuída em bactérias, células de plantas e tecidos de vertebrados, sendo classificada em quatro grupos de acordo com a localização celular e propriedades bioquímicas: uma ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana plasmática, uma forma solúvel e duas formas citoplasmáticas. A atividade catalítica desta enzima controla os níveis intracelulares e extracelulares de AMP e adenosina, que exibe propriedades vasodilatadoras e inibe a agregação plaquetária (Kawashima Y, 2000).

### 4.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

O sistema renina-angiotensina é o principal regulador da função renal e cardiovascular, desenvolvendo um papel fundamental na homeostasia da pressão arterial e do balanço eletrolítico (Ferreira & Santos, 2005). Havendo uma queda aguda da pressão renal média, abaixo de cerca de 90 mmHg, a secreção de renina é elevada via barorreceptores renais e, com isso, eleva-se a concentração plasmática de renina. A renina é uma peptidase que cliva o substrato angiotensinogênio, produzido e secretado pelo fígado, formando a angiotensina I. A enzima conversora de angiotensina (ECA), existente no pulmão, cliva a angiotensina I retirando dois aminoácidos, surgindo, cerca de 30 a 60 minutos após a queda da pressão arterial, a angiotensina II (Silbernagl & Despopoulos, 2003).

#### 4.3.1. Angiotensina II (ANGII)

A ANGIO é um octapeptídeo (ASP-ARG-VAL-TYR-ILE-HIS-PRO-PHE) com múltiplas ações biológicas, caracterizando-se como o principal efetor do sistema renina-angiotensina (Marks *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2004).

As ações da angiotensina II são mediadas pelos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. O receptor AT<sub>1</sub> pertence à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Ele é expresso em numerosos tecidos, incluindo adrenal, rim, coração, aorta, pulmão, fígado, testículos, glândula pituitária e cérebro. O gene do receptor AT<sub>2</sub> é expresso em níveis altíssimos em tecidos fetais, mas declina significativamente em muitos tecidos após o nascimento (Gasparo *et al.*, 2000).

A ANGII exibe efeitos opostos ao ligar-se aos dois subtipos de receptores citados anteriormente. Dessa maneira, quando se liga ao receptor AT<sub>1</sub>, a angiotensina II é capaz de promover vasoconstrição e efeitos pressores, além de trombose, inflamação e hipertrofia vascular e miocárdica. Por outro lado, quando este peptídeo se liga ao receptor AT<sub>2</sub>, processos como vasodilatação, inibição da proliferação celular, apoptose e efeitos anti-hipertensivos e cardioprotetores são observados (Akdemir *et al.*, 2004; Ferreira & Santos, 2005).

Uma vez que a ANGII é o principal regulador da pressão sangüínea, da secreção de aldosterona e da homeostase dos fluidos, e por ser um fator etiológico importante na hipertensão e em outras desordens cardiovasculares, o bloqueio da formação ou da ação deste peptídeo, por inibidores da ECA ou por antagonistas de receptores, é de extrema importância terapêutica (Gasparo *et al.*, 2000). Portanto, o losartan (LOS), um antagonista seletivo dos receptores AT<sub>1</sub>, vem sendo utilizado com sucesso para contrabalançar os efeitos da angiotensina II.

#### 4.3.2. Angiotensina II e Ativação plaquetária

Múltiplos fatores, tais como adesão plaquetária ao subendotélio, agregação e recrutamento de trombócitos, estão envolvidos na formação de um trombo. A ANGII induz fisiologicamente a ativação das plaquetas, possivelmente devido às suas propriedades vasoconstritoras. Portanto, teoricamente, bloqueando-se a produção e a ação da angiotensina II poderiam ser observados efeitos anti-plaquetários diretos (Brown & Vaughan, 2000; Larsson *et al.*, 2000). Além disso, a

agregação plaquetária espontânea é largamente relatada em casos de hipertensão (Pravenec *et al.*, 1992). Muitos pesquisadores têm mostrado que vários parâmetros da ativação plaquetária são normalizados com o tratamento desta doença (Blann *et al.*, 2003; Riondino *et al.*, 1999; Erne *et al.*, 1984).

#### 4.3.3. Angiotensina II e Sistema Purinérgico

A habilidade da adenosina em diminuir a pressão arterial, bem como seus efeitos vasodilatadores, já são conhecidos desde 1929. Além disso, sabe-se que ela é capaz de inibir a liberação de renina e este efeito é potencializado sempre que o sistema renina-angiotensina está ativado (Sousa *et al.*, 2002). A angiotensina II, além dos seus efeitos vasoconstritores, produz mudanças estruturais nos vasos sanguíneos por mecanismos não relacionados à pressão (Kawasaki *et al.*, 1982). As mudanças tróficas induzidas pela angiotensina II são similares àquelas descritas para a hipertensão devido ao uso de um antagonista não seletivo (DPSPX) de receptores de adenosina (Albino-Teixeira *et al.*, 1991). Além disso, estudos prévios demonstram que a ativação de receptores A<sub>1</sub> de adenosina pode proteger as células cardíacas da apoptose induzida por angiotensina II, enquanto que a ativação de receptores A<sub>3</sub> confere uma cardioproteção parcial (Goldenberg *et al.*, 2003). Neste sentido, torna-se extremamente interessante elucidar as possíveis interações entre a adenosina e angiotensina II sob os mais diferentes aspectos, incluindo o estudo sobre as atividades de ectonucleotidases.

## 5. OBJETIVOS

1. Sabendo-se que concentrações micromolares de ADP são necessárias para induzir a ativação plaquetária e que uma grande quantidade deste nucleotídeo é liberada durante este processo – podendo levar a uma razoável produção de trombos e, até mesmo, provocar a oclusão de vasos sanguíneos –, é interessante atentar para a possibilidade de existência de múltiplos sistemas para hidrólise extracelular de nucleotídeos por plaquetas. Desta maneira, nosso primeiro objetivo foi caracterizar cineticamente e estudar as propriedades bioquímicas da ectonucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase (E-NPP) em plaquetas de ratos, como sendo parte de um complexo e fino mecanismo de regulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares circulantes.

2. Levando-se em conta que o processo trombótico mediado pelas plaquetas é um sistema altamente complexo, dada a relevância deste mesmo processo nas doenças cardiovasculares (as quais afetam cerca de 15% da população com mais de 40 anos) e, ainda, sabendo-se que a angiotensina II pode participar do processo trombótico, o segundo objetivo deste trabalho é esclarecer, mesmo que em parte, os efeitos da ANG II sobre a hidrólise extracelular de nucleotídeos por ecto-enzimas de plaquetas de ratos.

## PARTE II

## 1. CAPÍTULO I

Ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase as part of a multiple system  
for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and  
biochemical properties

Artigo publicado em *Platelets* 17(2): 84-91, 2006.

ORIGINAL ARTICLE

## Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: Kinetic characterization and biochemical properties

CRISTINA RIBAS FÜRSTENAU<sup>1</sup>, DANIELLE DA SILVA TRENTIN<sup>1</sup>, MARIA LUIZA MORAIS BARRETO-CHAVES<sup>2</sup>, & JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil and <sup>2</sup>Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

(Received 14 April 2005; revised 20 June 2005; accepted 4 July 2005)

### Abstract

In this study, we describe an ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity in rat platelets. Using *p*-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) as a substrate for E-NPP, we demonstrate an enzyme activity that shares the major biochemical properties described for E-NPPs: alkaline pH dependence, divalent cation dependence and blockade of activity by metal ion chelator.  $K_m$  and  $V_{max}$  values for *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis were found to be  $106 \pm 18 \mu\text{M}$  and  $3.44 \pm 0.18 \text{ nmol } p\text{-nitrophenol}/\text{min}/\text{mg}$  (mean  $\pm$  SD,  $n=5$ ). We hypothesize that an E-NPP is co-localized with an ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and an ecto-5'-nucleotidase on the platelet surface, as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis, since they can act under distinct physiological conditions and can be differently regulated. Thus, 0.25 mM suramin inhibited *p*-Nph-5'-TMP, ATP and ADP hydrolysis, while 0.5 mM AMP decreased only *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis. Besides, 5.0, 10 and 20 mM sodium azide just inhibited ATP and ADP hydrolysis. Angiotensin II (5.0 and 10 nM) affected only ADP hydrolysis. Gadolinium chloride (0.2 and 0.5 mM) strongly inhibited the ATP and ADP hydrolysis. The E-NPP described here represents a novel insight into the control of platelet purinergic signaling.

**Keywords:** Platelets, nucleotide hydrolysis, E-NPP, PDEase, E-NTPDase

### Introduction

Platelets are enucleated fragments produced as a consequence of bone marrow megakaryocyte rupture [1]. Although platelets lack a nucleus, they possess many of the signaling pathways found in nucleated cells [2] and are known to play a major role in the maintenance of endothelial integrity and hemostasis [3]. It is now evident that platelets are in fact key mediators of thrombosis as well as inflammation [4], emphasizing their importance in development and treatment of vascular diseases.

Extracellular adenine nucleotides (ATP and ADP), adenosine and other purines mediate several events in different tissues, including the vascular system [5]. Adenosine diphosphate (ADP) is

secreted from the dense granules of stimulated platelets and it acts to potentiate platelet aggregation [2, 6]. Adenosine triphosphate (ATP) has been considered to be a competitive inhibitor of ADP-induced platelet aggregation [7]. It has been demonstrated that adenine nucleotides act on platelets via three purinergic receptors: P2X<sub>1</sub> (ionotropic receptor that causes rapid influx of calcium into the cytosol), P2Y<sub>1</sub> (metabotropic receptor that mobilizes calcium from internal stores, which starts the aggregation process) and P2Y<sub>12</sub> (receptor coupled to G<sub>βγ</sub> protein that stabilizes platelet aggregates) [8].

ADP is itself a weak platelet agonist but it plays an important role in platelet function since it amplifies

Correspondence: Dr João José Freitas Sarkis, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ICBS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Prédio ANEXO, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: 55 51 3316 5554. Fax: 55 51 3316 5540. E-mail: jjsarkis@plug-in.com.br



the platelet responses induced by other platelet agonists [9]. As such, it is very important to control extracellular nucleotide signaling in platelets. The action of nucleotides is terminated by a surface-located enzyme cascade that sequentially degrades nucleoside 5'-di and 5'-triphosphates to their respective nucleosides and free phosphate or pyrophosphate [10].

Members of several families of ectonucleotidases are able to hydrolyze extracellular nucleotides. These include ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) and ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase families (E-NPP). E-NTPDase describes a family of mammalian enzymes that catalyze the hydrolysis of  $\gamma$ - and  $\beta$ -phosphate residues of nucleosides 5'-tri and 5'-diphosphates [11]. Their catalytic activity requires the presence of divalent cations and the molecular masses of these enzymes in the glycosylated form are in the order of 70–80 kDa [12, 13]. The family of E-NPPs is known to hydrolyze 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives, resulting in the release of 5'-monophosphates [14]. They are capable of hydrolyzing 3'-5'-cAMP to AMP, ATP to AMP and PP<sub>i</sub>, ADP to AMP and P<sub>i</sub>, NAD<sup>+</sup> to AMP and nicotinamide mononucleotide and AP<sub>n</sub>A to AP<sub>n-1</sub> and AMP. These families of enzymes reveal not only overlapping tissue distributions, but also overlapping substrate specificities [12] and may also present overlapping function.

Since nucleotides exert different responses in diverse tissues, it is noteworthy that cells can co-express two or more enzymes for nucleotide hydrolysis, indicating that they may present different catalytic properties and may perform distinct physiological functions. As earlier described [15, 16], two enzymes are present on the ecto-surface of intact platelets: E-NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. This paper focuses on the description of an E-NPP activity on the rat intact platelet surface, as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis that occurs in many other rat tissues [16–19].

## Materials and methods

### Chemicals

*p*-Nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate, nucleotides, EDTA, Trizma Base, sodium azide and phenylalanine were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Sepharose 2B gel from Pharmacia was kindly donated by Dr Maria Rosa C. Schetinger and was de-aerated in a vacuum flask before packing in a polyethylene column. The LDH Liquiform Kit was purchased from Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brazil). All other reagents were of analytical grade.

### Platelet isolation

Male Wistar rats, weighing about 250 g, from our breeding stock were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle at a constant temperature room. Resting platelets were isolated exactly as previously described by Hantgan [20]. In order to obtain normal and undamaged platelet preparations, free from non-adsorbed plasma constituents, we separated platelets from plasma by means of gel filtration on a 1.5 × 7.0-cm Sepharose 2B column [21]. 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% sodium azide, pH 6.8 (Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode's buffer). Platelets were eluted with the same buffer at room temperature. Fractions containing about 0.5 ml of platelets were collected and the tubes with the maximum platelet content (visually determined) were used for subsequent experiments. Polyethylene or siliconized labware was used for all platelet isolation and incubation procedures.

### Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard [22].

### Assay of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity

The phosphodiesterase activity was assessed using *p*-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP – an artificial marker substrate that is used routinely for the *in vitro* assay of this activity) as previously outlined [23]. The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.9, was preincubated with approximately 20 µg per tube of platelet protein for 10 min at 37°C in a final volume of 200 µl. The enzyme reaction was started by the addition of *p*-Nph-5'-TMP to a final concentration of 0.5 mM. After 80 min of incubation, 200 µl NaOH 0.2 N was added to the medium to stop the reaction. An incubation time of 80 min was chosen in order to ensure the linearity of the reaction. The protein concentration used for enzyme assays was determined from experiments in which all conditions were maintained constant and the content of platelet protein was varied from 17.5 to 30 µg/tube. The amount of *p*-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of 18.8 × 10<sup>-3</sup> M/cm. Controls to correct for non-enzymatic substrate hydrolysis were performed by adding platelet preparations after the reaction had been stopped with NaOH as described above. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed

as nmol *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein.

*Assay of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) activity*

Unless otherwise stated, the reaction mixture used to assay E-NTPDase activity contained 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5, in a final volume of 200  $\mu$ l. About 20  $\mu$ g of platelet protein was added per tube and was preincubated for 10 min at 37°C. The enzyme reaction was started by the addition of 0.5 mM (final concentration) of ATP or ADP. After 60 min, trichloroacetic acid (TCA) (5% final concentration) was added to the medium to stop the reaction. Incubation time and protein concentration were chosen to ensure the linearity of the enzymatic reaction. The amount of inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) released was carried out using a colorimetric method as previously outlined [24]. Controls to correct for non-enzymatic substrate hydrolysis were performed by adding platelet preparations after the reaction had been stopped with TCA. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nmol P<sub>i</sub> released per minute per milligram of protein.

*Divalent cations dependence*

In order to verify the divalent cation dependence for *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis (E-NPP activity), Mg<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup>, in the range of 0.3–1.0 mM, was added to the reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose and 0.1 mM EDTA, pH 8.9. For control groups, EDTA was not added to the reaction medium.

*Differential effects of some compounds on ATP, ADP and p-Nph-5'-TMP hydrolysis*

The effects of 0.25 mM suramin, 0.5 mM cAMP, 0.5 mM AMP, 0.1, 1.0, 5.0, 10 and 20 mM sodium azide, 0.2 mM IBMX, 5.0 mM phenylalanine, 5.0 and 10 nM angiotensin II and 0.2 and 0.5 mM gadolinium chloride were tested for *p*-Nph-5'-TMP, ATP and ADP hydrolysis. Incubation times, substrates and protein concentrations were used exactly as described before. Results are expressed as percentage of control enzyme activity and data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Student-Neumann-Keuls *post hoc* test ( $P < 0.05$ ).

*Ethics*

All protocols were conducted in accordance with the University Ethics Committee guidelines for animal researches.

**Results**

*Platelet integrity*

The platelet preparation integrity was checked by measuring platelet lactate dehydrogenase (LDH) activity. The ratio of this enzyme activity measured in intact and disrupted platelets can be regarded as a measure of damaged particles [15]. The protocol was carried out according to the manufacturer's instructions. Triton X-100 (1%, final concentration) was used to disrupt the platelet preparation. The measurement of LDH activity showed that most cells (approximately 94%,  $n = 3$ ) were intact after the isolation procedure (data not shown).

*p-Nph-5'-TMP hydrolysis as a function of time and protein concentration*

In this study, we first investigated the *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis by intact platelets from adult rats, as a function of time and protein concentration in order to determine the best assay conditions. Platelets were incubated as described in Materials and methods with *p*-Nph-5'-TMP as substrate and the amount of *p*-nitrophenol released was determined. The time course of *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis was linear at least until 150 min (Figure 1a). We also investigated the influence of protein concentration on *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis and the *p*-nitrophenol appearance was linear for at least 30  $\mu$ g of platelet protein per tube (Figure 1b). Figure 1(a) and 1(b) are representative of three independent experiments.

*pH dependence*

E-NPPs function better at alkaline pH [25]. Tris-HCl buffering was applied in a range from pH 8.0 to 9.3 for analyzing pH dependence of *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis. We observed that the best activity was reached between pH 8.5 and 8.9 (data not shown). To exclude alkaline phosphatase contamination, we used 2.0 mM levamisole that, despite being a classical alkaline phosphatase inhibitor, is known not to inhibit phosphodiesterase activity [26]. The results suggested a proportional increase in levamisole inhibition with the increase of pH (data not shown). Therefore, pH 8.9 was chosen for experimental procedures, on the basis of results showing that, at this pH, levamisole did not affect the *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis.

*Biochemical properties of p-Nph-5'-TMP hydrolysis*

Intact platelet preparations promoted the *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis with a specific activity of  $2.894 \pm 0.099$  nmol *p*-nitrophenol released/min/mg of protein (mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ ) in the presence of 0.5 mM *p*-Nph-5'-TMP (Figure 2, inset). Michaelis constant ( $K_m$ ) and  $V_{max}$  values were calculated from

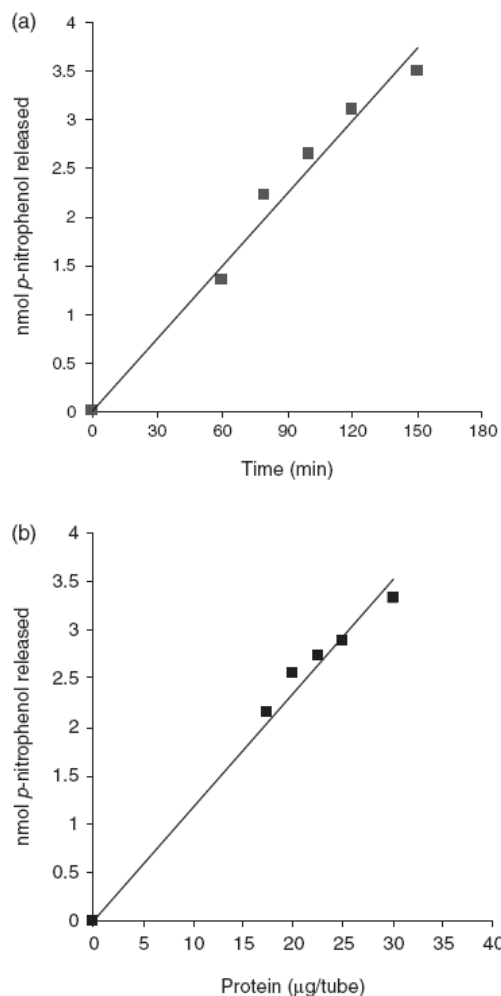


Figure 1. Progress curve of *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis as a function of time (a) and platelet protein concentration (b). For the time curve, the protein concentration used was 20 µg/tube and for the protein curve, the time of incubation was 80 min. The enzyme assays are described in Material and methods. Data are representative of three independent experiments.

an Eadie-Hofstee plot (Figure 2) with *p*-Nph-5'-TMP as substrate. The range of *p*-Nph-5'-TMP tested was from 50 to 750 µM. The  $K_m$  value corresponded to  $106.22 \pm 17.83$  µM (mean  $\pm$  SD,  $n=5$ ) and the maximal velocity ( $V_{max}$ ) value calculated was  $3.44 \pm 0.18$  nmol *p*-nitrophenol released/min/mg of protein (mean  $\pm$  SD,  $n=5$ ). The Eadie-Hofstee plot was obtained from five independent experiments (Figure 2).

As shown in Figure 3, the 0.5 mM *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis by platelet preparations was only slightly increased by  $Mg^{2+}$  ( $2.26 \pm 0.37$ , mean  $\pm$  SD,  $n=5$ ), in a non-significant manner, when compared to the control group ( $2.08 \pm 0.29$ , mean  $\pm$  SD,  $n=5$ )

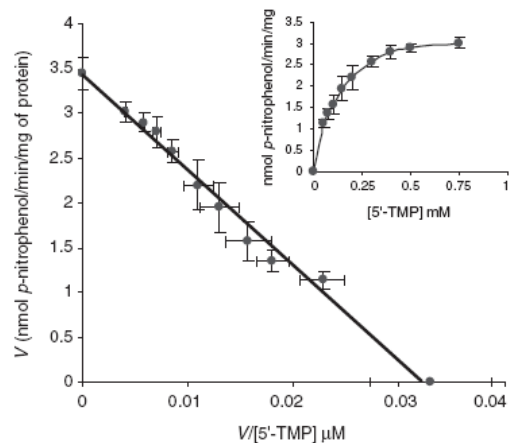


Figure 2. Eadie-Hofstee plot for *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis. The substrate concentrations tested ranged from 0.05 to 0.75 mM. The *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis by E-NPP activity as function of substrate concentration from intact platelets is shown in the inset. The  $K_m$  value corresponded to  $106.22 \pm 17.83$  µM and the maximal velocity ( $V_{max}$ ) value calculated was  $3.44 \pm 0.18$  nmol *p*-nitrophenol released/min per mg of protein. The Eadie-Hofstee plot was obtained with mean values  $\pm$  SD for five independent experiments.

without cation addition. On the other hand, E-NPP activity was greatly stimulated by 0.5 mM  $Ca^{2+}$  ( $3.19 \pm 0.17$ , mean  $\pm$  SD,  $n=5$ ). Increasing concentrations of EDTA (0.02, 0.05 and 0.1 mM) completely abolished the E-NPP activity. Growing concentrations of divalent cations added to the reaction mixture containing 0.1 mM EDTA recovered, at least in part, E-NPP activity. Moreover, no cation concentration was able to fully recover the maximal enzyme activity obtained in control groups with cation addition. These results will be further discussed and demonstrated that the E-NPP activity described here is cation dependent, as are the other enzymes involved in extracellular nucleotide hydrolysis.

#### Differential effects of some compounds on ATP, ADP and *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis

In order to verify differences between the already characterized enzyme (E-NTPDase) in platelets and the enzymatic activity proposed in this work (E-NPP), we investigated the possibility that these enzymes differ regarding their sensitivity to distinct compounds that have been reported to affect ATP and ADP hydrolysis as well as E-NPP activity [19, 27-33]. ATP, ADP and *p*-Nph-5'-TMP (0.5 mM) were chosen as substrates (Table I). The E-NPP assays were performed at pH 8.9, while E-NTPDase activity determinations were made at pH 7.5. Cyclic AMP (0.5 mM), sodium azide (0.1 and 1.0 mM), IBMX (0.2 mM) and phenylalanine (0.5 mM) had no effect on ATP, ADP

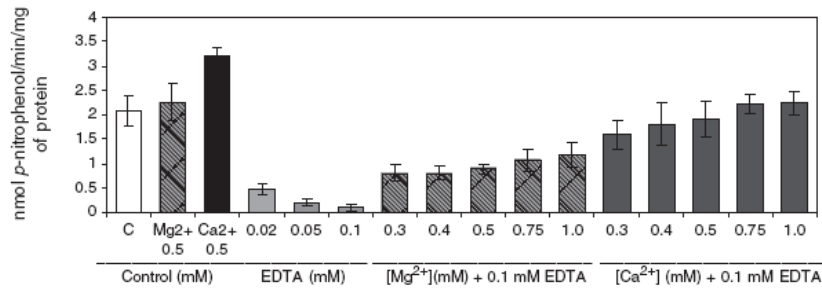


Figure 3. Divalent cations dependence on *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis. Hydrolysis of *p*-Nph-5'-TMP by intact platelets preparations was analyzed in the absence of cations (C), in the presence of 0.5 mM Mg<sup>2+</sup> (Mg<sup>2+</sup> 0.5), 0.5 mM Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup> 0.5). EDTA in a range from 0.02 to 0.1 mM was used to remove the enzyme activity. The activity recovery was obtained in the presence of 0.1 mM EDTA plus a cation concentration (0.3–1.0 mM calcium or magnesium) as shown in the figure. Bars represent means  $\pm$  SD for five independent experiments. Results are expressed as nmol *p*-nitrophenol released per min per mg of protein.

Table I. Differential effects of distinct compounds on *p*-Nph-5'-TMP, ATP and ADP hydrolysis.

Compound	Concentration	% of control enzyme activity		
		E-NPP	ATPase	ADPase
Suramin	0.25 mM	34.08 $\pm$ 2.56*	91.96 $\pm$ 2.36*	61.49 $\pm$ 5.05*
cAMP	0.50 mM	93.99 $\pm$ 1.65	102.37 $\pm$ 3.53	89.27 $\pm$ 7.35
AMP	0.50 mM	26.63 $\pm$ 2.41*	99.84 $\pm$ 12.97	97.75 $\pm$ 5.06
Sodium azide	0.10 mM	99.73 $\pm$ 2.58	112.12 $\pm$ 2.50	105.68 $\pm$ 6.73
	1.00 mM	93.90 $\pm$ 2.99	90.01 $\pm$ 5.10	104.83 $\pm$ 5.25
	5.00 mM	100.69 $\pm$ 6.04	72.55 $\pm$ 6.57*	66.62 $\pm$ 13.53*
	10.0 mM	100.10 $\pm$ 4.19	75.10 $\pm$ 6.18*	73.32 $\pm$ 3.37*
IBMX	20.0 mM	106.84 $\pm$ 4.19	56.17 $\pm$ 10.61*	67.73 $\pm$ 7.01*
	0.20 mM	101.94 $\pm$ 4.64	93.44 $\pm$ 6.15	94.41 $\pm$ 9.16
Phenylalanine	5.00 mM	90.05 $\pm$ 2.02	99.74 $\pm$ 5.21	96.26 $\pm$ 11.39
Angiotensin II	5.00 nM	103.64 $\pm$ 5.35	92.63 $\pm$ 17.30	119.34 $\pm$ 13.44**
	10.0 nM	100.61 $\pm$ 3.66	98.52 $\pm$ 11.19	121.96 $\pm$ 16.24**
Gadolinium chloride	0.20 mM	91.48 $\pm$ 5.30	69.35 $\pm$ 9.33**	69.43 $\pm$ 8.33**
	0.50 mM	87.25 $\pm$ 7.56	0***	12.20 $\pm$ 4.08***

Results are expressed as mean  $\pm$  SD of four experiments for *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis (pH 8.9) and three experiments for ATP and ADP hydrolysis (pH 7.5). Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Student-Neumann-Keuls *post hoc* test.

\*Represents difference from control enzyme activity (100%) ( $P < 0.05$ ).

\*\*Represents difference from control enzyme activity (100%) ( $P < 0.01$ ).

\*\*\*Represents difference from control enzyme activity (100%) ( $P < 0.001$ ).

Data are expressed as percentage of control enzyme activity. The 100% values correspond to  $3.85 \pm 0.55$  nmol *p*-nitrophenol/min per mg of protein for *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis and  $5.35 \pm 0.21$  and  $3.72 \pm 0.55$  nmol P<sub>i</sub>/min per mg of protein for ATP and ADP hydrolysis, respectively.

and *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis. Suramin (0.25 mM) strongly inhibited the hydrolysis of *p*-Nph-5'-TMP and ADP by approximately 66 and 38.5%, respectively. Suramin 0.25 mM also significantly inhibited ATP hydrolysis. The hydrolysis of *p*-Nph-5'-TMP was also inhibited by AMP (0.5 mM) by about 73%, while ATP and ADP hydrolysis were not affected, suggesting the presence of two distinct enzyme activities on the ecto-surface of platelets. Although no inhibition was obtained with 0.1 and 1.0 mM sodium azide, this compound at final concentrations of 5.0, 10 and 20 mM inhibited ATP (27, 25 and 44%, respectively) and ADP hydrolysis (33, 27 and 32%, respectively) in a parallel manner. Angiotensin II (5.0 and 10 nM) increased the ADP hydrolysis by about 19 and 21%, respectively, but did not change *p*-Nph-5'-TMP and ATP hydrolysis.

Gadolinium chloride inhibited ATP and ADP hydrolysis with a similar pattern: when tested at a final concentration of 0.2 mM, this compound decreased both hydrolysis by approximately 30%. When tested in a final concentration of 0.5 mM, gadolinium chloride completely abolished the ATP hydrolysis and reduced the ADP hydrolysis by about 88%. Finally, this compound have no significant effect upon the hydrolysis of *p*-Nph-5'-TMP.

## Discussion

Ecto-nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases are glycoproteins capable of hydrolyzing phosphodiester bonds of nucleotides and nucleic acids, and pyrophosphate bonds of nucleotides and nucleotide sugars [27, 34]. Members of the E-NPP

family include the murine plasma cell differentiation antigen (NPP1), NPP2 (PD- $I\alpha$ , autotaxin) and NPP3 (PD- $I\beta$ , B10, gp130<sup>RB13-6</sup>) (see [35] and references therein). They show a distinct but overlapping distribution and have been detected in almost all tissues [25]. Multiple physiological roles for E-NPPs have been related, including nucleotide recycling and modulation of purinergic receptor signaling [14].

In this study, we describe an enzyme activity from intact rat platelets that shares the major biochemical properties already described for E-NPPs. Maximal catalytic activity is adapted to the extracellular environment, since we have performed the LDH protocol to ensure the preparation integrity. As mentioned before in the Results section, the content of undamaged platelets used for experimental procedures was approximately 94% after the isolation procedures. In addition, it has been proposed that the catalysis by ecto-nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases occurs by a two-step mechanism: in the first, a covalent, nucleodilated intermediate is generated and in the second, a nucleoside 5'-monophosphate is released [27]. The optimum pH for E-NPPs is in the alkaline range (8.5–9.0), since the hydrolysis of the nucleodilated intermediate occurs at this pH [25]. Using a Tris-HCl buffering system, we observed that the best enzyme activity was between pH 8.5 and 8.9. These pH values are in accordance with those previously described for E-NPPs. A pH of 8.9 was chosen to perform the enzyme assays, since at lower pH values (8.0–8.5), the specific activity was decreased and at higher pH values (9.1–9.3) levamisole inhibition was greater, suggesting a possible alkaline phosphatase activity in this pH range. In addition, the kinetic constants for NPP reaction are characterized by a  $K_m$  value ranging from 50 to 500  $\mu\text{M}$  and a  $V_{\text{max}}$  of 5–300  $\mu\text{mol}/\text{min}$  per mg enzyme [36, 37]. The  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  values calculated for *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis by intact platelet preparations were found to be approximately  $106.22 \pm 17.83 \mu\text{M}$  and  $3.44 \pm 0.18 \text{ nmol } p\text{-nitrophenol}/\text{min}$  per mg of protein, respectively (mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ ) (Figure 2).

The role of divalent cations in the E-NPPs is a subject of particular interest because of the presence of a partial EF-hand motif within these molecules [38]. Moreover, it has been demonstrated that E-NPPs are metalloenzymes, as their activity is blocked by metal chelators (such as EDTA) but can be restored by addition of divalent cations like  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ([25] and Refs therein). The enzyme described in this study is activated by divalent metal cations ( $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ ) when compared to control group without cation addition (Figure 2), but the increase in enzyme activity was much more effective for calcium than magnesium addition. EDTA 0.1 mM added

to the reaction mixture abolished the E-NPP activity almost completely. The activity was not fully restored with cation addition in a medium containing EDTA, probably because an endogenous ion and/or an activator from platelet preparation was chelated and was not recovered with cation addition. Moreover, we observed that the restoration of enzyme activity was more pronounced for  $\text{Ca}^{2+}$ , possibly because EDTA preferentially chelates magnesium over calcium.

The possible presence of a multiple system for nucleotide hydrolysis in rat platelets, constituted by the already described enzyme, E-NTPDase [15], and the enzyme activity presented in this study (E-NPP) became more evident since *p*-Nph-5'-TMP ATP and ADP hydrolysis presented different responses regarding distinct compounds tested on these enzyme activities (Table I). Suramin, a P2 receptor antagonist and an inhibitor of E-NTPDase [29] and E-NPP [31] activities, significantly reduced both enzymatic activities when ATP, ADP or *p*-Nph-5'-TMP were used as substrates. AMP (0.5 mM) only decreased the *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis and this result is in agreement with previous reports reporting that AMP competitively inhibits the NPP reaction [13, 39], probably because it occupies the catalytic site as a product of the NPP reaction [27]. Additionally, just ATP and ADP hydrolysis were reduced in a parallel manner by upper sodium azide concentrations (5.0, 10 and 20 mM). This compound is known to be a classical ATPase inhibitor at 0.1 mM and in high concentrations (5.0, 10 and 20 mM) can also act as an E-NTPDase inhibitor [19]. The *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis was not affected by sodium azide at any concentration, enhancing the possibility of a co-existence of, at least, two enzyme activities responsible for di- and tri-phosphate nucleotide hydrolysis in rat platelets. Angiotensin II is a vasoconstrictor peptide that is known to participate in the thrombotic process [40] and, in this manner, could modulate the enzymes responsible for nucleotide extracellular degradation. This hormone at 5.0 and 10 nM increased the ADP hydrolysis but did not affect the hydrolysis of *p*-Nph-5'-TMP and ATP. Although its mode of action remains unclear, gadolinium has been described as the most potent inhibitor for both membrane-bound and soluble E-NTPDases [33]. In this work, we demonstrate that ATP and ADP hydrolysis were significantly inhibited by 0.2 and 0.5 mM gadolinium chloride, while no effect was observed on the hydrolysis of *p*-Nph-5'-TMP, once more suggesting the presence of an E-NPP activity in platelets with different biochemical properties from E-NTPDase. The set of results presented in this study reinforces our hypothesis of the possible co-localization of E-NTPDase and E-NPP activities that, together with an ecto-5'-nucleotidase, could constitute

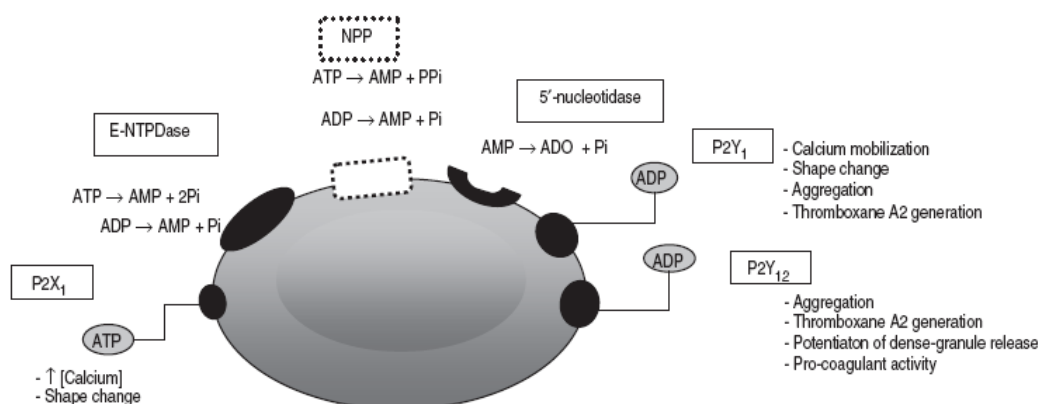


Figure 4. A multiple system for nucleotide hydrolysis by intact platelets from rats. This figure summarizes the purpose of this study, showing the possible co-expression of E-NTPDase, E-NPP and 5'-nucleotidase on the platelet ecto-surface. P2 receptors (P2X<sub>1</sub>, P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub>), by which adenine nucleotides (ATP and ADP) act promoting platelet shape change and aggregation, are also represented.

a multienzymatic complex for the complete nucleotide hydrolysis in the ecto-surface of intact rat platelets.

Previous studies have reported that cells and tissues can co-express distinct ectonucleotidases that share common characteristics [16–19]. The enormous molecular diversity and overlapping tissue distribution of the members of the E-NTPDase and E-NPP families make it difficult to assign specific functions to these enzymes in individual tissues [10]. However, since these enzymes present different kinetic properties, they can act under distinct physiological conditions and can be differently regulated. By converting ADP, released from aggregated platelets, to AMP, the platelet E-NTPDase may play an important role in the prevention of microthrombus formation [15]. In addition, phosphodiesterases may act as 'guard dogs' to prevent subversion of the cell by destroying incoming DNA or RNA [41].

The proposal of the present study is summarized in Figure 4: platelets could co-express both previously described enzymes E-NTPDase and ecto-5'-nucleotidase together with an E-NPP, comprising a multiple system for extracellular nucleotide hydrolysis by platelets. This complex may be important for the termination of signaling via extracellular nucleotides. Extracellular ATP and ADP act on platelets through surface-located purinoceptors (P2 receptors), which are potent targets for antiplatelet therapies development. The E-NPP described in this study represents a novel insight into platelet purinergic signaling. Therefore, further studies in order to provide physiological functions for this enzyme in platelets will be necessary to improve the possibilities of antiplatelet therapies and the treatment of vascular diseases.

#### Acknowledgements

We thank Dr Maria Rosa C. Schetinger for providing Sepharose 2B gel. We also thank Dr Dalton Vassallo for kindly providing gadolinium chloride (Sigma Co.). This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. C.R.F. was a recipient of CNPq fellowship.

#### References

- Mesa MG, Alfonso CC. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cub Angiol y Cir Vas* 2000;1:132–141.
- Clutton P, Fols JD, Freedman JE. Pharmacological control of platelet function. *Pharmacol Res* 2001;44:255–264.
- Birk AV, Bubman D, Broekman MJ, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, Szeto HH. Role of a novel nucleotide phosphohydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: Hemostasis, thrombosis, and vascular biology. *J Lab Clin Med* 2002;139:116–124.
- Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev* 2003;2:15–28.
- Yegutkin GG, Sambruski S, Jalkanen S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J* 2003;17:1328–1330.
- Qawi I, Robson SC. New developments in anti-platelet therapies: Potential use of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase in thrombotic disorders. *Curr Drug Targets* 2000;1:285–296.
- Coade SB, Pearson JD. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res* 1989;65:531–537.
- André P, Delaney S, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, Koller B, Phillips DR, Conley P. P2Y<sub>12</sub> regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003;112:398–406.
- Cattaneo M, Gachet C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1999;19:2281–2285.
- Zimmermann H. Two novel families of ectonucleotidases: Molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:231–236.

11. Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJG, Sévigny J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 2004;43:5511–5519.
12. Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001;52:44–56.
13. Goding JW. Ecto-enzymes: Physiology meets pathology. *J Leukocyte Biol* 2000;67:285–311.
14. Goding JW, Grobden B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 2003;1638:1–19.
15. Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JFF. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol Cell Biochem* 1993;129:47–55.
16. Furstenau CR, Spier AP, Rucker B, Berti SL, Battastini AMO, Sarkis JFF. The effect of ebselen on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats. *Chem Biol Interact* 2004;148:93–99.
17. Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem* 1999;262:102–107.
18. Kukulski F, Komoszynski M. Purification and characterization of NTPDase 1 (ecto-apyrase) and NTPDase 2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *Eur J Biochem* 2003;270:3447–3454.
19. Osés JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rucker B, Furstenau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AMO, Sarkis JFF. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci* 2004;74:3275–3284.
20. Hantgan RR. A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change. *Blood* 1984;64:896–906.
21. Tangen O, Berman HJ, Marfey P. A new technique for separation of blood platelets from plasma. *Thromb Diath Haemorrh* 1971;25:268–278.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
23. Sakura H, Nagashima S, Nakahima A, Maeda M. Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: A novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thromb Res* 1998;91:83–89.
24. Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375–380.
25. Bollen M, Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000;35:393–432.
26. Constantopoulos A, Kafasi V, Doulas N, Liakakos D, Matsaniotis N. The effect of levamisole on phosphodiesterase activity. *Experientia* 1977;33:395–396.
27. Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 2001;276:1361–1368.
28. Knowles AF, Isler RE, Reece JF. The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1983;731:88–96.
29. Leal DBR, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CAM, Silva JEP, Morsch VM, Schetinger MR. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1721:9–15.
30. Rucker B, Osés JP, Kirst IB, Berti SL, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ. Effects of phenylalanine and phenylpyruvate on ATP-ADP hydrolysis. *Amino Acids* 2003;24:383–388.
31. Grobden B, Claes P, Roymans D, Esmans EL, Van Onckelen H, Slegers H. Ecto-nucleotide pyrophosphatase modulates the purinoceptor-mediated signal transduction and is inhibited by purinoceptor antagonists. *Br J Pharmacol* 2000;130:139–145.
32. Boarder MR, Hourani SM. The regulation of vascular function by P2 receptors: Multiple sites and multiple receptors. *TIPS* 1998;19:99–107.
33. Escalada A, Navarro P, Ros E, Aleu J, Solsona C, Martín-Satué M. Gadolinium inhibition of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in *Torpedo* electric organ. *Neurochem Res* 2004;29:1711–1714.
34. Vollmayer P, Clair T, Goding JW, Sano K, Servos J, Zimmermann H. Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur J Biochem* 2003;270:2971–2978.
35. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362:299–309.
36. Kelly SJ, Dardinger DE, Butler LG. Hydrolysis of phosphonate esters catalyzed by 5'-nucleotide phosphodiesterase. *Biochem* 1975;14:4983–4988.
37. Hosoda N, Hoshino S-I, Kanda I, Katada T. Inhibition of phosphodiesterase/pyrophosphatase activity of PC-1 by its association with glycosaminoglycans. *Eur J Biochem* 1999;265:763–770.
38. Lee J, Jung ID, Nam SW, Clair T, Jeong EM, Hong SY, Han JW, Lee HW, Stracke ML, Lee HJ. Enzymatic activation of autotaxin by divalent cations without EF-loop region involvement. *Biochem Pharmacol* 2001;62:219–224.
39. Landt M, Butler LG. 5'-Nucleotide phosphodiesterase: Isolation of covalently bound 5'-adenosine monophosphate, an intermediate in the catalytic mechanism. *Biochem* 1978;17:4130–4135.
40. López-Farré A, Sanchez de Miguel L, Monton M, Jimenez A, Lopez-Bloya A, Gomez J, Nunez A, Rico L, Casado S. Angiotensin II AT(1) receptor antagonists and platelet activation. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:45–49.
41. Goding JW, Terkeltaub R, Maurice M, Deterre P, Sali A, Belli SI. Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol Rev* 1998;161:11–26.

## 2. CAPÍTULO II

### ARTIGO EM PREPARAÇÃO

#### INTRODUÇÃO

Os nucleotídeos, assim como os nucleosídeos, exercem uma grande variedade de respostas teciduais mediadas por receptores (Abbracchio & Burnstock, 1998). A participação dos nucleotídeos, ATP e ADP, na regulação do fluxo sanguíneo tem se tornado cada vez mais clara. O ADP atua sobre as plaquetas regulando sua agregação e modificando sua forma (Coukell & Markham, 1997). O ATP, por sua vez, inibe competitivamente a agregação plaquetária induzida por ADP (Coade & Pearson, 1989). Além disso, o nucleosídeo adenosina é reconhecido por suas propriedades vasodilatadoras, por diminuir a pressão arterial e por inibir a agregação plaquetária (Shryock & Belardinelli, 1997).

A principal função das plaquetas está relacionada à manutenção da integridade vascular, promovendo a hemostasia primária e secundária que acontecem posteriormente a alguma lesão nos vasos sanguíneos. Desta maneira, os eventos iniciais são modulados pela exposição dos componentes do vaso sanguíneo. Conjuntamente, acontece a adesão plaquetária à matriz subendotelial e dá-se a ativação das plaquetas (Marcus *et al.*, 2003a). Entre os diferentes mecanismos de ativação plaquetária, inclui-se a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) (Blann *et al.*, 2003). A angiotensina II é um peptídeo vasoconstritor que pode participar do processo trombótico, uma vez que as



plaquetas expressam o receptor AT1 de ANG II em sua superfície (Crabos *et al.*, 1993).

A agregação plaquetária espontânea é amplamente relatada em casos de hipertensão (Pravenec *et al.*, 1992). Alguns pesquisadores têm mostrado que vários parâmetros da ativação plaquetária são normalizados com o tratamento desta doença (Blann *et al.*, 2003; Riondino *et al.*, 1999; Erne *et al.*, 1984). Fisiologicamente, a angiotensina II induz a ativação das plaquetas. Portanto, teoricamente, bloqueando-se a produção e a ação de ANGII, tanto pelo uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), quanto pelo uso de bloqueadores do receptor AT1, poderiam ser observados efeitos anti-plaquetários diretos (Larsson *et al.*, 2000; Brown & Vaughan, 2000).

Estudos anteriores demonstraram que a angiotensina II é capaz de induzir mudanças tróficas semelhantes às descritas para a hipertensão devido ao uso do antagonista não seletivo de receptores de adenosina (DPSPX) (Albino-Teixeira *et al.*, 1991). Em adição, trabalhos prévios relataram que a ativação de receptores A<sub>1</sub> de adenosina pode proteger as células cardíacas da apoptose induzida por angiotensina II, enquanto que a ativação de receptores A<sub>3</sub> confere uma cardioproteção parcial (Goldenberg *et al.*, 2003). Sabe-se ainda que a adenosina é capaz de inibir a liberação de renina – e, portanto, a síntese de mais angiotensina II –, e que este efeito é potencializado sempre que o sistema renina-angiotensina está ativado (Sousa *et al.*, 2002).

Sabe-se que as plaquetas expressam um complexo multienzimático responsável pela hidrólise extracelular de nucleotídeos em sua superfície,

constituído pelas enzimas E-NTPDase (CD39, apirase, EC 3.6.1.5), E-NPP (PDEase, EC 3.1.4.1) e ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) (Frassetto *et al.*, 1993; Fürstenau *et al.*, *In press*, 2005). A ação conjunta deste sistema de enzimas é capaz de converter ATP, ADP e AMP a adenosina.

Neste sentido, é interessante considerar que a angiotensina II pode participar do processo trombótico mediado pelas plaquetas, que o sistema renina-angiotensina está ativado durante a ativação dos trombócitos e que a adenosina, produto final da cascata de hidrólise dos nucleotídeos da adenina pelo complexo multienzimático expresso na superfície plaquetária descrito anteriormente, exerce efeitos opostos aos promovidos pela ANGII. Portanto, neste segundo trabalho, nosso objetivo foi elucidar os possíveis efeitos da angiotensina II sobre as atividades de ectonucleotidases de plaquetas intactas de ratos. Adicionalmente, levando-se em conta que a agregação plaquetária é amplamente relatada em casos de hipertensão, investigamos o efeito da hipertensão genética induzida por fenótipo sobre as hidrólises de ATP, ADP, AMP e *p*-Nph-5'TMP por plaquetas de ratos espontaneamente hipertensos em comparação com ratos *Wistar* normotensos da mesma idade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Reagentes*

Substratos (ATP, ADP, AMP e *p*-Nph-5'-TMP), angiotensina II, Trizma Base e EDTA foram comprados da *Sigma Chemical Company* (St. Louis, USA). O gel

"Sephrose 2B" (Pharmacia) foi gentilmente doado pela Dra. Maria Rosa C. Schetinger e foi deaerado em uma bomba de vácuo antes de ser empacotado em uma coluna de polietileno. Todos os demais reagentes utilizados foram de alto grau de pureza.

### *Protocolo Experimental*

Inicialmente, ratos machos *Wistar* pesando em torno de 250-300 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica, mantidos em condições controladas de temperatura e luz (24°C, 12 horas claro/ 12 horas escuro) e sob dieta com ração para ratos e água à vontade, foram sedados com éter etílico e posteriormente injetados intraperitonealmente com 5 mL de solução salina (NaCl 0.9%) ou com 5 mL de solução de angiotensina II em diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000 nM, correspondendo à doses de 5, 50, 500 e 5000 picomóis, respectivamente), conforme protocolo previamente descrito (Álvarez *et al.*, 2004). Em cada grupo experimental, 4 horas após a injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou ANGII, os animais foram decapitados, o sangue foi coletado em tubos plásticos contendo citrato de sódio a 3.8g%, e as plaquetas foram isoladas para a realização dos ensaios enzimáticos.

### *Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)*

Os animais foram obtidos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde eram mantidos em condições controladas de temperatura e luz (24°C, 12 horas claro/ 12 horas escuro) e sob dieta com ração para ratos e água à vontade. As plaquetas foram isoladas e as atividades

enzimáticas foram comparadas com as de ratos *Wistar* normotensos da mesma idade e mantidos sob as mesmas condições. Os experimentos com estes animais foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo, em São Paulo.

#### *Isolamento e Obtenção das plaquetas*

Plaquetas em repouso foram isoladas exatamente como previamente descrito por Hantgan, 1984. Com a finalidade de se obter plaquetas normais e não danificadas, elas foram separadas por gel filtração numa coluna de *Sepharose 2B* com dimensões de 1.5 X 7.0 cm (Tangen *et al.*, 1971). A coluna foi equilibrada com um tampão consistindo de 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM Hepes, 5.5 mM dextrose, 0.2 mM EGTA e 0.05g% azida de sódio, pH 6.8 (Tampão Tyrode sem  $Ca^{2+}$ ). As plaquetas foram eluídas com o mesmo tampão à temperatura ambiente. Frações de cerca de 0.5 mL foram coletadas e os tubos que apresentavam o maior conteúdo de plaquetas (determinado visualmente pela turbidez) tiveram seu conteúdo utilizado para os experimentos subseqüentes. Materiais de polietileno ou siliconizados foram utilizados para todos os procedimentos de isolamento e incubação.

#### *Determinação da Proteína*

A proteína foi determinada pelo método do Coomassie Blue, utilizando-se albumina sérica bovina como padrão (Bradford, 1976).

*Ensaio das atividades Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e Ecto-5'-nucleotidase*

O meio de reação utilizado para ensaiar a atividade E-NTPDase continha 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glicose e 5.0 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5, em um volume final de 200 µL. Aproximadamente 20 µg de plaquetas foram adicionadas por tubo e foram pré-incubadas por 10 minutos a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 0.5 mM (concentração final) de ATP ou ADP. Após 60 minutos de incubação, ácido tricloroacético (TCA), na concentração final de 5%, foi utilizado para parar a reação enzimática. O tempo de incubação e a quantidade de proteína utilizados nos ensaios foram escolhidos de maneira a garantir a linearidade da reação. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi medida a partir do método colorimétrico previamente descrito por Chan *et al.*, 1986. Os controles para corrigir a hidrólise não-enzimática do substrato foram realizados pela adição de plaquetas após a reação ter sido parada com TCA. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata e as atividades enzimáticas estão geralmente expressas como nmol Pi liberado/minuto/mg de proteína. O ensaio da enzima ecto-5'-nucleotidase foi realizado de maneira semelhante ao da E-NTPDase, com exceção de que 5.0 mM CaCl<sub>2</sub> foi substituído por 5.0 mM MgCl<sub>2</sub> e o substrato utilizado foi o AMP na concentração final de 0.5 mM.

*Ensaio da atividade Ecto-nucleotídeo pirofosfatase fosfodiesterase (E-NPP)*

A atividade fosfodiesterase foi acessada utilizando-se *p*-nitrofenil-5'-timidina monofosfato éster (*p*-Nph-5'TMP – um substrato artificial marcador que é usado

para ensaios *in vitro* desta atividade) como descrito anteriormente (Sakura *et al.*, 1998). O meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glicose e 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.9 foi pré-incubado com aproximadamente 20 µg de plaquetas por tubo por 10 minutos a 37°C, em um volume final de 200 µL. A reação foi iniciada pela adição de *p*-Nph-5'TMP 0.5 mM. Após 80 minutos de incubação, a reação foi parada com a adição de 200 µL de NaOH 0.2 N. O tempo de incubação e a quantidade de proteína foram escolhidos de maneira a assegurar a linearidade da reação. A quantidade de *p*-nitrofenol liberado foi medida a 400 nm, utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 18.8 X 10<sup>-3</sup>/M/ cm. Os controles para corrigir a hidrólise não-enzimática do substrato foram realizados pela adição de plaquetas após a reação ter sido parada com NaOH. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e as atividades enzimáticas estão geralmente expressas como nmol *p*-nitrofenol liberado/minuto/mg de proteína.

## RESULTADOS

### *Efeito da angiotensina II sobre a hidrólise de ATP, ADP, AMP e p-Nph-5'-TMP em plaquetas de ratos*

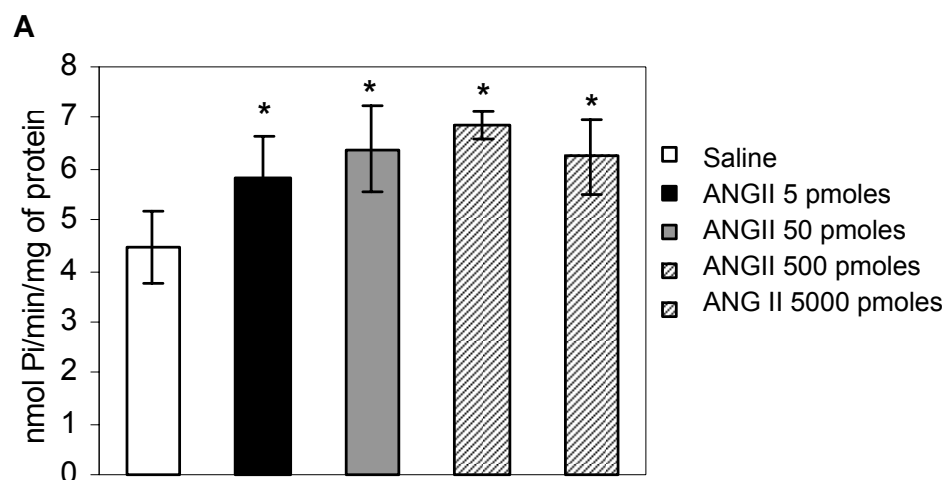
As Figuras 1A, 1B e 1C mostram que as injeções intraperitoneais de angiotensina II em diferentes doses (5, 50, 500 e 5000 picomóis) foram capazes de aumentar significativamente a hidrólise de ATP, ADP e AMP, quando comparadas ao grupo controle que recebeu uma injeção de solução salina. A hidrólise de ATP foi aumentada, em média, em 21%, 31%, 44% e 27% quando os

animais foram injetados com 5, 50, 500 e 5000 picomóis ANGII, respectivamente. Para o ADP, o aumento encontrado foi de, aproximadamente, 22%, 28%, 78% e 37%, para as mesmas doses. Com relação à hidrólise de AMP em plaquetas de ratos, a ANGII 5, 50, 500 e 5000 picomóis foi capaz de aumentá-la de maneira significativa em 40%, 64%, 60% e 64%, respectivamente. Por outro lado, nenhuma diferença significativa foi observada na hidrólise de *p*-Nph-5'TMP (Figura 1D) em nenhuma das doses de angiotensina II testadas.

*Hidrólise de ATP, ADP, AMP e p-Nph-5'TMP em plaquetas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar normotensos*

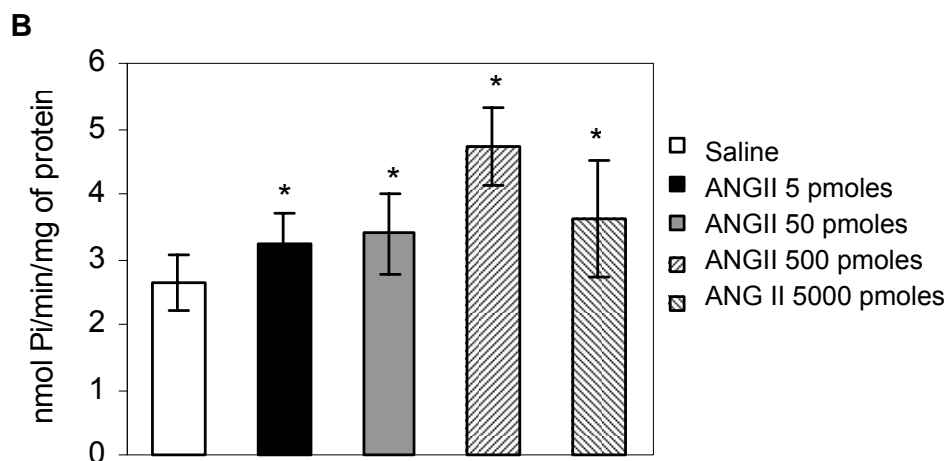
Com o objetivo de avaliar o efeito da hipertensão arterial induzida por fenótipo sobre as atividades das enzimas de degradação de nucleotídeos em plaquetas, foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos. A hidrólise de AMP foi significativamente aumentada em 144%, enquanto que a hidrólise de *p*-Nph-5'TMP sofreu um decréscimo estatisticamente significativo em torno de 27% em ratos espontaneamente hipertensos quando comparados a ratos *Wistar* normotensos da mesma idade. Entretanto, nenhuma modificação estatisticamente significativa foi observada com relação às hidrólises de ATP e ADP nas plaquetas de animais SHR em comparação aos animais *Wistar* normotensos (Figura 2).

## FIGURAS



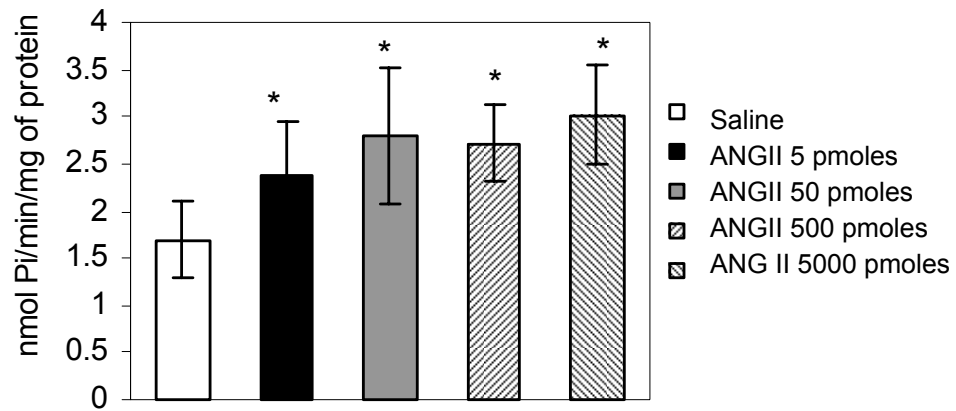
**FIGURA 1A:** Efeito da injeção intraperitoneal ANGII (5, 50, 500 e 5000 picomóis) sobre a hidrólise de ATP por plaquetas de ratos. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de, pelo menos, 6 experimentos independentes. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina que recebeu uma injeção intraperitoneal de solução NaCl 0.9%. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A diferença estatisticamente significativa foi assumida para valores de  $P < 0.05$ .



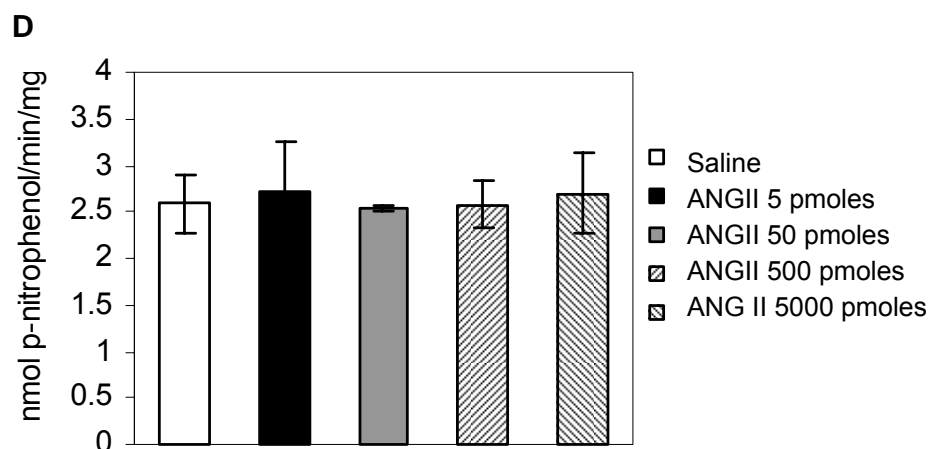


**FIGURA 1B:** Efeito da injeção intraperitoneal ANGII (5, 50, 500 e 5000 picomóis) sobre a hidrólise de ADP por plaquetas de ratos. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de, pelo menos, 8 experimentos independentes. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina que recebeu uma injeção intraperitoneal de solução NaCl 0.9%. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A diferença estatisticamente significativa foi assumida para valores de  $P < 0.05$ .

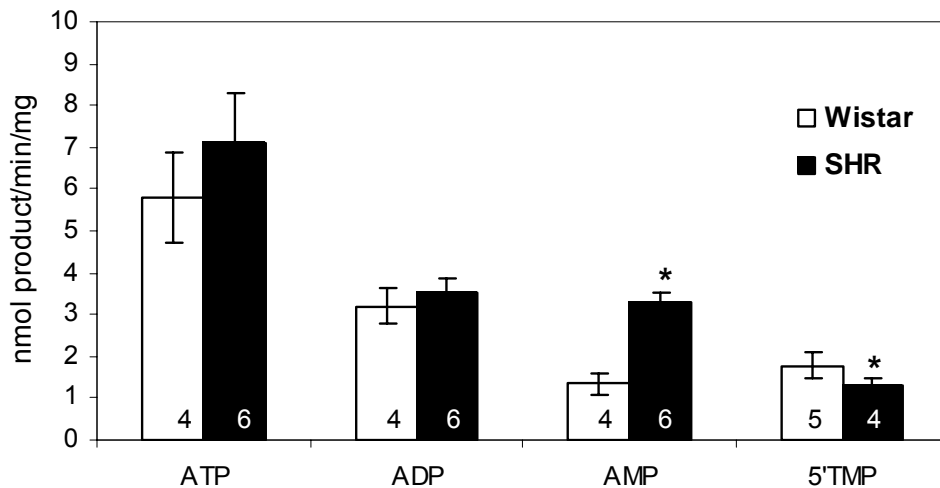
**C**



**FIGURA 1C:** Efeito da injeção intraperitoneal ANGII (5, 50, 500 e 5000 picomóis) sobre a hidrólise de AMP por plaquetas de ratos. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de, pelo menos, 7 experimentos independentes. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina que recebeu uma injeção intraperitoneal de solução NaCl 0.9%. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A diferença estatisticamente significativa foi assumida para valores de  $P < 0.05$ .



**FIGURA 1D:** Efeito da injeção intraperitoneal ANGII (5, 50, 500 e 5000 picomóis) sobre a hidrólise de *p*-Nph-5'TMP por plaquetas de ratos. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de, pelo menos, 8 experimentos independentes. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina que recebeu uma injeção intraperitoneal de solução NaCl 0.9%. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via, seguida de post hoc de Duncan. A diferença estatisticamente significativa foi assumida para valores de  $P < 0.05$ .



**FIGURA 2:** Hidrólise de ATP, ADP, AMP e *p*-Nph-5'TMP por plaquetas de ratos *Wistar* normotensos (barras brancas) e de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (barras escuras) da mesma idade. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e o número amostral está referido dentro das barras para cada grupo em cada um dos substratos avaliados. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação aos ratos *Wistar* normotensos. Os dados foram analisados utilizando-se o teste *t* de amostras independentes. A diferença estatisticamente significativa foi assumida para valores de  $P < 0.05$ .

### **PARTE III**

## 1. DISCUSSÃO

É conhecido que as plaquetas sangüíneas estão intimamente relacionadas aos processos de tromborregulação e ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Bhatt & Topol, 2002). A sinalização purinérgica no sistema vascular tem o potencial de influenciar a função cardíaca, as repostas vasomotoras, a ativação plaquetária e os processos inflamatórios (Boeynaems & Pearson, 1990; Dubyak & El-Moatassim, 1993).

O ADP é o principal fator recrutador de plaquetas originado dos grânulos densos durante a ativação das plaquetas, enquanto que o ATP, derivado da mesma fonte, é considerado um inibidor competitivo da agregação induzida por ADP via receptores P2Y (Qawi & Robson, 2000). Além disso, o ATP estimula a produção de dois importantes vasodilatadores pelas células endoteliais: a prostaciclina e o óxido nítrico (Marcus & Safier, 1993). A adenosina é reconhecidamente uma molécula capaz de induzir vasodilatação e inibir a agregação dos trombócitos (Bakker *et al.*, 1994). Neste contexto, a sinalização através dos nucleotídeos da adenina em plaquetas requer um fino mecanismo de controle, o qual pode ser alcançado, por exemplo, pela inativação do sinal via ectonucleotidases ou pelo bloqueio dos receptores de nucleotídeos.

A ação dos nucleotídeos é terminada por uma cascata enzimática que degrada seqüencialmente nucleosídeos 5'-trifosfatos até seus respectivos nucleosídeos monofosfatos e fosfato livre ou pirofosfato. Existe um número significativo de enzimas de superfície com potencial para hidrolisar os nucleotídeos extracelulares e entre elas estão as E-NTPDases e as E-NPPs

(Zimmermann, 1999). Estudos prévios tem relatado que as células e tecidos podem co-expressar ectonucleotidases distintas que compartilham características comuns (Heine *et al.*, 1999; Kukulski *et al.*, 2003; Oses *et al.*, 2004).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado alterações nas atividades das enzimas responsáveis pela degradação extracelular de nucleotídeos em diferentes condições patológicas e fisiológicas nas mais diversas frações biológicas, sendo que as ectonucleotidases de soro e plaquetas têm se mostrado particularmente alteradas. Por exemplo, um estudo realizado por Pochmann e colaboradores (2004) mostrou que a privação de hormônios esteróides aumenta significativamente as hidrólises de ATP, ADP e AMP no soro sangüíneo de ratos fêmea. Em um outro trabalho, Pochmann e colaboradores (2005) demonstraram que a privação hormonal é capaz de diminuir a atividade das enzimas que degradam nucleotídeos extracelulares da adenina em plaquetas de ratos fêmea, contribuindo para um melhor entendimento das complicações cardiovasculares relacionadas ao *status* hormonal. Além disso, também mostramos que o ebselen, um composto organo-selenado com propriedades antioxidantes, inibiu as hidrólises de ATP e ADP em plaquetas (Fürstenau *et al.*, 2004). Buffon e colaboradores (2004) evidenciaram a diminuição das hidrólises de ATP e ADP em plaquetas de ratos pelo ácido acetilsalicílico, explicando, pelo menos parcialmente, a modulação deste composto na tumorigênese.

Esta dissertação está dividida, basicamente, em duas partes. A primeira (Capítulo 1) trata da caracterização cinética e bioquímica da atividade ectonucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase em plaquetas, cujo trabalho está publicado. A segunda parte (Capítulo 2) apresenta o artigo em preparação sobre

algumas interações entre o sistema renina-angiotensina e o sistema purinérgico de plaquetas de ratos; trata, especialmente, da ação da angiotensina II e da hipertensão induzida por fenótipo, a partir da utilização de ratos espontaneamente hipertensos, sobre as enzimas responsáveis pela hidrólise extracelular de nucleotídeos nestes fragmentos citoplasmáticos.

Sabe-se que pelo menos duas ecto-enzimas estão expressas na superfície de plaquetas intactas, a E-NTPDase e a ecto-5'-nucleotidase (Frassetto *et al.*, 1993). No primeiro capítulo deste trabalho, descrevemos uma atividade enzimática em plaquetas intactas de ratos que compartilha as principais características bioquímicas já descritas para as E-NPPs: 1) um pH ótimo alcalino, sendo que a melhor atividade enzimática foi encontrada entre os pHs 8.5 e 8.9; 2) os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  calculados para a hidrólise do substrato marcador da atividade NPP (*p*-Nph-5'-TMP) pelas preparações de plaquetas intactas foram encontrados como sendo de, aproximadamente,  $106.22 \pm 17.83 \mu M$  e  $3.44 \pm 0.18 \text{ nmol } p\text{-nitrophenol/min/mg}$ , respectivamente; e 3) dependência de cátions divalentes para seu ótimo funcionamento.

Além disso, a possível presença de um múltiplo sistema responsável pela degradação extracelular de nucleotídeos em plaquetas de ratos, constituído pela enzima já descrita E-NTPDase e pela enzima E-NPP caracterizada em nosso estudo tornou-se mais evidente quando as hidrólises de ATP, ADP e *p*-Nph-5'-TMP responderam diferentemente a distintos compostos testados *in vitro* sobre estas atividades enzimáticas. Neste sentido, podemos observar que o AMP diminuiu apenas a hidrólise do *p*-Nph-5'-TMP, o que está de acordo com observações prévias de que o AMP inibe competitivamente a reação da NPP



(Landt & Butler, 1978; Goding, 2000). Outros compostos como a azida de sódio, conhecida por inibir a atividade E-NTPDase em altas concentrações, a angiotensina II e o cloreto de gadolínio alteraram apenas as hidrólises de ATP, ADP ou ambos, não apresentando qualquer efeito sobre a hidrólise do substrato marcador para a atividade E-NPP.

O conjunto de resultados apresentados no Capítulo 1 indica a presença de uma atividade ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase em plaquetas com diferentes propriedades bioquímicas da E-NTPDase. Assim, nosso estudo reforça a hipótese de co-existência das atividades E-NTPDase e E-NPP em plaquetas, as quais, em conjunto com a ecto-5'-nucleotidase, constituem um complexo multienzimático responsável pelo fino controle dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, regulando, mesmo que em parte, a função plaquetária.

A enorme diversidade molecular e a sobreposição tecidual dos membros da família E-NTPDase e E-NPP tornam difícil apontar funções específicas para estas enzimas (Goding *et al.*, 2003). No entanto, já que estas enzimas apresentam diferentes propriedades cinéticas, elas poderiam atuar sob diferentes condições fisiológicas e poderiam, portanto, ser diferentemente reguladas. Assim, a E-NTPDase poderia desempenhar um importante papel na prevenção da formação de microtrombos, convertendo o ADP liberado da plaqueta em AMP (Frassetto *et al.*, 1993), e a fosfodiesterase poderia atuar como um "cão de guarda", prevenindo a subversão da plaqueta por destruir o DNA ou o RNA indesejáveis oriundos do rompimento de outras células (Goding *et al.*, 1998) e por hidrolisar ácidos nucléicos livres liberados sob injúria tecidual e morte celular (Zimmermann, 1999).

Finalmente, a atividade E-NPP descrita neste estudo representa uma nova abordagem sobre a sinalização purinérgica em plaquetas, a qual deve ser considerada para a melhoria das terapias antiplaquetárias, bem como para o tratamento de doenças vasculares.

No segundo capítulo desta dissertação, descrevemos alguns resultados sobre a ação da angiotensina II sobre as ectonucleotidases de plaquetas. A angiotensina II, um vasoconstritor ativo, têm sido implicada na aceleração da aterosclerose. Além disso, ela também estimula a proliferação de células musculares lisas, aumenta a ativação plaquetária (Moore *et al.*, 1984) e contribui para a inflamação e estresse oxidativo (Keidar *et al.*, 1999).

Nosso primeiro conjunto de resultados (Figura 1A – 1D) mostra que a ANGII foi capaz de aumentar as hidrólises de ATP, ADP e AMP em plaquetas de ratos em todas as doses testadas (5 mL das soluções 1, 10, 100 e 1000 nM, correspondendo às doses de 5, 50, 500 e 5000 picomóis, respectivamente). Entretanto, nenhuma alteração foi observada com relação à hidrólise do *p*-Nph-5'TMP. Portanto, toda a cascata de hidrólise de nucleotídeos extracelulares que leva à formação de adenosina, uma molécula com propriedades vasodiladoras e antiplaquetárias bem reconhecidas (Shryock & Bellardinelli, 1997), parece estar ativada nos trombócitos. As diferentes respostas obtidas para os diferentes substratos testados, ATP/ADP e *p*-Nph-5'TMP, deixam claro, novamente, a presença de diferentes atividades de ectonucleotidases na superfície de plaquetas intactas de ratos, podendo-se observar diferentes modulações para as enzimas envolvidas na formação extracelular de adenosina a partir de ATP.

Quando há uma queda na pressão arterial, ocorre um aumento na secreção de renina que, por sua vez, cliva o substrato angiotensinogênio, produzindo angiotensina I. Na seqüência, acontece a formação da angiotensina II através da ação da enzima conversora de angiotensina (Silbernagl & Despopoulos, 2003). A adenosina tem sido postulada por diminuir a liberação de renina em resposta a um estímulo fisiológico (Jackson, 1991). Portanto, os resultados que obtivemos parecem apontar para um mecanismo compensatório da angiotensina II. Se, por um lado, ela é capaz de promover vasoconstrição, efeitos pressores e trombose (Ferreira & Santos, 2005), por outro lado, aumentando a hidrólise de ADP nas plaquetas, a ANGII estaria inibindo a agregação plaquetária. A inibição da agregação plaquetária por antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II já foi demonstrada em estudos anteriores (Kalinowski *et al.*, 2002). Além disso, o aumento na hidrólise de AMP estimulado pela angiotensina II nas plaquetas representa um potencial aumento dos níveis de adenosina, a qual, por um mecanismo de retroalimentação negativa, estaria inibindo a secreção de renina e, portanto, a liberação de mais angiotensina II.

A Figura 2 mostra um aumento na hidrólise de AMP e uma diminuição na hidrólise de *p*-Nph-5'TMP em plaquetas de ratos espontaneamente hipertensos quando comparados a ratos *Wistar* normotensos. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são um modelo genético de hipertensão amplamente aceito por causa das características que compartilham com a hipertensão em humanos (Okamoto, 1969). O aumento na hidrólise de AMP encontrado indica, novamente, um potencial aumento nos níveis de adenosina circulantes nestes animais, talvez na tentativa de um restabelecimento da homeostasia entre os efeitos da elevação

da pressão arterial neste modelo animal e os efeitos vasodilatadores da adenosina. A diminuição na hidrólise do substrato marcador para a fosfodiesterase e a não alteração nas hidrólises de ATP e ADP indica, mais uma vez, a presença de um sistema multienzimático para a hidrólise de nucleotídeos em plaquetas. Estudos têm demonstrado que existem claras diferenças entre ratos SHR e ratos normotensos com respeito a mecanismos envolvidos na patologia da hipertensão, sobretudo sobre o sistema nervoso simpático; porém, a etiologia da hipertensão nestes animais permanece desconhecida (Triantafyllidi *et al.*, 2004). Portanto, estudos mais aprofundados são necessários para a melhor compreensão do resultado obtido em nosso estudo.

Os resultados apresentados no Capítulo 2 estão em fase de complementação. Estamos desenvolvendo estudos com a finalidade de observar através de qual mecanismo a angiotensina II interfere na hidrólise dos nucleotídeos da adenina em plaquetas. Neste sentido, estamos utilizando o antagonista do receptor AT<sub>1</sub> de ANGII, losartan. Os primeiros resultados apontam para um efeito do antagonista no sentido de prevenção no aumento das hidrólises causados pela angiotensina II. Além disso, pretendemos complementar nossos resultados avaliando, molecularmente, se a alteração nas hidrólises é acompanhada por uma alteração na expressão das respectivas enzimas.

## **2. CONCLUSÕES**

De maneira geral, esta dissertação traz a caracterização cinética, bem como o estudo de algumas propriedades bioquímicas, da enzima ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase na superfície de plaquetas intactas de ratos. Isto seria parte de um complexo sistema para a hidrólise de nucleotídeos e representaria uma nova abordagem da sinalização purinérgica nestes fragmentos citoplasmáticos, podendo contribuir para o desenvolvimento de terapias antiplaquetárias e para o tratamento de doenças vasculares.

Em adição, apresentamos alguns resultados demonstrando interações entre os sistemas angiotensinérgico e adenosinérgico em plaquetas de ratos, o que poderá contribuir para o melhor entendimento e o tratamento de doenças cardiovasculares como hipertensão e arteriosclerose.

## REFERÊNCIAS

ABBACHIO MP, BURNSTOCK G. Purinoceptores: are there families of P<sub>2x</sub> and P<sub>2y</sub> purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64: 445-475, 1994.

ABBACHIO MP, BURNSTOCK G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78: 113-145, 1998.

AKDEMIR R, ÖZHAN H, YAZICI M, GUNDUZ H, DURAN S, GUREL C, OZDAS S, UYAN C, BASAR I, ULUTIN T. In vivo effect of losartan on platelet aggregation in patients with hypertension. *Heart Vessels* 19: 167-171, 2004.

ALBINO-TEIXEIRA A, MATIAS A, POLÓNIA J, AZEVEDO L. Blockade of adenosine receptors causes hypertension and cardiovascular structural changes in the rat. *J Hypertens* S9: 196-197, 1991.

ÁLVAREZ A, CERDÁ-NICOLÁS M, NABAH YNA, MATA M, ISSEKUTZ AC, PANÉS A, LOBB RR, SANZ MJ. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood*, 104: 402-408, 2004.

ANDRÉ P, DELANEY S, LAROCCA T, VINCENT D, DEGUZMAN F, JUREK M, KOLLER B, PHILLIPS DR, CONLEY P. P<sub>2Y12</sub> regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 112: 398-406, 2003.

BAKKER WW, POELSTRA A, BARRADAS K, MIKHAILIDIS MA. Platelets and ectonucleotidases. *Platelets* 5: 121-129, 1994.

BATTASTINI AMO, ROCHA JB, BARCELOS CK, DIAS RD, SARKIS JJF. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res* 16: 1303-1310, 1991.

BHATT DL, TOPOL EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev* 2: 15-28, 2002.

BITHELL TC. The physiology of primary hemostasis. In: *Clinical Hematology*, Winstrobe's. 19<sup>a</sup> edition, Lea & Febinger ed., 1993. 539 – 556.

BLANN AD, NADAR S, LIP GYH. *Hypertension* 42: 1-7, 2003.

BOARDER MR, HOURANI SMO. The regulation of vascular function by P2 receptor: multiple sites and multiple receptors. *TiPS* 19: 99-107, 1998.

BOEYNAEMS JM, PEARSON JD. P2 purinoceptors on vascular endothelial cells: physiology significance and transduction mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 11: 34-37, 1990.

BOLLEN M, GIJSBERS R, CEULEMANS H, STALMANS W, STEFAN C.  
Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. Crit Rev  
Biochem Mol Biol 35: 393-432, 2000.

BONAN CD, SCHETINGER MRC, BATTASTINI AMO, SARKIS JJF.  
Ectonucleotidases and synaptic plasticity: implications in physiological and  
pathological conditions. Drug Dev Res 52: 57-65, 2001.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem,  
72: 248-254, 1976.

BROWN NJ, VAUGHAN DE. Prothrombotic effects of angiotensin. Adv Intern Med,  
45: 419-429, 2000.

BUFFON A, RIBEIRO VB, FÜRSTENAU CR, BATTASTINI AMO, SARKIS JJF.  
Acetylsalicylic acid inhibits ATP diphosphohydrolase activity by platelets from  
adult rats. Clin Chim Acta 349: 53-60, 2004.

BURNSTOCK G. Introduction: P2 receptors. Curr Top Med Chem 4: 793-803,  
2004.

CATTANEO M, GACHET C. The platelet ADP receptors. Haematologica 86: 346-  
348, 2001.



CHAN K, DELFERT D, JUNGER KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal Biochem*, 157: 375-380, 1986.

COADE SB, PEARSON JD. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res* 65: 531-537, 1989.

COLMAN RW. Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation. *FASEB J* 4: 1425-1435, 1990.

COUKELL AJ, MARKHAM A. Clopidogrel. *Drugs* 54: 745-750, 1997.

CRABOS M, BERTSCHIN S, BUHLER FR, ROGG H, EVEQUOZ D, EBERHARD M, ERNE P. Identification of AT1 receptors on human platelets and decreased angiotensin II binding in hypertension. *J Hypertens Suppl* 11: S230-S231, 1993.

DAVEY FR. Plaquetas e doenças plaquetárias. In: *Diagnósticos clínicos e condutas terapêuticas por exames laboratoriais*. 17.ed. São Paulo: Editora Manole Ltda. 1982, p. 1211 – 1233.

DUBYAK GR, EL-MOATASSIM C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *AM J PHYSIOL* 265: C577 - C606, 1993.

ERNE P, BOLLI P, BURGISSER E, BUHLER FR. Correlation of platelet calcium with blood pressure: effect of antihypertensive therapy. *N Engl J Med* 310: 1084 – 1088, 1984.

FERREIRA AJ, SANTOS RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 38: 499-507, 2005.

FRASSETTO SS, DIAS RD, SARKIS JJF. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol Cell Biochem* 129: 47-55, 1993.

FREDHOLM BB, ABBRACHIO MP, BURNSTOCK G, DUBYAK GR, HARDEN TK, JACOBSON KA, SCHWABE U, WILLIAMS M. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18: 79-82, 1997.

FÜRSTENAU CR, SPIER AP, RÜCKER B, BERTI SL, BATTASTINI AMO, SARKIS JJF. The effect of ebselen on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats. *Chem Biol Interact* 148: 93-99, 2004.

FÜRSTENAU CR, TRENTIN DS, BARRETO-CHAVES MLM, SARKIS JJF. Ecto-Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets*, *In press*, 2005.

GACHET C, HECHLER B. The platelet P2 receptors in thrombosis. *Sem Thromb Hemost* 31: 162-167, 2005.

GASPARO M, CATT KJ, INAGAMI T, WRIGHT JW, UNGER TH. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 54: 415-472, 2000.

GODING JW, TERKELTAUB R, MAURICE M, DETERRE P, SALI A, BELLI SI. Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol Rev* 161: 11-26, 1998.

GODING JW. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *J Leukocyte Biol* 67: 285-311, 2000.

GODING JW, GROBBEN B, SLEGERS H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638: 01-19, 2003.

GOLDENBERG I, SHAINBERG A, KENNETH AJ, SHNEYVAYS V, GROSSMAN E. Adenosine protects against angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiocyte cultures. *Mol Cell Biochem* 252: 133-139, 2003.

GROBBEN B, CLAES P, ROYMANS D, ESMANS EL, VAN ONCKELEN H, SLEGERS H. Ecto-nucleotide pyrophosphatase modulates the purinoceptor-

mediated signal transduction and it is inhibited by purinoceptor antagonists. *Br J Pharmacol* 130: 139-145, 2000.

HANTGAN RR. A study of the kinetic ADP-triggered platelet shape change. *Blood*, 64: 806-906, 1984.

HEINE P, BRAUN N, HEILBRONN A, ZIMMERMANN H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem* 262:102-7, 1999.

HERBENER GH, DEAN WL. Immunocytochemical localization of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase polypeptide in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 848-854, 1988.

HOLMSEN H. Nucleotide metabolism of platelets. *Ann Rev Physiol* 47: 677-690, 1985.

ITALIANO JR JE, SHIVDASANI RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost* 1: 1174-1182, 2003.

JACKSON EK. Adenosine: a physiological brake on renine release. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 31: 01-35, 1991.

JIN RC, VOESTCH B, LOSCALZO J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* 12: 247-258, 2005.

KACZMAREK E, KOZIAK K, SÉVIGNY J, SIEGEL JB, ANRATHER J, BEAUDOIN AR, BACH FH, ROBSON SC. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 271: 33116-33122, 1996

KALINOWSKI L, MATYS T, CHABIELSKA E, BUCZKO W, MALINSKI T. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonists inhibit platelet adhesion and aggregation by nitric oxide release. *Hypertension* 40: 521-527, 2002.

KAWASHIMA Y, TOSHIRO N, NINOMIYA H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96: 2157-2162, 2000.

KAWAZAKI H, CLINE JR WH, SU C. Enhanced angiotensin-mediated facilitation of adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 221: 112-116, 1982.

KEIDAR S, ATTIAS J, HEINRICH R, COLEMAN R, AVIRAM M. Angiotensin II atherogenicity in apolipoprotein E deficient mice is associated with increased cellular cholesterol biosynthesis. *Atherosclerosis* 146: 249-257, 1999.

KUKULSKI F, KOMOSZYNSKI M. Purification and characterization of NTPDase 1 (ecto-apyrase) and NTPDase 2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *Eur J Biochem* 270:3447-54, 2003.

KUNAPULI SP, DANIEL JL. P<sub>2</sub> receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* 336: 513-523, 1998.

LANDT M, BUTLER LG. 5'-Nucleotide phosphodiesterase: isolation of covalently bound 5'-adenosine monophosphate, an intermediate in the catalytic mechanism. *Biochem* 17: 4130-4135, 1978.

LARSSON PT, SCHWIELER JH, WALLEN NH. Platelet activation during angiotensin II infusion in healthy volunteers. *Blood Coagul and Fibrinolysis*, 11: 61-69, 2000.

LAVOIE EG, KUKULSKI F, LÉVESQUE SA, LECKA J, SÉVIGNY J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. *Biochem Pharmacol* 67: 1917 – 1926, 2004.

LAZAROWSKI ER, BOUCHER RC, HARDEN TK. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem* 275: 31061-31068, 2000.

LOPEZ-FARRÉ A, DE MIGUEL LS, MONTÓN M, JIMÉNEZ A, LOPEZ-BLOYA A, GÓMEZ J, NÚÑEZ A, RICO L, CASADO S. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonists and platelet activation. *Nephrol Dial Transplant* 16: 45-49, 2001.

LUTHJE J, OGILVIE A. The presence of diadenosine 5',5''-p<sup>1</sup>,p<sup>3</sup>-triphosphate (Ap<sub>3</sub>A) in human platelets. *Biochem Biophys Res Com* 115: 253-260, 1983.

MARCUS AJ, SAFIER LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 7: 516-522, 1993.

MARCUS AJ, BROEKMAN MJ, DROSOPOULOS JHF, ISLAM N, PINSKY DJ, SESTI C, LEVI R. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 09-16, 2003a.

MARCUS AJ, BROEKMAN MJ, DROSOPOULOS JHF, ISLAM N, PINSKY DJ, SESTI C, LEVI R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 1: 2497-2509, 2003b.

MARCUS AJ, BROEKMAN MJ, DROSOPOULOS JHF, OLSON K, ISLAM N, PINSKY DJ, LEVI R. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection. *Sem Thromb Haemost* 31: 234-245, 2005.

MARKS DB, MARKS AD, SMITH CM. Basic medical biochemistry – a clinical approach. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.

MESA MG, ALFONSO CC. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. Rev Cub Angiol y Cir Vas 1: 132-141, 2000.

MOORE TJ, TAYLOR T, WILLIAMS GH. Human platelet angiotensin II receptors: regulation by the circulating angiotensin level. J Clin Endocrinol Metab 58: 778-782, 1984.

MUBAGWA K, MULLANE K, FLAMENG W. Role of adenosine in heart and circulation. Cardiovasc Res 32: 797-813, 1996.

OKAMOTO K. Spontaneous hypertension in rats. In: *International review of experimental pathology*. New York: Academic Press 227-270, 1969.

OSÉS JP, CARDOSO CM, GERMANO RA, KIRST IB, RÜCKER B, FÜRSTENAU CR, WINK MR, BONAN CD, BATTASTINI AMO, SARKIS JJF. Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. Life Sci 74: 3275-3284, 2004.



POCHMANN D, RUCKER B, BATTASTINI AM, SARKIS JJ. Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Thromb Res* 114: 275-281, 2004.

POCHMANN D, BOHMER AE, NEJAR BRUNO A, SARKIS JJ. Ecto-hydrolysis of adenine nucleotides in rat blood platelets are altered by ovariectomy. *Platelets* 16: 334-339, 2005.

PRAVENEK M, Kunes J, Zicha J, Kren V, Klir P. Platelet aggregation in spontaneous hypertension: genetic determination and correlation analysis. *J Hypertens* 10: 1453-1456, 1992.

QAWI I, ROBSON SC. New developments in anti-platelet therapies: potential use of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase in thrombotic disorders. *Curr Drug Targets* 1: 285-296, 2000.

RALEVIC V, BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492, 1998.

RALEVIC V, BURNSTOCK G. Involvement of purinergic signalling in cardiovascular disease. *Drug News Perspect* 16: 133-140, 2003.

RIONDINO S, PIGNATELLI P, PULCINELLI FM, LENTI L, DI VEROLI C, MARIGLIANO V, GAZZANIGA PP. Platelet hyperactivity in hypertensive older

patients is controlled by lowering blood pressure. J Am Geriatr Soc 47: 943 – 947, 1999.

RODRIGUES JE. In: Prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos e lipoxina – aspectos bioquímicos e médicos. São Paulo: Livraria Ateneu, 1992.

RÜCKER B, POCHMANN D, FÜRSTENAU CR, CARNEIRO-RAMOS MS, BATTASTINI AMO, BARRETO-CHAVES ML, SARKIS JJF. Effects of steroid hormones on synaptosomal ectonucleotidase from hippocampus and cortex of adult female rats. Gen Compar Endocrinol 140: 94-100, 2005.

SAKURA H, NAGASHIMA S, NAKAHIMA A, MAEDA M. Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: A novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. Thromb Res, 91: 83–89, 1998.

SAKURA H, TAKEKUMA M, MATSUI H, SERIZAWA M, TAKANAKA C. Relationship between serum 5'-nucleotide phosphodiesterase activity and thrombophilia: enzyme activity in fetus and in patients with acute coronary syndrome. Thromb Res 112: 307-311, 2003.

SARKIS JJF, SALTÓ C. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. Brain Res Bull 26: 871-876, 1991.

SHRYOCK JC, BELARDINELLI L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology and pharmacology. *Am J Cardiol* 79: 02-10, 1997.

SILBERNAGL S, DESPOPOULOS A. *Fisiologia – Texto e Atlas*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

SOUSA T, MORATO M, ALBINO-TEIXEIRA A. Angiotensin converting enzyme prevents trophic and hypertensive effects of an antagonist of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* 441: 99-104, 2002.

STEFAN C, JANSEN S, BOLLEN M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 30: 542-550, 2005.

TANGEN O, BERMAN HJ, MARFEY P. A new technique for separation of blood platelets from plasma. *Thromb Diath Haemorrh*, 25: 268-278, 1971.

TRIANAFYLLIDI E, BALDWIN C, SCHWARTZ F, GAVRAS H. Study of hypertension in spontaneous hypertensive rats by sequencing the genomic DNA of  $\alpha_{2B}$  receptors. *Hellenic J Cardiol* 45: 65-70, 2004.

VASSORT G. Adenosine 5'-triphosphate: a P<sub>2</sub>-purinergic agonist in the myocardium. *Physiol Rev* 81: 767-806, 2001.

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

ZIMMERMANN H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci* 20: 231-236, 1999.

ZIMMERMANN H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309, 2000.

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

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alteração na forma da plaqueta.....	08
Figura 2 – Diferentes subtipos de receptores de ADP.....	13
Figura 3 – Prognóstico da topografia das ectonucleotidases de membrana.....	15