

## ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM ISQUEMIA CEREBRAL SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO PASSIVO

ELISE BECK DA MOTTA<sup>1</sup>; MAURICIO MACHADO FERREIRA<sup>2</sup>; GABRIELA DEBOM<sup>2</sup>; RAFAEL ORCY<sup>2</sup>; ROSELIA SPANEVELLO<sup>2</sup>; WILLIAM PERES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - UFPel – [elisemotta@yahoo.com.br](mailto:elisemotta@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção [mauricio.ferreira@hotmail.com](mailto:mauricio.ferreira@hotmail.com); [gabidebom@gmail.com](mailto:gabidebom@gmail.com); [rafaelorcy@gmail.com](mailto:rafaelorcy@gmail.com); [rspanevello@gmail.com](mailto:rspanevello@gmail.com)

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – [noty62@hotmail.com](mailto:noty62@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A taxa de sobrevivência de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) aumentou, principalmente, devido aos avanços gerais nos cuidados e na evolução das intervenções médicas e farmacológicas (MORAN, 2008).

O exercício passivo faz parte dos procedimentos aplicados a pacientes internados em UTI rotineiramente, com a finalidade de fortalecer o tônus muscular, evitar complicações respiratórias e vasculares (ALLEN, 1999).

O AVC é uma patologia decorrente da alteração no fluxo sanguíneo cerebral levando a uma baixa demanda de oxigênio e glicose para os tecidos cerebrais podendo ocasionar lesão ou morte cerebral. Esta patologia pode ser classificada como isquêmica (AVCi) ou hemorrágica (AVCh). O AVCi é altamente prevalente e é caracterizado por embolo ou trombo obstruindo a passagem sanguínea cerebral (Zemke et al., 2004).

Os nucleotídeos de adenina ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina são importantes moléculas sinalizadoras em vários tecidos (Yegutkin, 2008). No sistema vascular estas moléculas influenciam funções cardíacas, participam de respostas vasomotoras e controlam funções plaquetárias (Atkinson et al., 2006). O ADP constitui-se o principal agonista envolvido no recrutamento e agregação das plaquetas em locais de injúria vascular (Remijn et al., 2002), enquanto que o ATP em altas concentrações é inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP (Soslau & Youngprapakorn, 1997). Além disso, a adenosina é um potente inibidor da agregação plaquetária e também atua como modulador do tônus vascular. A sinalização induzida por essas moléculas correlaciona-se com a atividade das enzimas NTPDase e da 5'-nucleotidase. A NTPDase hidrolisa ATP e ADP a AMP, o qual é posteriormente degradado a adenosina pela ação da 5'-nucleotidase. Essas enzimas estão presentes na membrana das plaquetas e constituem um importante mecanismo tromboregulatório por controlar os níveis de ADP, o principal agonista de agregação plaquetária (Frassetto et al 2000).

A intensa ativação e agregação plaquetária que acometem AVCi tem a intervenção, dentre outros fatores, dos nucleotídeos ATP e ADP, que estes, por sua vez, atuam em receptores específicos nas membranas das plaquetas. Para contrabalancear esta ação pró-inflamatória há enzimas específicas que degradam estes nucleotídeos. Para contrabalancear esta ação pró-agregante há enzimas específicas que degradam estes nucleotídeos. NTPDase e 5' nucleotidase são enzimas da família das ectonucleotidases que atuam hidrolisando estes nucleotídeos (Frassetto et al 2000).

Sendo assim o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito que o exercício passivo exerce na atividade destas enzimas com 7 dias de intervenção em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico internados na UTI do hospital Universitário São Francisco de Paula na cidade de Pelotas-RS.

## 2. METODOLOGIA

Foram incluídos neste trabalho 08 pacientes com AVCi, com média de idade de  $62,4 \pm 20,7$ . Após a liberação médica para fisioterapia e o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo familiar responsável, iniciou-se o acompanhamento dos pacientes como acidente vascular cerebral isquêmico no período de novembro de 2012 a maio de 2013. Todos os pacientes desse estudo estavam internados na UTI sendo que o acompanhamento foi realizado durante 7 dias com aplicação diária da mobilização passiva.

O exercício passivo foi aplicado 5 minutos em cada membro, totalizando 20 minutos. As coletas de sangue foram realizadas no 1º dia e 7º dia. As coletas foram feitas antes do exercício (Tempo 0), imediatamente após o exercício (Tempo 20) e 40 minutos após o exercício (Tempo 60) (Figura 1). As coletas de sangue foram realizadas em tubo com citrato de sódio para separação de plaquetas pelo método de Pilla et al 1996. A atividade das enzimas NTPdase e 5' ectonucleotidase foram analisadas pelo método de verde de malaquita. Os dados foram analisados pelo Teste t de Student e os resultados foram expressos por nmol/pi liberado/min/mg de proteína.

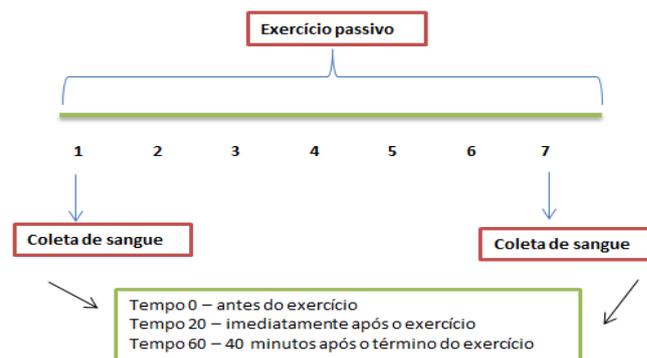


Figura 1. Esquema da intervenção com exercício passivo em pacientes com AVC – Sete dias de intervenção com exercício passivo durante 20 minutos. Coletas de sangue realizadas no primeiro e sétimo dia do acompanhamento.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a atividade da 5'-nucleotidase usando AMP como substrato foi alterada em plaquetas de pacientes AVCi após uma única sessão de exercício passivo. Os dados obtidos no primeiro dia de intervenção demonstraram que no tempo 20 ocorreu um aumento na atividade dessa enzima em relação ao tempo 0 e ao tempo 60 ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1). Não houve alteração na atividade da enzima NTPDase quando ATP e ADP foram usados como substrato (Tabela 2).

Tabela 1. Média das atividades enzimáticas no primeiro dia de aplicação do exercício passivo. \*  $p > 0,05$  comparando a atividade da enzima 5'nucleotidase T0 e T20.

	Tempo 0	Tempo 20	Tempo 60
ATP	$17,74 \pm 5,18$	$19,16 \pm 5,76$	$19,15 \pm 6,9$
ADP	$7,68 \pm 3,13$	$9,15 \pm 3,09$	$8,03 \pm 2,83$
AMP	$2,92 \pm 2,48$	$4,39 \pm 2,03^*$	$3,77 \pm 1,90$

Após sete dias de exercício passivo, observou alterações na atividade da NTPDase de plaquetas de pacientes com AVCi internados na UTI. Como pode ser observado na tabela abaixo (Tabela 2) ocorreu um aumento na hidrólise do ATP e ADP no tempo 60 quando comparado ao tempo 0 ( $P < 0,05$ ). Nenhuma alteração foi observada na atividade da enzima 5'-nucleotidase de plaquetas.

Tabela 2. Média das atividades enzimáticas no sétimo dia de aplicação do exercício passivo. \*  $P < 0,05$  diferente no tempo 0. \*\*  $p < 0,05$  diferente do tempo 0.

	Tempo 0	Tempo 20	Tempo 60
ATP	16,33 $\pm$ 11,30	21,94 $\pm$ 10,24	25,22 $\pm$ 11,61*
ADP	9,32 $\pm$ 5,33	12,22 $\pm$ 5,33	12,54 $\pm$ 5,39**
AMP	2,69 $\pm$ 1,07	2,94 $\pm$ 1,53	4,43 $\pm$ 3,6

#### 4. CONCLUSÕES

O aumento na atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase após sete dias de exercício passivo pode ser muito importante nos mecanismos de trombo-regulação por remover os níveis de ADP extracelular, o principal agonista da agregação plaquetária, e gerar adenosina um inibidor da agregação e modulador do tônus vascular. Esse efeito pode ser relevante para melhorar o status de coagulação de pacientes com AVCi internados na UTI.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Soslau, G.; Youngprapakorn, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochim Biophys Acta** v.1355, p.131-140, 1997

Allen, C., P. Glasziou; C. Del Mar. Bed rest: a potentially harmful treatment needing more careful evaluation. **Lancet**, Australia, v.354, n.9186, p.1229-1233, 1999.

Frassetto, S. S.; Schetinger, M. R. C.; Webber, R. S.; Wyse, C. D.; Netto, R. D.; Sarkis, J. F.; Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naïve and preconditioned rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1360-1377, 2000.

Remijn JA; Wu Y; Jeninga EH; Ljsseldijk JW, Willigen G, Groot P, Sixma J, Nurden A, Nurden P. Role of ADP receptor P2y12 in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.22, p. 686-691, 2002.

Zemke, D.; Smith, J. L.; Reeves, M.; Majid, A. Ischemia and Ischemic Tolerance in the Brain: an Overview. **Neuro Toxicology**, Estados Unidos da América, v.25, p.895-904, 2004

Atkinson B.; Dwyer K.; Enjyoji K.; Robson R. Ecto - nucleotidases of the CD39/NTPDase family and thrombus formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells Mol Dis** v.36, p. 217-222, 2006

Moran, J.L.; Bristow P; Solomon PJ; George C; Hart GK. Mortality and length-of-stay outcomes, 1993-2003, in the binational Australian and New Zealand intensive care adult patient database. **Crit Care Med**, Australia, v.36, n.1, p.46-61, 2008.

Yegutkin, G.G. Nucleotide-and nucleoside – converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, Finlandia, v. 1783, p. 673-694, 2008.