

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS EM PLAQUETAS DE PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN

FABIANO SOARES¹, GABRIELA DEBOM², ELISE MOTTA², CAROLINE MACHADO², ELIZANDRA BRAGANHOL², ROSELIA MARIA SPANEVELLO³

¹Universidade Federal de Pelotas – fabiano_soares11@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gabidebom@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down (SD) é causada pela existência de uma cópia extra total ou parcial do cromossomo 21 e é associada a um fenótipo com várias desordens sistêmicas incluindo alterações cardiovasculares, envelhecimento precoce e disfunções hematológicas. Dados da literatura tem demonstrado várias alterações relacionadas ao número e a função das plaquetas (BRUWIER; CHANTRAIN, 2012). As plaquetas de portadores de SD apresentam disfunções na membrana, deficiência em enzimas mitocondriais (PRINCE et al., 1994), e diminuição no conteúdo de cálcio (MCCOY; SNEDDON, 1984). Entretanto o significado clínico dessas alterações para a SD ainda não está bem esclarecido.

As plaquetas possuem um papel crucial nos mecanismos tromboregulatórios. Quando há injúria vascular as plaquetas são ativadas para dar início a cascata de coagulação que vai ser responsável pela hemostase (GATEANO, 2011). Os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina como o ATP, ADP e a adenosina exercem vários efeitos regulatórios nas plaquetas. Após a ativação, as plaquetas mobilizam grânulos secretórios internos que liberam no meio extracelular uma alta concentração de ADP (FONTANA et al., 2013). Esse ADP pode se ligar aos receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ de outras plaquetas que também serão ativadas. O ATP quando em altas concentrações é um inibidor competitivo dos efeitos mediados pelo ADP, enquanto que em baixas concentrações o ATP pode ligar-se ao receptor P2X₁ (um canal cátion-seletivo para Ca⁺⁺) que permite um influxo de cálcio o que leva a uma mudança de forma na plaqueta. Por outro lado, a adenosina possui efeitos antiagregantes e vasodilatores (ANFOSSI et al., 2002).

O controle dos níveis extracelulares de ATP, ADP e adenosina e a sinalização por eles induzida é realizada por enzimas ancoradas na membrana da plaqueta. Dentre essas enzimas pode-se destacar as NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase) as quais são responsáveis por hidrolisar ATP e ADP a AMP. O AMP é convertido a adenosina pela ação da 5'-nucleotidase, enquanto que a enzima adenosina deaminase (ADA) converte a adenosina a inosina (MATHIEU, 2012).

Estudos tem demonstrado que a atividade e expressão de ectonucleotidases estão alteradas em plaquetas em muitas situações patológicas. Sendo assim, essas enzimas podem ser consideradas importantes alvos terapêuticos uma vez que controlam o níveis extracelulares de ATP, ADP e adenosina, interferindo assim com a sinalização por eles induzida. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA em plaquetas de portadores com SD.

2. METODOLOGIA

A população avaliada nesse estudo consistiu de 28 indivíduos adultos, portadores de SD e 28 indivíduos saudáveis adultos como grupo controle, todos habitantes da cidade de Pelotas/RS. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pelotas. As amostras de sangue foram coletadas somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos indivíduos do grupo controle bem como pelos responsáveis dos portadores de SD.

Foram coletados de cada indivíduo 4 ml de sangue por punção venosa em tubos contendo citrato de sódio com anticoagulante. A separação das plaquetas foram realizada segundo o método de Pilla et al. (1996).

O ensaio enzimático da NTPDase e da 5'-nucleotidase em plaquetas foi realizado segundo o método de Pilla et al. (1996). O fosfato liberado foi determinado pelo método de Chan et al. (1986) a 630nm. A atividade específica da NTPDase e 5'-nucleotidase foi expressa em nmol de fosfato liberado por minuto por mg de proteína (nmol Pi/min/mg de proteína). A atividade da ADA nas plaquetas foi determinada de acordo com Guisti & Gakis (1971) e expressa em unidades por U/L.

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student para amostras independentes. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0.05$. Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram alterações na atividade das ectoenzimas em plaquetas de portadores de SD. Com relação à atividade da NTPDase foi observado que a hidrólise do ATP foi significativamente aumentada (28%) em plaquetas de indivíduos com SD quando comparado com o grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 1A). Por outro lado, não foram observadas alterações na atividade da NTPDase em plaquetas quando o ADP foi utilizado como substrato (Figura 1B).

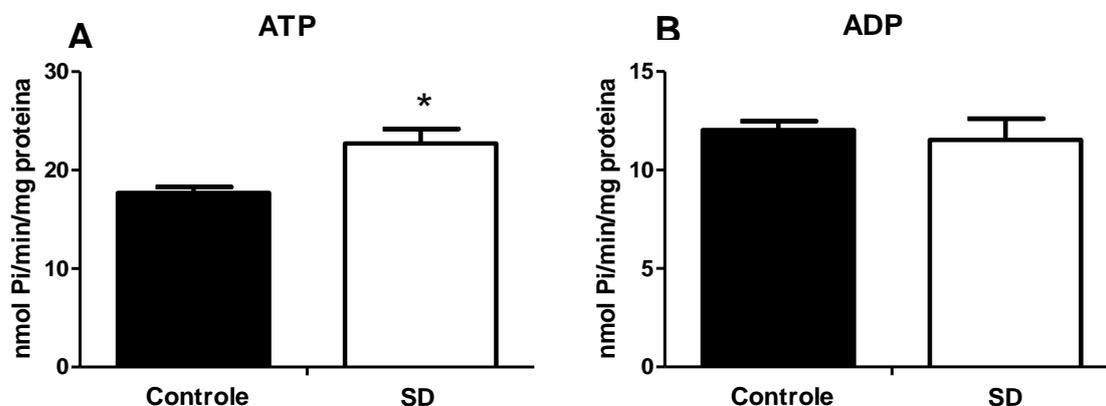


Figura 1 – Atividade da NTPDase usando ATP (A) e ADP (B) como substrato em plaquetas de portadores de Síndrome de Down (SD) e grupo controle. *Diferente do controle ($P < 0,05$) (n=28).

A figura 2 demonstra os resultados obtidos para a atividade de 5'-nucleotidase utilizando o AMP como substrato. Nas plaquetas de portadores de SD a atividade da 5'-nucleotidase foi diminuída (25%) em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Em contraste, a atividade de ADA foi aumentada (70%) em plaquetas de indivíduos SD quando comparado com os indivíduos saudáveis ($P < 0,05$) (Figura 3).

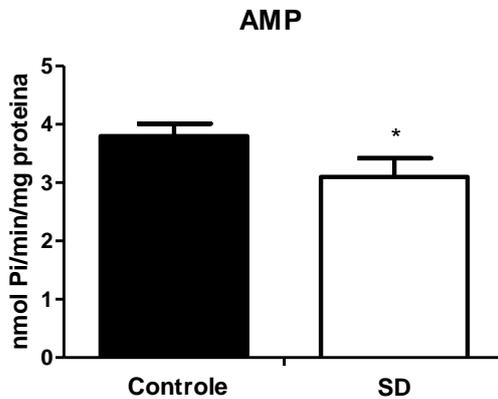


Figura 2: Atividade da 5'-nucleotidase usando AMP como substrato em plaquetas de portadores de síndrome de Down (SD) e grupo controle. *Diferente do controle ($P < 0,05$) (n=28).

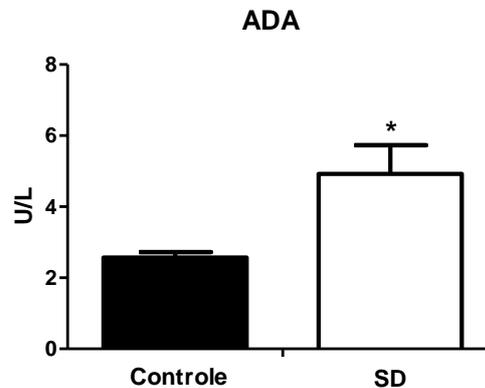


Figura 3: Atividade da ADA usando adenosina como substrato em plaquetas de portadores de Síndrome de Down (SD) e grupo controle.* Diferente do controle ($P < 0,05$) (n=28).

A adesão de plaquetas e agregação subsequente no local da lesão vascular são importantes mecanismos envolvidos na tromboregulação. É bem estabelecido que a secreção de grânulos densos e, em particular, a liberação de ATP e ADP é essencial para a ativação e agregação plaquetária (FONTANA, et al., 2003). A ação coordenada das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase tende a diminuir as concentrações extracelulares de ADP, o principal agonista de agregação plaquetária e gerar adenosina, uma molécula com ações antiagregantes (MATHIEU, 2012). Neste contexto, os achados do presente estudo sugerem que o aumento da hidrólise de ATP pela NTPDase nas plaquetas de indivíduos SD pode resultar em um aumento nos níveis de ADP extracelular aumentando assim os processos de ativação e agregação plaquetária. Por outro lado um diminuição da 5'-nucleotidase e um aumento na ADA poderia levar a uma diminuição nos níveis de adenosina, uma molécula que possui ações antiagregantes e cardioprotetoras.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram alterações na atividade das ectonucleotidases em plaquetas de portadores de SD. Estes achados sugerem que essas alterações enzimáticas podem contribuir para disfunções em parâmetros de coagulação nesta síndrome.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANFOSSI, G.; RUSSO, I.; MASSUCO, P.; MATTIELO, L.; CAVALOT, F.; BALBO, A.; TROVATI, M. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. **Thrombosis Research**, v.105, n.1, p.71-78, 2002.

BRUWIER, A.; CHANTRAIN, C. Hematological disorders and leukemia in children with Down syndrome. **European Journal Pediatrics**, v.171, n. 9, p.1301-1317, 2012.

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} - ATPase activity. **Analytical Biochemistry** v.157, n.2, p.375-380, 1986.

FONTANA, P.; DUPPONT, A.; GANDRILLE, S.; BACHELLOT-LOZA, C.; RENY, J.; AIACH, M.; GAUCHEM, P. Adenosine diphosphate induced platelet aggregation is associated with $P2Y_{12}$ gene sequence variations in healthy subjects. **Circulation**, v.108, n. 8, p.989-995, 2003.

GAETANO, G. Historical Overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. **Haematologica**, v.86, n.8, p.349-356, 2001.

GIUSTI, G.; GAKIS, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. **Enzyme**, v.12, n.4, p.417-425 1971.

MATHIEU, P. Pharmacology of ectonucleotidases: relevance for the treatment of cardiovascular disorders. **European Journal Pharmacology**, v.696, n.1, p.1-4, 2012.

MCCOY, E.; SNEDDON, J. Decreased Calcium content and Ca^{2+} uptake in Down's syndrome blood platelets. **Pediatrics Research**, v.18, n.9, p.914-916, 1984.

MCCOY, E.; SEGAL, D.; BAYER, S.; STRYNADKA, K. Decreased ATPase and increased content of platelets in Down's syndrome – relation to decreased serotonin content. **The New England Journal of Medicine**, v.291, n.18, p.950-953, 1974.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase E.C. 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v.7, n.4, p.225-230, 2003.

PRINCE, J.; BAVE, U.; ANNERÉM, G.; ORELAND, L. Mitochondrial enzyme deficiencies in Down's syndrome. **Journal of Neural Transmission**, v.8, n.3 p.171-181, 1994.