

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

CRISTINA RIBAS FÜRSTENAU BASSO

**PARTICIPAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA
NA HIPERTENSÃO ARTERIAL INDUZIDA POR L-NAME**

Porto Alegre

2010

CRISTINA RIBAS FÜRSTENAU BASSO

**PARTICIPAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA
NA HIPERTENSÃO ARTERIAL INDUZIDA POR L-NAME**

Tese apresentada ao Programa 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 Doutor em Bioquímica.

Orientadora:

Prof^a Dra Susana Tchernin Wofchuk

Co-orientadora:

Prof^a Dra Maria Luiza Morais Barreto de Chaves

Porto Alegre

2010

Ao Professor Sarkis (in memoriam) com admiração e saudades.

Ao Junior pela coerência, lucidez e amor.

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À melhor família do mundo: a minha! Obrigada aos meus pais Maria Lúcia e Harry pelos exemplos de vida e bom caráter, pela educação recebida e pelo amor sem medida. Aos meus irmãos Luciana, Carina e Roberto pela presença e comunhão nos bons e maus momentos. Aos meus cunhados Júlio e Dico pelo convívência e consideração. Ao Lucas e à Maria Clara que representam o mais puro amor e a plenitude da vida.

Ao Junior, meu esposo. Obrigada pelo investimento destes anos todos, por compartilhar dos meus sonhos e não medir esforços para me ajudar a torná-los realidade. Pela lucidez e segurança que me oferecetes em todos os momentos destes últimos quatro anos. Pelo suporte, confiança e amor incondicionais.

Ao Professor Sarkis (*in memoriam*), cujos exemplos e ensinamentos ficarão para sempre. Obrigada pela orientação competente desde a Iniciação Científica e pela amizade sincera de todos os momentos. Saudades eternas.

À Susana Wofchuk por ter assumido a minha orientação. Obrigada pelo empenho em compreender um tema tão distante dos teus interesses, pela acolhida em um momento tão difícil e pelo contagiante bom-humor com que vives a vida.

À Maria Luiza, minha querida co-orientadora desde o Mestrado. Obrigada pela colaboração nos trabalhos, especialmente ao final do Doutorado, pela amizade sincera e revigorante e pelos projetos futuros.

Agradeço ao Professor Jean Sévigny pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante o período do meu “Doutorado Sanduíche”. Muito obrigada por toda a estrutura oferecida e pelas discussões construtivas que tivemos.

Serei eternamente grata ao colega Gilles Kauffenstein pela supervisão durante o período do meu “Doutorado Sanduíche”. Obrigada pela paciência e confiança, pela orientação clara, pelos desafios propostos e pelas ferramentas que me mostrastes para superar todos eles. Jamais me esquecerei.

Ao Professor Diogo Souza pelo apoio no momento mais difícil deste Doutorado e pelo empenho durante a solicitação de bolsa para o meu estágio no exterior.

À grande amiga Carla Bonan pela colaboração no trabalho e pela atenção ao longo destes anos todos.

Ao Professor Maurício Bogo pela colaboração no trabalho quando da realização dos PCRs.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (Departamento de Fisiologia/UFRGS) pelo uso do equipamento e apoio durante as medidas de pressão arterial caudal. Ao Markus Berger (CBIOT/UFRGS) pela ajuda nos ensaios de agregação plaquetária.

Às minhas bolsistas Danielle Trentin pela insubstituível colaboração no trabalho e pela amizade que permanece; e Agnes Gossenheimer pela ajuda nos tratamentos dos animais hipertensos.

À família Basso pela convivência e pelo apoio constante e indispensável.

Às minhas amigas-irmãs: Grace Schenatto, a minha melhor amiga, obrigada por existir na minha vida; Vanessa Ribeiro, minha amiga querida, pela alegria que alivia qualquer dor e dificuldade; e Bárbara Rücker, minha eterna amiga, pelo carinho e preocupação ao longo de todos estes anos.

Às grandes e insubstituíveis amigas conquistadas durante o tempo do Doutorado: Daniela Pochmann e Luciana Berti. Obrigada pelo apoio, preocupação, convivência e sorrisos.

Obrigada a todos os colegas de laboratório com os quais convivi durante todos estes anos, em especial à Denise pelo exemplo, à Sandra pela alegria de viver, ao Emerson pela parceria, à Lucimara pelo respeito ao nosso trabalho e à Fernanda pela gentileza com que trata a nossa amizade.

Aos meus colegas “cheios de conteúdo” de Québec: Alain, Élise (minha irmãzinha), Elizandra, Fariborz (meu terapeuta), Fethia, Filip, Gilles (meu grande amigo), Joanna, Julie, Michel e Sébastien (meu amigo generoso). Obrigada por tornar minha vida mais fácil e mais feliz em Québec. Muito obrigada por todos os momentos que compartilhamos, especialmente o longo inverno branco regado à taças de vinho tinto!

Ao pessoal do LBCAF do Departamento de Anatomia/USP pelos agradáveis momentos que passamos juntos ao final do meu Doutorado. Obrigada à Tatiana Fonseca pela acolhida em São Paulo e pela amizade desinteressada e insubstituível.

Ao pessoal do “laboratório 35 do 2º andar”. Obrigada pela receptividade quando retornei do exterior. É um prazer passar os dias com vocês no laboratório.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica pelos 10 anos de convivência.

Às agências de fomento CNPq e Capes pela concessão das bolsas de Doutorado no País e no Exterior, respectivamente.

A Deus pela capacidade de raciocínio, pelo discernimento e pela serenidade.

ÍNDICE

PARTE I.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
Apresentação.....	4
Lista de Abreviaturas.....	5
Lista de Figuras.....	8
Introdução.....	9
1. Sinalização Purinérgica.....	9
1.1. Os Nucleotídeos e Nucleosídeos Extracelulares.....	9
1.2. Via de Liberação de Purinas.....	10
1.3. Os Receptores Purinérgicos.....	12
1.3.1. Os Receptores P1.....	13
1.3.2. Os Receptores P2X.....	13
1.3.3. Os Receptores P2Y.....	14
1.4. Finalização da Sinalização por Nucleotídeos por Ação das Ectonucleotidasas.....	15

1.4.1.	As Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (E-NTPDases).....	16
1.4.2.	As Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/ Fosfodiesterase (E-NPPs)..	18
1.4.3.	A Ecto-5'-nucleotidase (CD73)	20
1.5.	Sinalização Purinérgica no Sistema Vascular.....	21
1.6.	Sinalização Purinérgica no Rim.....	25
2.	Hipertensão Arterial.....	27
2.1.	Hipertensão Arterial Induzida por L-NAME.....	30
2.2.	Hipertensão Arterial e Sinalização Purinérgica.....	31
	Objetivos.....	34
1.	Objetivo Geral.....	34
2.	Objetivos Específicos.....	34
	PARTE II.....	35
	Capítulo I.....	36
	Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats – Artigo publicado no periódico <i>Blood Cells, Molecules and Diseases 41 (2008) 223-229.</i>	

Capítulo II.....	44
L-NAME treatment alters ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats – Artigo submetido à publicação ao periódico <i>Life Sciences</i> , em 24/02/2010.	
Capítulo III.....	73
Perfil de hidrólise de nucleotídeos em soro e sinaptossoma cardíaco de ratos fêmeas submetidos à hipertensão arterial por L-NAME – Resultados preliminares.	
Capítulo IV – ANEXOS.....	94
Anexo I.....	95
The ecto-nucleotidase NTPDase1 differentially regulates P2Y1 and P2Y2 receptor-dependent vasorelaxation – Artigo publicado no periódico <i>British Journal of Pharmacology</i> 159 (2010) 576-585.	
Anexo II.....	106
Contribuição dos receptores P2 no vasorelaxamento dependente de plaquetas ativadas – Padronização de Metodologia e Resultados Preliminares.	
PARTE III.....	123

Discussão.....	124
1. Sinalização Purinérgica Cardiovascular na Hipertensão Arterial Induzida por L-NAME.....	125
2. Sinalização Purinérgica Renal na Hipertensão Arterial Induzida por L-NAME.....	130
3. Sinalização Purinérgica na Regulação do Tônus Vascular.....	133
Conclusões.....	138
Perspectivas.....	140
Referências Bibliográficas.....	141

PARTE I

RESUMO

A hipertensão arterial é responsável por mais de 7 milhões de mortes prematuras em todo o mundo. Esta patologia é influenciada por diferentes sistemas pressores e depressores e a sua elevação resulta da perda do equilíbrio entre estes fatores. A sinalização purinérgica tem sido apontada como um importante regulador da (pato)fisiologia cardiovascular. Na vasculatura, o ATP, o ADP e a adenosina podem influenciar as respostas vasomotoras, a ativação plaquetária e a função cardíaca, entre outros. No rim, estão associados à modulação da reatividade vascular e ao processo de retroalimentação tubuloglomerular. Os nucleotídeos exercem seus efeitos através dos receptores purinérgicos P2, subdivididos em P2X e P2Y, e a adenosina atua via ativação de quatro subtipos de receptores P1. As ectonucleotidases, atuando sob a forma de uma cascata enzimática, regulam a degradação dos nucleotídeos e a formação dos nucleosídeos. No presente trabalho, avaliamos a influência da hipertensão arterial induzida pela inibição crônica da produção de óxido nítrico sobre o sistema purinérgico vascular e renal de ratos. No primeiro capítulo, demonstramos que as hidrólises de ATP, ADP e AMP foram diminuídas em soro e plaquetas de ratos tratados com L-NAME (30 mg/Kg/dia por 14 dias). Entretanto, a medida dos níveis de purinas indicou uma diminuição nas concentrações de ADP, AMP e hipoxantina circulantes. O segundo capítulo mostrou que as hidrólises de ATP, ADP, AMP e 5'TMP foram aumentadas em membrana renal de ratos tratados com L-NAME, e estiveram acompanhadas por uma elevação significativa na expressão gênica das enzimas NTPDase2, NTPDase3 e NPP3. Os dados preliminares do capítulo III mostram que a hidrólise dos nucleotídeos em soro e sinaptossoma cardíaco de ratos fêmeas permaneceu inalterada nos animais tratados com L-NAME (30 ou 50 mg/Kg/dia por 14 dias), sinalizando um possível dimorfismo sexual na resposta à hipertensão no que se refere à sinalização purinérgica. Os dados descritos em anexo no capítulo IV, os quais foram obtidos durante um estágio no exterior, descrevem a participação diferencial da NTPDase1 no controle do vasorelaxamento dependente dos receptores P2Y₁ e P2Y₂ em aortas de camundongos. O receptor P2Y₁ foi facilmente desensibilizado em camundongos deficientes para a enzima, enquanto que o receptor P2Y₂ mostrou-se menos suscetível à desensibilização. Finalmente, descrevemos a padronização de uma metodologia para a avaliação da participação dos purinoceptores endoteliais na vasodilatação dependente do conteúdo de plaquetas ativadas. Em conjunto, os dados desta Tese apontam que alguns parâmetros da sinalização purinérgica são alterados pelo modelo de hipertensão arterial induzida por L-NAME. Portanto, concluímos que esta sinalização pode representar mais um fator associado a ser considerado em uma terapia anti-hipertensiva e estudos adicionais são necessários para ratificar a utilização das terapias purinérgicas no contexto da hipertensão arterial.

ABSTRACT

Hypertension is responsible for more than 7 million deaths around the world. This pathology is influenced by different pressor and depressor systems, and its elevation results from the loss of equilibrium between these factors. The purinergic signaling has been implicated as an important regulator in the cardiovascular (patho)physiology. In the vasculature, ATP, ADP and adenosine may influence the vasomotor responses, platelet activation, cardiac function, among others. In the kidney, they are associated with the modulation of vascular reactivity and the tubuloglomerular feedback process. The nucleotides exert their effects through purinergic P2 receptors, subdivided into P2X and P2Y, and adenosine acts via activation of four subtypes of P1 receptors. The ectonucleotidases, acting as an enzyme cascade, regulate the degradation of nucleotides and the formation of nucleosides. In this study, we evaluated the influence of hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis on the vascular and renal purinergic system of rats. In the first chapter, we demonstrated that the hydrolysis of ATP, ADP and AMP were decreased in serum and platelets of rats treated with L-NAME (30 mg /Kg/day for 14 days). However, the measurement of purine levels indicated a decrease of circulating ADP, AMP and hypoxanthine. The second chapter has shown that the hydrolysis of ATP, ADP, AMP and 5'TMP were increased in renal membrane of rats treated with L-NAME, which were accompanied by a significant increase in gene expression of the enzymes NTPDase2, NTPDase3 and NPP3. Preliminary data of Chapter III show that the hydrolysis of nucleotides in serum and heart synaptosomes female rats remained unchanged in animals treated with L-NAME (30 or 50 mg / kg / day for 14 days), indicating a possible sexual dimorphism in regard to purinergic signaling in a hypertensive context. The data described in Annex of Chapter IV were obtained during a pre-doctoral training period abroad and describe the differential involvement of NTPDase1 in the control of vasorelaxation dependent of P2Y₁ and P2Y₂ receptors in mice aortas. The P2Y₁ receptor was easily desensitized in mice deficient for the enzyme, whereas the P2Y₂ was less susceptible to desensitization. Finally, we describe the standardization of a methodology for assessing the involvement of endothelial purinoceptors in the vasodilation dependent of activated platelets content. Together, the data from this thesis point out that some parameters of purinergic signaling are altered by the model of hypertension induced by L-NAME. Therefore, we conclude that purinergic signaling may represent another associated factor to be considered in an anti-hypertensive therapy and further studies are needed to confirm the use of purinergic therapies in the context of arterial hypertension.

APRESENTAÇÃO

A presente Tese de Doutorado encontra-se organizada em três partes principais:

A **Parte I** apresenta a **Introdução**, a qual contém o referencial teórico utilizado para a construção das hipóteses investigadas nesta Tese. Em seguida, os **Objetivos** (Geral e Específicos) trazem o principal questionamento do trabalho realizado e as questões de pesquisa específicas que nortearam a realização desta Tese.

A **Parte II** está subdividida em quatro **Capítulos**. O Capítulo I traz um Artigo Científico já publicado; o Capítulo II contém um Artigo Científico submetido à publicação; o Capítulo III apresenta Resultados Preliminares; e o Capítulo IV, o qual está intitulado “Anexos”, representa os resultados obtidos durante o período de realização do “Doutorado-Sanduiche”, os quais incluem um Artigo Científico publicado e a Padronização de uma Metodologia e Resultados Preliminares. Os Materiais e Métodos, Resultados e Referências Bibliográficas utilizados em cada Artigo Científico estão apresentados no corpo do texto de cada um dos trabalhos.

A **Parte III** apresenta a **Discussão**, a qual contém uma interpretação geral dos dados obtidos em todos os trabalhos. À Discussão, seguem-se as **Conclusões** contendo um resumo dos principais resultados desta Tese. Em seguida, está apresentada a seção **Perspectivas**, a qual sugere possíveis estudos futuros a partir dos resultados apresentados nesta investigação. A seção **Referências Bibliográficas** lista a bibliografia citada na Introdução e na Discussão.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ado – adenosina

ADP – adenosina-5'-difosfato

AMP – adenosina-5'-monofosfato

AMPc – adenosina-3',5'-monofosfato cíclico

APSN – sobrenadante de plaquetas ativadas

ATP – adenosina-5'-trifosfato

CD73 – ecto-5'-nucleotidase

CTP – citosina trifosfato

DOCA – acetato de desoxicorticosterona

EC – células endoteliais

EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF – fator relaxante derivado do endotélio

Entpd1^{-/-} – camundongos deficientes na enzima NTPDase1

GDP – guanosina difosfato

GFR – taxa de filtração glomerular

GMPC – guanosina-3',5'-monofosfato cíclico

GPI – glicosil-fosfatidilinositol

HAS – hipertensão arterial sistêmica

IDP – inosina difosfato

K_M – constante de Michaelis-Menten (concentração de substrato necessária para alcançar a metade da velocidade máxima)

L-NAME – N_{ω} -Nitro-L-arginina metil éster

MAPK – proteínas cinases ativadas por mitógenos

MLC – cadeia leve da miosina

NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

Np_nN – dinucleotídeo polifosfato (onde n=número de fosfatos)

NPP ou E-NPP – nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase ou ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase

NTPDase ou E-NTPDase – nucleosídeo 5'-trifosfato difosfohidrolase ou ecto- nucleosídeo 5'-trifosfato difosfohidrolase

P1 – receptor adenosinérgico

P2X – receptor purinérgico ionotrópico

P2Y – receptor purinérgico metabotrópico

PGI_2 – prostaciclina

PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase

PKG – proteína cinase G

PLC – fosfolipase C

PPP – plasma pobre em plaquetas

PRP – plasma rico em plaquetas

SHR – ratos espontaneamente hipertensos

TGF – retroalimentação tubuloglomerular

TTP – timidina trifosfato

UDP – uridina difosfato

UDP-glicose – uridina difosfato glicose

UTP – uridina trifosfato

VSMC – células musculares lisas vasculares

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de liberação de purinas para o meio extracelular

Figura 2: Vias de sinalização purinérgica

Figura 3: As famílias de ectonucleotidases

Figura 4: Topografia de membrana predita para os membros da família E-NTPDase

Figura 5: Estrutura dos domínios e orientação das NPPs na membrana

Figura 6: Topografia de membrana predita para a ecto-5'-nucleotidase de mamíferos

Figura 7: Controle purinérgico e pirimidinérgico do tônus vascular através dos receptores P2

Figura 8: Hipertensão associada ao desbalanço na produção e/ou atividade das moléculas vasoconstritoras e vasodilatadoras

Figura 9: Mecanismo de ação do *N*_ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Figura 10: Resumo da distribuição das ectonucleotidases em néfron de ratos

INTRODUÇÃO

1. Sinalização Purinérgica

Em 1929, Drury e Szent-Györgyi publicaram um trabalho pioneiro descrevendo as potenciais ações do ATP e da adenosina no coração e nos vasos sanguíneos, como agentes bradicárdicos e redutores da pressão arterial global (Drury & Szent-Gyorgyi, 1929). No entanto, o conceito de sinalização purinérgica, ou seja, do papel do ATP como uma molécula sinalizadora, foi proposto apenas no início da década de 1970 por Burnstock, em um estudo que evidenciou o ATP como o neurotransmissor responsável pela transmissão neuromuscular não-adrenérgica e não-colinérgica no intestino e na bexiga urinária (Burnstock, 1972). Este conceito de transmissão purinérgica sofreu uma considerável resistência durante muitos anos, uma vez que o ATP estava bem estabelecido como uma fonte de energia intracelular, envolvido em diversos ciclos metabólicos (Cori, 1974). Atualmente, a sinalização purinérgica é amplamente aceita como um sistema primitivo e altamente conservado, e os papéis para os nucleotídeos e nucleosídeos como moléculas sinalizadoras extracelulares estão bem descritos, tanto em tecidos neurais, quanto em tecidos não-neurais (Burnstock & Knight, 2004).

1.1. Os Nucleotídeos e Nucleosídeos Extracelulares

A partir do surgimento do conceito de sinalização purinérgica, uma multiplicidade de funções para os nucleotídeos extracelulares purínicos (ATP, ADP e o nucleosídeo adenosina) e pirimidínicos (UTP e UDP) em diversos órgãos e tecidos têm sido apontadas. Neste sentido, estas moléculas participam da neurotransmissão no sistema nervoso central, da contração não-colinérgica e não-adrenérgica em músculo liso e de interações neurônio-glia (Ralevic & Burnstock, 1998). Além disso, atuam nos efeitos inotrópicos, cronotrópicos e arritmogênicos

no miocárdio (Vassort, 2001); na função gastrointestinal e hepática (Roman & Fitz, 1999) e na regulação das respostas epiteliais (Bucheimer & Linden, 2004, Schwiebert & Zsembery, 2003); na distribuição do fluxo sanguíneo e do oxigênio (Gonzalez-Alonso et al., 2002, Sprague et al., 2007); nas respostas imunes e no controle do tráfego leucocitário entre o sangue e os tecidos (Bours et al., 2006, Salmi & Jalkanen, 2005) e na ativação e agregação plaquetária em locais de injúria vascular (Gachet, 2006, Marcus et al., 2003). Além destes eventos agudos, acredita-se que as purinas e pirimidinas também exerçam papéis tróficos na proliferação e crescimento celular (Burnstock, 2006b); na indução de apoptose e atividade anticâncer (Bours et al., 2006, White & Burnstock, 2006); na formação da placa aterosclerótica (Di Virgilio & Solini, 2002); na cicatrização, na formação e na reabsorção óssea (Hoebertz et al., 2003).

1.2. Vias de Liberação de Purinas

Evidentemente, para que os nucleotídeos e nucleosídeos exerçam suas funções como sinalizadores autócrinos e/ou parácrinos, eles devem estar presentes no meio extracelular. Alguns mecanismos de liberação destas moléculas são conhecidos e estão descritos a seguir.

Considerando-se que todas as células vivas contêm uma grande quantidade de nucleotídeos no seu citosol (Traut, 1994), pode ocorrer um massivo extravasamento destas moléculas em consequência da lise celular. Entretanto, este mecanismo inespecífico está restrito à injúria de órgãos, assim como ao choque traumático e a certas condições inflamatórias (Bours et al., 2006). Além disso, mecanismos não-líticos de efluxo de nucleotídeos representam uma importante fonte de purinas no meio extracelular. Desta maneira, diversos tecidos excitáveis/secretórios, tais como terminais nervosos e células cromafins (Burnstock, 2007, Zimmermann, 1996b), células acinares pancreáticas (Sorensen & Novak, 2001) e plaquetas circulantes (Gachet, 2006, Marcus et al., 2003) estocam ATP e

ADP juntamente com outros neurotransmissores nas vesículas sinápticas, nos grânulos cromafins e nos grânulos densos, regulando sua liberação por exocitose de uma maneira cálcio-dependente (Yegutkin, 2008).

A liberação de nucleotídeos também acontece a partir de tecidos não excitáveis, incluindo as células epiteliais (Schwiebert & Zsembery, 2003) e endoteliais (Bodin & Burnstock, 2001, Yegutkin et al., 2000), os astrócitos e outras células gliais (Burnstock, 2007, Lazarowski et al., 2000), os fibroblastos (Gerasimovskaya et al., 2002), os hepatócitos (Roman & Fitz, 1999), os queratinócitos (Burrell et al., 2005) e outras células hematopoiéticas, como os eritrócitos (Sprague et al., 2007) e neutrófilos (Gonzalez-Alonso et al., 2002). Estas células liberam ATP sob estímulos mecânicos, como estresse de cisalhamento e hipóxia e sob estímulos por agonistas, como bradicinina e serotonina (Yegutkin, 2008). Finalmente, sabe-se ainda que as células constitutivamente liberam concentrações nanomolares de ATP (Lazarowski et al., 2000).

A diversidade de condições nas quais as células liberam purinas, sugere o envolvimento de diferentes vias de liberação para estas moléculas, as quais estão representadas na Figura 1. Os mecanismos celulares propostos incluem: 1) movimento eletrodifusional através de canais iônicos de membrana; 2) difusão facilitada pelos transportadores específicos de ATP do tipo ABC (*ATP-binding cassette*); e 3) vesículas de tráfego de carga e grânulos de secreção exocíticos (Lazarowski et al., 2003, Schwiebert & Zsembery, 2003).

Em suma, os diferentes nucleotídeos podem ser liberados de distintas maneiras no meio extracelular, dependendo do tipo celular e do contexto fisiológico considerados. Aqui foram apresentadas as principais fontes de nucleotídeos extracelulares. Contudo, a degradação de moléculas contendo nucleotídeos (como por exemplo: NAD, Np_nN , UDP-glicose, etc.) pode também representar uma fonte destas moléculas no meio extracelular.

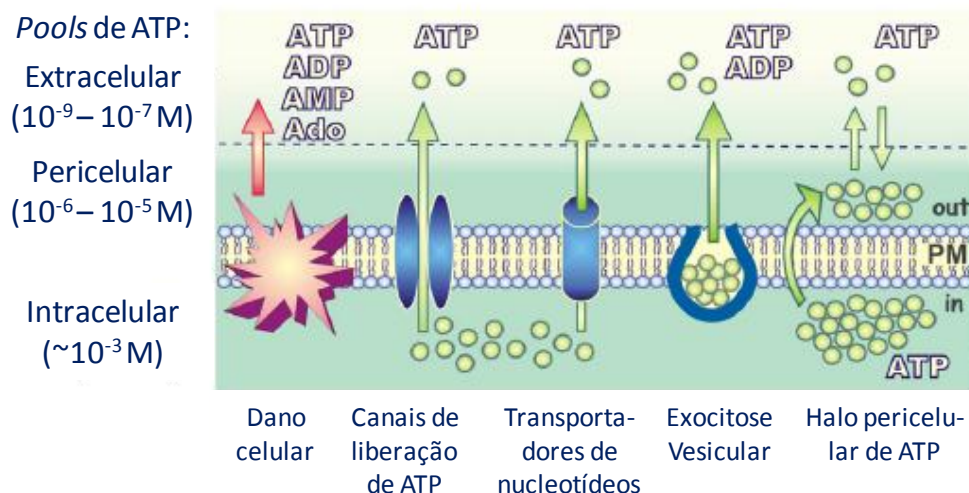


Figura 1: Vias de liberaçao de purinas para o meio extracelular. Adaptado de (Yegutkin, 2008).

1.3. Os Receptores Purinergicos

Como descrito anteriormente, uma s6rie de nucleot6deos e nucleos6deos pode ser encontrada extracelularmente. A fim de iniciar uma resposta celular, estas mol6culas ligam-se a diferentes receptores de membrana espec6ficos (Figura 2), os purinoceptores, os quais s6o classificados como P1 e P2. S6o conhecidos quatro subtipos de receptores P1 responsivos 6 adenosina, os quais fazem parte da fam6lia de receptores acoplados 6s prote6nas G. Os agonistas conhecidos dos receptores P2 s6o os nucleot6deos p6ricos (ADP e ATP), os pirim6dicos (UDP e UTP) e o UDP-glicose (Abbracchio et al., 2003, Ralevic & Burnstock, 1998). A fam6lia dos receptores P2 6 subdividida em duas classes: os receptores P2X, os quais compreendem canais i6nicos e os receptores P2Y, que s6o acoplados 6 prote6nas G.

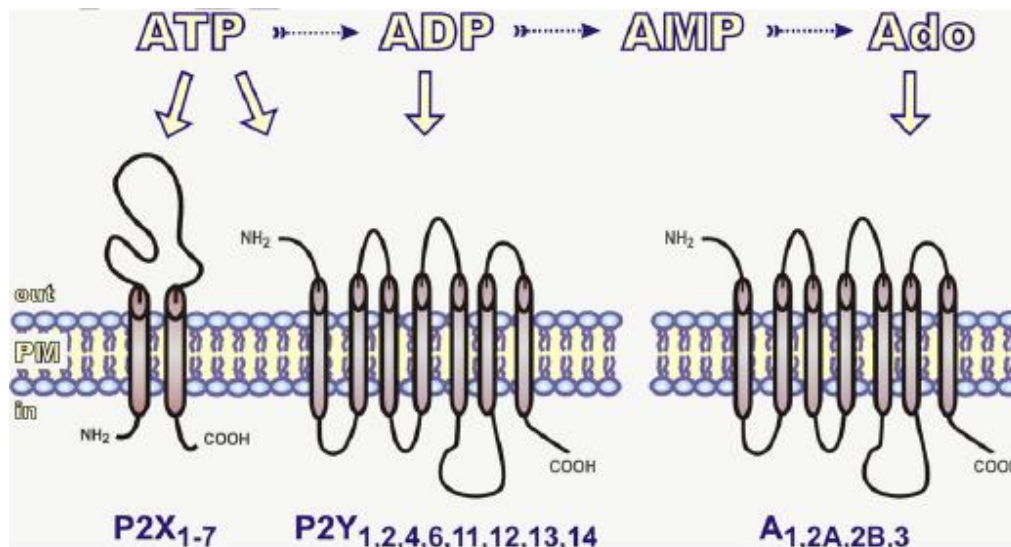


Figura 2: Vias de sinalização purinérgica. A sinalização por nucleotídeos ocorre através de uma série de receptores ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y). A adenosina gerada a partir dos nucleotídeos atua através de quatro subtipos de receptores seletivos acoplados à proteínas G (P1). Adaptado de (Yegutkin, 2008).

1.3.1. Os Receptores P1

A nomenclatura “receptores P1” é, na verdade, pouco utilizada, uma vez que apenas receptores responsivos à adenosina, e não aos demais nucleosídeos, foram caracterizados. Desta maneira, quatro receptores ativados pela adenosina foram clonados e caracterizados: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Os receptores A_{2A} e A_{2B} , através da proteína G_s , podem ativar a via do AMPc. Por sua vez, os receptores A_1 e A_3 , acoplados à proteína G_i , podem inibir a mesma via. Adicionalmente, o receptor A_{2B} também pode associar-se à proteína G_q e transmitir o sinal através de outras vias relacionadas à fosfolipase C (PLC), à fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) ou às proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Jacobson & Gao, 2006).

1.3.2. Os Receptores P2X

Os receptores P2X são canais iônicos ativados por ATP com permeabilidade ao Ca^{2+} , ao Na^+ e ao K^+ (Evans et al., 1996). Sete subtipos de receptores P2X já foram clonados e

identificados: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ e P2X₇. Sua estrutura comum, composta de pelo menos três subunidades, compreende dois segmentos transmembrana, uma grande alça extracelular rica em resíduos de cisteína, e os terminais amino e carboxi localizados intracelularmente (North, 2002). Os receptores P2X são amplamente distribuídos, especialmente entre as células excitáveis. A ativação destes receptores leva a uma alteração na condutância iônica da membrana para o Na⁺, o K⁺ e o Ca²⁺, aumentando rapidamente a concentração de Ca²⁺ intracelular, o que está geralmente associado com a vasoconstrição da musculatura lisa, com a contração da musculatura lisa visceral e com a rápida transmissão sináptica purinérgica (Gitterman & Evans, 2001).

1.3.3. Os Receptores P2Y

Os receptores P2Y fazem parte da família de receptores acoplados às proteínas G (G_q, G₁₁, G_i/G₀ ou G_s). Contrariamente aos receptores P2X, que respondem unicamente ao ATP, os receptores P2Y distinguem-se uns dos outros de acordo com seus ligantes: ATP, ADP, UTP, UDP ou UDP-glicose (Abbracchio et al., 2003, Boarder et al., 1994, Communi et al., 2000). Atualmente, oito receptores P2Y já foram clonados em mamíferos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄. Os números faltantes dizem respeito aos ortólogos de algum dos receptores mencionados anteriormente (por exemplo, P2Y₃ é um ortólogo aviário do P2Y₆ e P2Y₈ é um ortólogo de sapo do P2Y₄) (Bogdanov et al., 1997, Webb et al., 1996). Os receptores P2Y_{5,7,9} e ₁₀ apresentam certa homologia de sequência aos demais, porém não respondem aos nucleotídeos em ensaios funcionais (Noguchi et al., 2003, Yokomizo et al., 1997).

1.4. Finalização da Sinalização por Nucleotídeos por Ação das Ectonucleotidases

As vias de sinalização intracelulares geralmente requerem mecanismos de inativação do sinal. O grande número de receptores purinérgicos, presentes em uma mesma célula ou em duas células vizinhas, sugere uma fina regulação desta sinalização. Portanto, os nucleotídeos são hidrolisados por uma cascata enzimática extracelular, o que resulta na formação do respectivo nucleosídeo e fosfato livre, eliminando ou modificando rapidamente os agonistas dos receptores P2. As enzimas capazes de hidrolisar os nucleotídeos extracelulares são conhecidas como ectonucleotidases e, atualmente, incluem membros das famílias E-NTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase), fosfatases alcalinas e ecto-5'-nucleotidase, as quais apresentam uma ampla distribuição tecidual (Zimmermann, 2000) (Figura 3).

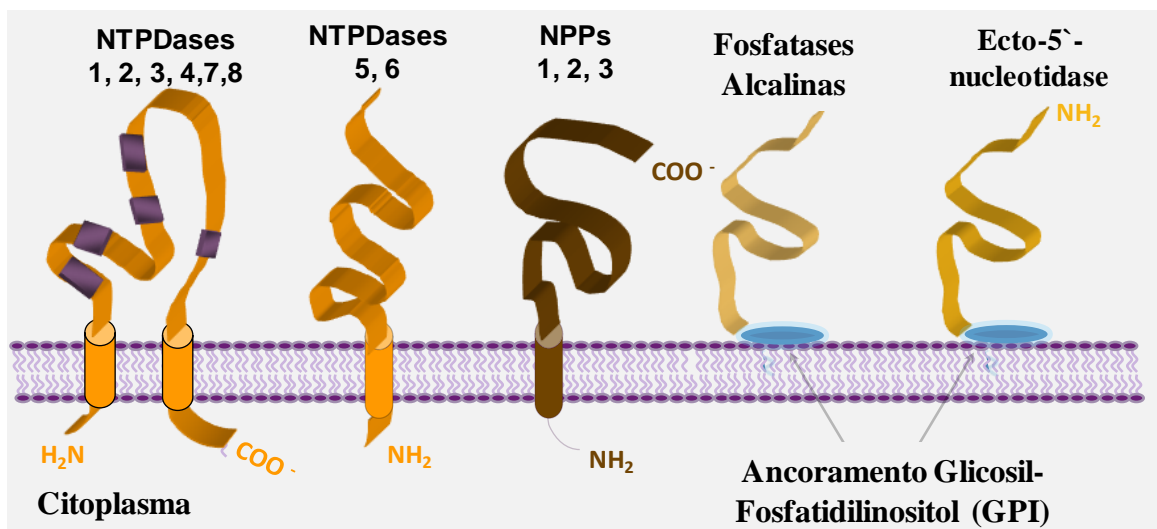


Figura 3: As famílias de ectonucleotidases. Disponível em www.crrri.ca/sevigny.html (Acessado em 16/01/2010).

As ectonucleotidases estão ancoradas à membrana plasmática das células, porém podem existir também sob as formas clivada e solúvel. O seu sítio ativo está voltado para o

meio extracelular, estando sua atividade catalítica adaptada a este ambiente. Sua atividade requer a presença de cátions divalentes, como o cálcio ou o magnésio, e um pH alcalino. Na maioria dos casos, os valores de K_M estão na faixa micromolar inferior. O seu principal papel funcional é a terminação da sinalização por nucleotídeos, a qual é acompanhada pelas rotas de salvação de purinas (Zimmermann, 2000).

Devido à sua importância como objeto de estudo da presente Tese, as famílias de enzimas E-NTPDase, E-NPP e ecto-5'-nucleotidase serão descritas em maiores detalhes nas subseções ulteriores.

1.4.1. As Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases (E-NTPDases)

A família das E-NTPDases (EC 3.6.1.5) é composta por enzimas ancoradas à membrana, as quais são capazes de hidrolisar os fosfatos γ e β dos nucleosídeos di e trifosfatos (Laliberte & Beaudoin, 1983, Zimmermann, 2000). Informações sobre estas enzimas podem ser encontradas na literatura sob diferentes nomenclaturas, tais como ecto-ATPase, ATP-difosfoidrolase, apirase, ATPDase, entre outras (Yegutkin, 2008). Todos os membros desta família compartilham cinco domínios de sequência altamente conservados conhecidos como “regiões conservadas da apirase” (ACRs) (Handa & Guidotti, 1996, Schulte am Esch et al., 1999), que presumivelmente são de grande importância para sua atividade catalítica.

Atualmente, sabe-se que oito diferentes genes *Entpd* codificam os membros desta família de proteínas. As NTPDases 1, 2, 3 e 8 são enzimas tipicamente localizadas na superfície celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Por outro lado, as NTPDases 5 e 6 exibem uma localização intracelular e podem ser secretadas. Finalmente, as NTPDases 4 e 7 estão localizadas intracelularmente, tendo o seu sítio catalítico voltado para o lúmen das organelas citoplasmáticas (Robson et al., 2006) (Figura 4).

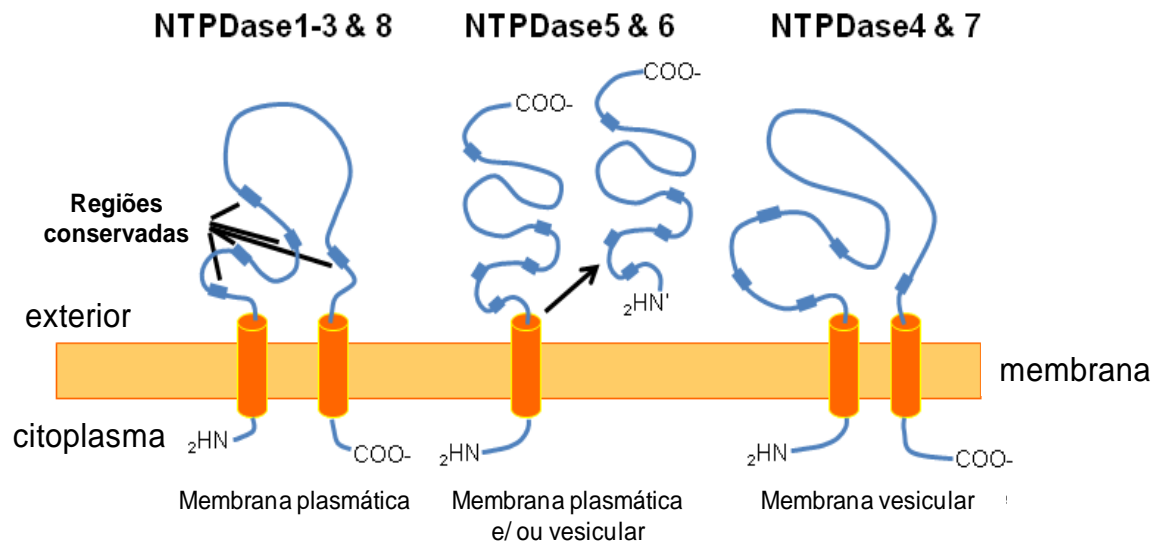


Figura 4: Topografia de membrana predita para os membros da família E-NTPDase. Adaptado de (Lévesque, 2010).

As NTPDases distinguem-se umas das outras por sua localização celular e por suas propriedades funcionais. Desta maneira, as isoformas localizadas na superfície celular (NTPDase1,2,3,8) requerem concentrações milimolares dos íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} para sua atividade máxima (Kukulski et al., 2005) e todas hidrolisam os nucleosídeos trifosfatos, incluindo o ATP e o UTP. Entretanto, as razões de hidrólise entre os nucleosídeos tri e difosfatos varia consideravelmente entre os subtipos: a NTPDase1 hidrolisa o ATP e o ADP igualmente bem (razão de hidrólise ATP:ADP=1:1); as NTPDases 3 e 8 revelam uma preferência pelo ATP sobre o ADP como substrato (razão de hidrólise ATP:ADP=3:1 e 2:1, respectivamente); e a NTPDase2 apresenta uma alta preferência pelos nucleosídeos trifosfatos (razão de hidrólise ATP:ADP=30:1), tendo sido previamente classificada como uma ecto-ATPase (Kukulski et al., 2005, Zimmermann, 2001).

A NTPDase5, localizada no retículo endoplasmático, hidrolisa preferencialmente os nucleotídeos GDP e UDP, enquanto que a NTPDase6, localizada no complexo de Golgi,

revela uma maior preferência pelos nucleotídeos GDP e IDP. Acredita-se que estas enzimas sejam clivadas da membrana plasmática e secretadas para o meio extracelular, podendo encontrar-se sob a forma solúvel (Zimmermann, 2001).

A NTPDase4 prefere o UDP como substrato. Além disso, as isoformas de humanos estão localizadas no complexo de Golgi (NTPDase4 β) ou nos vacúolos lisossomais (NTPDase4 α). Ambas as isoformas hidrolisam nucleosídeos di e trifosfatos, mas possuem uma baixa preferência por ATP e ADP. A NTPDase4 α tem alta preferência por UTP e TTP, enquanto o CTP e o UDP são os melhores substratos para a NTPDase4 β (Wang & Guidotti, 1998). A NTPDase7 está localizada em vesículas intracelulares e tem como substratos preferenciais os nucleosídeos trifosfatos (Zimmermann, 2001).

A presença das NTPDases na superfície celular é considerada de grande importância na modulação da sinalização por nucleotídeos, uma vez que elas controlam a disponibilidade dos agonistas dos receptores P2. No entanto, a falta de ferramentas adequadas não tem permitido evidenciar a contribuição exata destas enzimas na sinalização purinérgica (à exceção da NTPDase1, que será discutida no tópico relativo à sinalização purinérgica no sistema vascular). Na verdade, a inibição das NTPDases tem sido descrita; porém, a maioria das moléculas capazes de reduzir a atividade destas enzimas afetam também os receptores P2 (Munkonda et al., 2007, Robson et al., 2006), o que impede de maneira importante o avanço das descobertas em curso.

1.4.2. As Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases (E-NPPs)

A família das nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases (EC 3.1.4.1; EC 3.6.1.9; EC 3.6.1.8) consiste de sete ecto-enzimas estruturalmente relacionadas que são numeradas de acordo com sua ordem de descoberta NPP1-7 (Stefan et al., 2005). No entanto, apenas a NPP1 (também conhecida como antígeno de diferenciação celular plasmático PC-1), a NPP2

(autotaxina, fosfodiesterase 1 α) e a NPP3 (gp130^{RB13-6}, B10, fosfodiesterase 1 β), as quais apresentam um ancestral comum (Bollen et al., 2000, Vollmayer et al., 2003, Zimmermann, 2000), têm sido implicadas na hidrólise de nucleotídeos, sendo, portanto, relevantes no contexto da cascata de sinalização purinérgica (Goding et al., 2003). Os substratos para as NPPs 4 e 5 permanecem desconhecidos (Yegutkin, 2008). As NPPs 6 e 7, por sua vez, são conhecidas por hidrolisar somente ligações fosfodiéster presentes nos lisofosfolípides ou em outros fosfodiésteres de colina (Duan et al., 2003, Sakagami et al., 2005, Wu et al., 2005).

À exceção da NPP2, todas as NPPs são proteínas com um único domínio transmembrana. A NPP1 e a NPP3 apresentam uma orientação tipo-II com o seu terminal amino voltado para o citosol, enquanto que as NPPs 4 a 7 têm sido preditas por adotar uma orientação tipo-I com o seu terminal amino voltado para o meio extracelular (Bollen et al., 2000, Duan et al., 2003, Sakagami et al., 2005, Wu et al., 2005) (Figura 5). Em adição, formas solúveis para as NPPs 1, 3, 6 e 7 já foram identificadas, mas os mecanismos de sua geração permanecem pouco compreendidos (Belli et al., 1993, Hosoda et al., 1999, Meerson et al., 1998, Sakagami et al., 2005, Yegutkin et al., 2003). A NPP2 é sintetizada como uma pré-pró-enzima e existe apenas sob a forma secretada (Jansen et al., 2005).

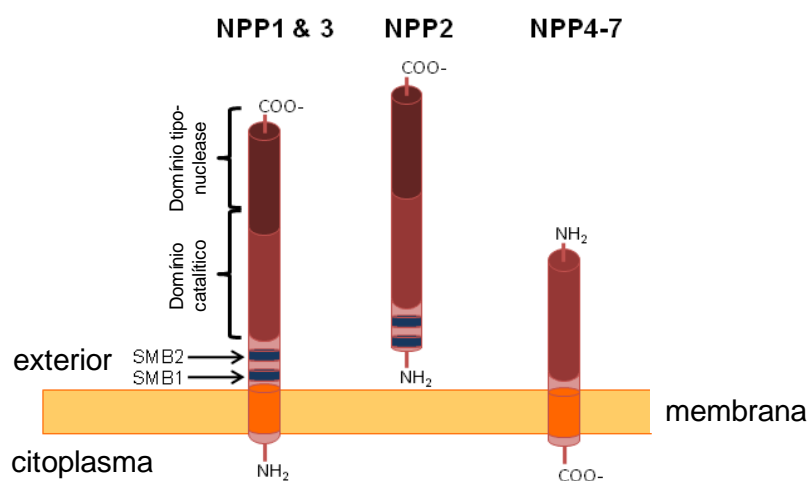


Figura 5: Estrutura dos domínios e orientação das NPPs na membrana. Adaptado de (Lévesque, 2010).

Os nucleotídeos ou derivados de nucleotídeos que servem como substratos para as NPPs 1, 2 e 3 incluem o ATP, os polifosfatos diadenosina ($A_{p_n}A$), o UDP-glicose, o NAD^+ , e a 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (Stefan et al., 2006). Estas enzimas participam de uma gama de funções fisiológicas, incluindo a reciclagem de nucleotídeos, a modulação da sinalização pelos receptores P2, a regulação dos níveis extracelulares de pirofosfato (que é de grande importância na mineralização óssea) e a motilidade celular (Goding et al., 2003). É importante salientar que uma distinção clara entre os membros das famílias E- NPP e E- NTPDase é bastante complicada, uma vez que estas enzimas são co-expressas em uma variável extensão entre os tecidos de mamíferos, além de compartilharem similaridades com relação à especificidade por substratos (Zimmermann, 2000).

1.4.3. A Ecto-5'-nucleotidase (CD73)

Sete membros da família das 5'-nucleotidases já foram isolados e caracterizados em humanos, estando cinco destes membros localizados no citosol, um na matriz mitocondrial e um ancorado à membrana plasmática externa por um resíduo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Yegutkin, 2008). Esta última enzima, ancorada à membrana plasmática, é conhecida sob o nome de ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) ou CD73 e hidrolisa de maneira eficiente o AMP ($K_M=3$ a $50 \mu M$) em adenosina, mostrando-se incapaz de metabolizar os nucleosídeos di e tri-fosfatos (Hunsucker et al., 2005, Zimmermann, 1992). Além disso, a ecto-5'-nucleotidase é uma metaloenzima que se liga ao zinco e apresenta-se principalmente como um dímero, em que cada monômero alcança um peso molecular aparente em torno de 62 a 74 kDa (Zimmermann, 2000) (Figura 6).

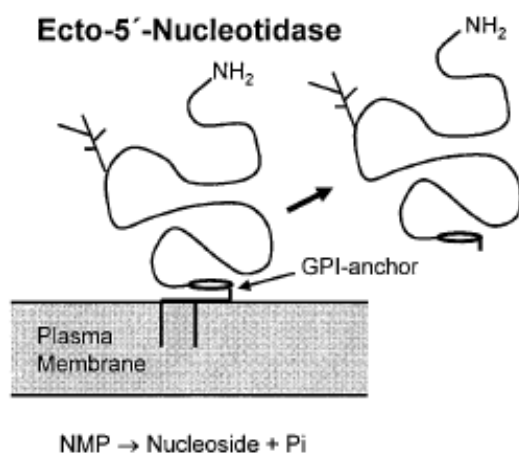


Figura 6: Topografia de membrana predita para a ecto-5'-nucleotidase de mamíferos. Tradução: *Plasma Membrane* = Membrana Plasmática; *GPI-anchor* = âncora de GPI (glicosil-fosfatidilinositol); *Nucleoside* = nucleosídeo. Adaptado de (Zimmermann, 2000).

Apesar do principal papel fisiológico para a ecto-5'-nucleotidase estar relacionado à regulação da cascata purinérgica (Hunsucker et al., 2005), outras funções não enzimáticas para a molécula CD73 têm sido propostas, tais como a indução da sinalização intracelular e a mediação das adesões célula-célula e célula-matriz (Resta et al., 1998, Sychala et al., 1999). A ecto-5'-nucleotidase é expressa em diferentes tecidos, sendo abundante em cólon, rim, cérebro, fígado, coração e pulmão (Moriwaki et al., 1999, Thompson et al., 2004, Zimmermann, 1992, Zimmermann, 1996b).

1.5. Sinalização Purinérgica no Sistema Vascular

A importância do sistema purinérgico na regulação cardiovascular tem se tornado cada vez mais evidente. Neste sentido, sabe-se que a sinalização pelos nucleotídeos estimula a vasoconstrição e o vasorelaxamento, o crescimento das células musculares lisas vasculares (VSMC) e das células endoteliais (EC) e a angiogênese; está envolvida no remodelamento vascular; estimula a agregação plaquetária; regula a coagulação, a inflamação e vários aspectos da função cardíaca (Burnstock, 2002a, Burnstock & Kennedy, 1986, Di Virgilio & Solini, 2002, Erlinge, 1998, Gachet, 2006, Olsson & Pearson, 1990, Ralevic & Burnstock, 1991). Além disso, o sistema purinérgico está envolvido na regulação da pressão sanguínea,

no desenvolvimento do infarto do miocárdio, na falência cardíaca e na rejeição ao xenotransplante (Erlinge & Burnstock, 2008).

Na circulação, os nucleotídeos ATP, ADP, UTP e UDP são liberados pelas células vermelhas do sangue, pelas EC e por plaquetas e neutrófilos ativados, em resposta a diferentes estímulos, tais como estresse de cisalhamento (Bodin & Burnstock, 2001), hiperóxia (Ahmad et al., 2004), hipóxia (Gordon, 1986), ou em resposta à estimulação por agonistas (Yang et al., 1994). Após liberados, os nucleotídeos participam do controle local e sistêmico do fluxo sanguíneo em diferentes níveis (Erlinge & Burnstock, 2008).

A ativação dos receptores P2 endoteliais pelos nucleotídeos liberados das EC induz a um vasorelaxamento local, o qual envolve os três principais fatores dilatadores: óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), dependendo da espécie e do território vascular considerados (Bodin & Burnstock, 2001). Diversos receptores têm sido implicados nestes processos. Os receptores P2X₁ e P2X₄ foram recentemente apontados como mediadores do vasorelaxamento induzido por ATP em artérias de resistência (Harrington et al., 2007, Yamamoto et al., 2006). Os receptores P2Y₁, ativados seletivamente por ADP, são dominantes em alguns vasos (Ralevic & Burnstock, 1998), enquanto que outros vasos apresentam os receptores P2Y₂, os quais são igualmente ativados por ATP e UTP para produzir relaxamento (Motte et al., 1995). As EC em alguns vasos também expressam outros tipos de receptores purinérgicos (P2Y₄ e P2Y₆) (Ralevic, 2001); e há ainda um outro receptor P2Y (P2Y₁₁) no endotélio de artéria e veia umbilical de humanos (Wang et al., 2002). Em contraste, a ativação de receptores P2 das VSMC promove vasoconstrição via P2X (Gitterman & Evans, 2001) ou P2Y sensíveis a pirimidinas (Malmsjö et al., 2000, von Kugelgen et al., 1987). O ATP co-liberado com a noradrenalina dos nervos simpáticos perivasculares atua principalmente sobre os receptores P2X₁ nas VSMC da camada média para produzir constrição, enquanto que o ATP liberado com um co-

transmissor a partir dos nervos sensorio-motores durante a atividade do arco-reflexo é capaz de dilatar alguns vasos (Burnstock, 2006c) (Figura 7). A adenosina produzida após a quebra do ATP liberado dos nervos e das EC causa vasodilatação via receptores P1 (geralmente do subtipo A₂) na musculatura lisa (Burnstock, 2009).

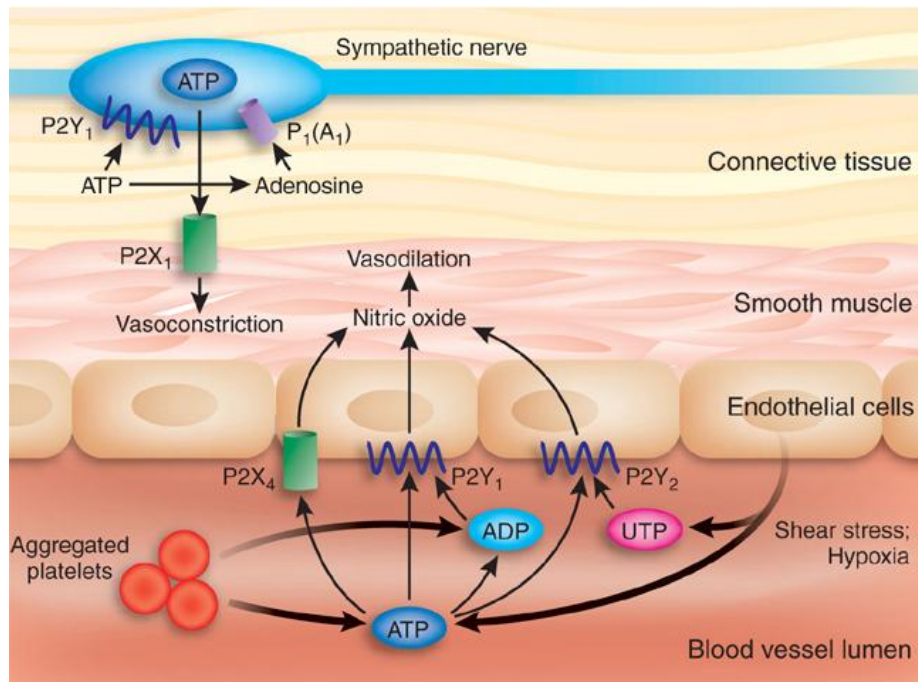


Figura 7: Controle purinérgico e pirimidinérgico do tônus vascular através dos receptores P2. Tradução: *Sympathetic nerve* = nervo simpático; *Connective tissue* = tecido conectivo; *Smooth muscle* = músculo liso; *Endothelial cells* = células endoteliais; *Shear stress* = estresse de cisalhamento; *Hypoxia* = hipóxia; *Blood vessel lumen* = lúmen do vaso sanguíneo; *Aggregated platelets* = plaquetas agregadas; *Nitric oxide* = óxido nítrico; *Vasodilation* = vasodilatação; *Vasoconstriction* = vasoconstrição; *Adenosine* = adenosina. Adaptado de (Burnstock, 2006c).

Como consequência dos efeitos vasculares apresentados, a modulação da relação nucleotídeos/ nucleosídeos na circulação tem um importante impacto no controle do tônus vascular e da pressão arterial. A concentração destas moléculas é finamente regulada pelas ectonucleotidasas (Plesner, 1995). Entre estas enzimas, a família das E-NTPDases parece ser a mais importante na vasculatura, sendo a NTPDase1 predominantemente expressa em EC e

VSMC (Sevigny et al., 2002) e responsável por grande parte da hidrólise dos nucleotídeos na superfície dos vasos sanguíneos (Kaczmarek et al., 1996, Sevigny et al., 1997). A NTPDase1 tem um importante papel nas propriedades anti-trombóticas das EC, uma vez que hidrolisa o ADP, que promove a agregação plaquetária através dos receptores P2X₁, P2Y₁ e P2Y₁₂ (este último é o alvo das drogas anti-plaquetárias seletivas para o ADP, ticlopidina e clopidogrel) (Andre et al., 2003, Marcus et al., 1991). O relevante papel desta enzima na prevenção da trombose foi confirmado em animais deficientes em NTPDase1 (*Entpd1^{-/-} null mice*), os quais apresentavam distúrbios na hemostasia e trombogênese (Enjyoji et al., 1999, Pinsky et al., 2002). Recentemente, a NTPDase1 foi apontada como a principal enzima envolvida na hidrólise dos nucleotídeos na superfície das VSMC, contribuindo para a regulação local do tônus vascular por estas moléculas (Kauffenstein et al., 2010). A NTPDase2 é expressa na camada adventícia que circunda os vasos sanguíneos, provavelmente na superfície dos fibroblastos. Sua preferência em hidrolisar o nucleotídeo ATP favorece o acúmulo de ADP, o qual é essencial para a agregação plaquetária (Maffrand et al., 1988). A NTPDase2 foi proposta como um promotor da hemostasia em sítios de extravasamento que ocorrem após uma injúria vascular (Sevigny et al., 2002). A ação da cadeia das ectonucleotidases é concluída pela enzima ecto-5'-nucleotidase que catalisa a hidrólise do monofosfonucleosídeo, gerando o respectivo nucleosídeo (Zimmermann, 1996a). Na vasculatura, a ecto-5'-nucleotidase está predominantemente associada ao endotélio vascular (Koszalka et al., 2004).

Nosso grupo de pesquisa tem contribuído para o entendimento da influência da sinalização purinérgica na regulação cardiovascular, especialmente no que se refere ao papel das ectonucleotidases em diferentes contextos fisiológicos e patológicos. Desta maneira, em 2006 descrevemos a presença da enzima E-NPP em plaquetas de ratos como parte de um complexo multi-enzimático para a hidrólise de nucleotídeos por estes fragmentos celulares

(Furstenau et al., 2006). No ano seguinte, demonstramos o aumento nas hidrólises de ATP, ADP e AMP em plaquetas de ratos que receberam injeções agudas de angiotensina II, além de alterações nas atividades enzimáticas plaquetárias de animais SHR (Furstenau et al., 2007). Em outros estudos, descrevemos que o hormônio tiroideano modula a atividade e expressão da ecto-5'-nucleotidase em VSMC (Tamajusuku et al., 2006) e da E-NTPDase em cardiomiócitos (Barreto-Chaves et al., 2006). Além disso, observamos que a submissão de ratos ao estresse crônico e agudo pode alterar a hidrólise dos nucleotídeos na fração sérica, sugerindo que esta sinalização possa servir como um marcador bioquímico para situações de estresse (Bohmer et al., 2003, Torres et al., 2002).

1.6. Sinalização Purinérgica no Rim

Os rins são responsáveis pelo controle da excreção de sal e água do organismo. Eles desempenham diversas funções essenciais, tais como: regulação da osmolaridade e do volume dos fluidos corporais, regulação do balanço eletrolítico, regulação do balanço ácido-base, excreção de produtos do metabolismo e substâncias exógenas e produção e secreção de hormônios. Portanto, trabalhando de forma integrada com os componentes do sistema cardiovascular, endócrino e sistema nervoso central, os rins controlam o volume dos fluidos corporais regulando a excreção de água e NaCl (Berne et al., 2004).

Sabe-se que o ATP pode ser liberado por praticamente todas as células renais e é encontrado no fluido tubular e na urina final (Schwiebert, 2001, Vekaria et al., 2006b). Além disso, os receptores purinérgicos P1 e P2 são expressos em todo o rim, sendo particularmente encontrados nos glomérulos e nos túbulos (Bailey et al., 2004, Chan et al., 1998, Turner et al., 2003, Unwin et al., 2003, Vitzthum et al., 2004).

O papel funcional para os nucleosídeos no rim está associado à modulação da reatividade vascular renal, em que a adenosina evoca uma resposta bifásica, causando vasoconstrição e vasodilatação através dos receptores A_1 e A_{2A} , respectivamente (Osswald et al., 1978). A ativação dos receptores P2 e as funções do ATP no rim têm sido foco de inúmeros estudos. As evidências funcionais encontradas suportam o ATP extracelular como o principal regulador autócrino e parácrino local da reatividade vascular da microvasculatura pré-glomerular, especialmente através da contração das células musculares lisas das arteríolas aferentes, envolvendo a ativação dos P2X e P2Y (Inscho, 2001b, Inscho et al., 1992). Além disso, um estudo demonstrou que a inibição da produção de NO pelo L-NAME diminuiu significativamente a vasodilatação pelo ATP, sugerindo um envolvimento do NO na vasodilatação mediada pelos receptores P2 (Wangenstein et al., 2000). Desta forma, a regulação do tônus vascular renal pelo ATP reflete o balanço de sinais celulares oriundos da ativação dos receptores P2 de EC e VSMC (Burnstock, 2006a).

Com a finalidade de manter constantes o fluxo sanguíneo, a taxa de filtração glomerular (GFR) e a entrega de oxigênio para os rins, estes órgãos desempenham o fenômeno conhecido como auto-regulação renal (Guyton et al., 1976). Este fenômeno consiste em alterar a resistência vascular em resposta a alterações na pressão transmural e inclui a manifestação de dois sistemas regulatórios, o mecanismo miogênico ao longo da árvore vascular pré-glomerular e o mecanismo de retroalimentação tubuloglomerular (TGF) (Navar et al., 1996, Vallon, 2003). Estes dois mecanismos fazem com que o rim mantenha um fluxo sanguíneo adequado mesmo durante as flutuações da pressão arterial sistêmica, facilitando sua habilidade em manter a homeostasia dos fluidos e eletrólitos (Guan et al., 2007).

O papel da retroalimentação tubuloglomerular tem despertado o interesse em identificar os fatores que medeiam a constrição das arteríolas aferentes. O ATP e a adenosina

têm sido apontados como mediadores da TGF (Castrop, 2007). Durante muito tempo, houveram controvérsias sobre qual das duas moléculas, ATP ou adenosina, de fato serviam como mediadores da TGF. Estudos recentes têm oferecido uma solução para este impasse, sugerindo que ambos possam estar envolvidos neste processo. Neste sentido, uma única via de sinalização assumiria que o ATP, liberado pelas células da mácula densa (células tubulares especializadas no ramo ascendente fino da alça de Henle), seria o mediador primário da TGF, sendo subsequentemente desfosforilado até adenosina, a qual causaria a constrição da arteríola aferente (Castrop, 2007). Cabe salientar que as ectonucleotidases são diferencialmente expressas ao longo do néfron (Figura 10) e podem influenciar a ativação dos purinoceptores renais pelos nucleotídeos e nucleosídeos (Vekaria et al., 2006a).

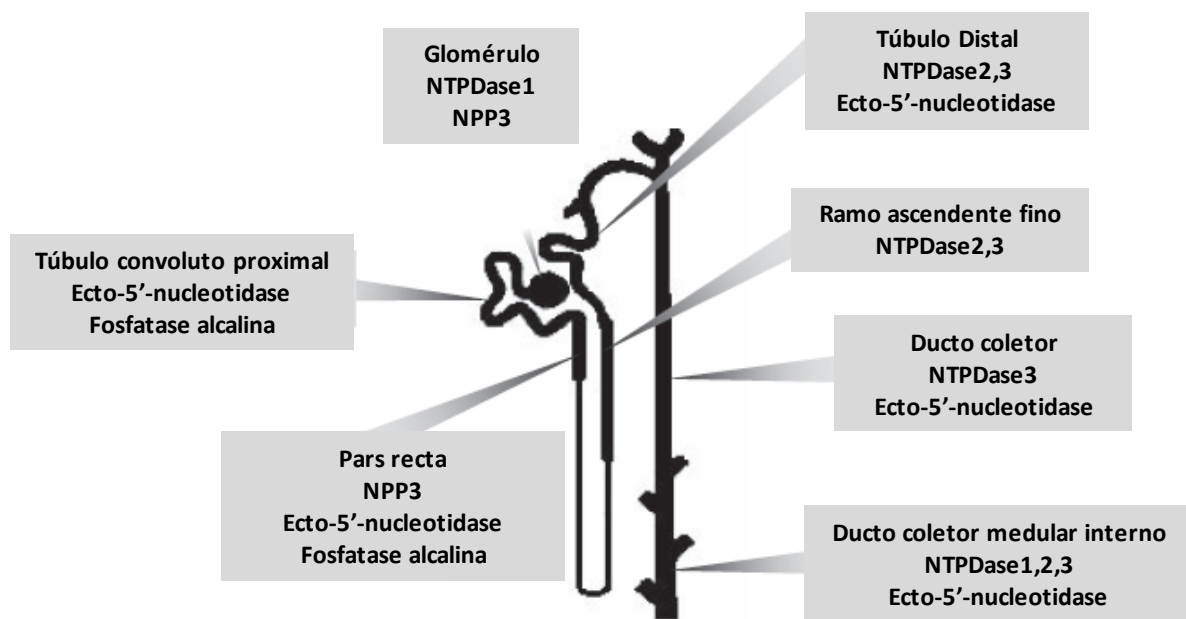


Figura 10: Resumo da distribuição das ectonucleotidases em néfron de ratos. Extraído de (Vekaria et al., 2006a).

2. Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença multifatorial e poligênica que envolve complexas interações entre mecanismos de controle homeostático determinados

geneticamente e por fatores ambientais (Takahashi & Smithies, 2004). Esta patologia caracteriza-se pela elevação sustentada da pressão arterial sistêmica (Ganong, 1995), com valores iguais ou acima de 140 mmHg para a pressão sanguínea sistólica (pressão máxima atingida durante a sístole – esvaziamento – ventricular) e/ou iguais ou mais altos que 90 mmHg para a pressão sanguínea diastólica (pressão mínima atingida durante a diástole – enchimento – ventricular) (Chobanian et al., 2003, Krieger et al., 1996). Estima-se que a hipertensão arterial seja responsável por 7.1 milhões de mortes prematuras em todo o mundo (Whitworth, 2003). No Brasil, as doenças cardiovasculares são o principal grupo de causas de morte e representavam cerca de 32% do total de mortes no país em 1998. Além disso, dados do Estado do Rio Grande do Sul, apontam para uma prevalência de HAS (níveis \geq 140/90 mmHg) em torno de 34% na população adulta (Gus et al., 2004).

A pressão arterial é determinada pelo volume de sangue bombeado pelo coração em um minuto (débito cardíaco) e pela resistência dos vasos sanguíneos, principalmente das arteríolas, ao fluxo sanguíneo (resistência vascular sistêmica ou periférica) (Krieger et al., 1996). Ela é continuamente influenciada por complexos sistemas pressores (como os nervos simpáticos e as catecolaminas, a angiotensina, a endotelina, etc) e depressores (como o NO, a bradicinina, etc) (Krieger et al., 1996), sendo que a HAS resulta da perda do balanço entre estes fatores e, portanto, da perda da habilidade do endotélio em vasodilatar normalmente (Cohen, 2007) (Figura 8). Em princípio, a hipertensão pode ser causada por um aumento no volume extracelular ou por um acréscimo na resistência periférica, a qual é determinada pela viscosidade do sangue e, de maneira mais importante, pelo calibre de resistência dos vasos (Ganong, 1995). Entretanto, 90% dos indivíduos hipertensos são considerados como portadores de hipertensão arterial essencial ou primária, ou seja, portadores de HAS cuja causa da patologia não é completamente conhecida (Silbernagl & Despopoulos, 2003).

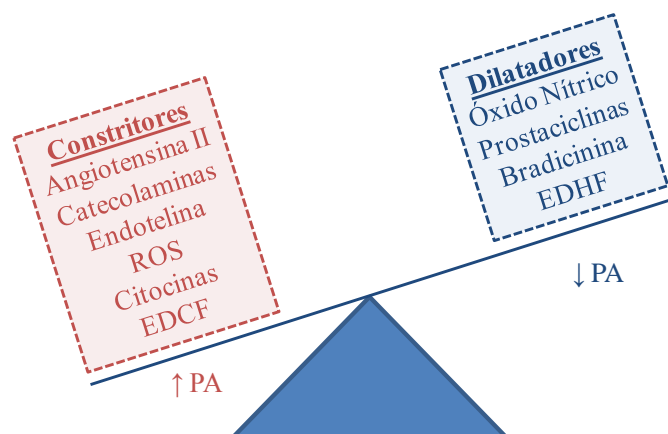


Figura 8: Hipertensão associada ao desbalanço na produção e/ou atividade das moléculas vasoconstritoras e vasodilatadoras (ROS: espécies reativas de oxigênio; EDCF: fatores constritores derivados do endotélio; EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio). Inspirado em imagem do sítio na internet www.hypertensiononline.org (Acessado em 21/01/2010).

Diversos fatores genéticos e ambientais são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento da HAS. Assim, a pressão arterial aumenta linearmente com a idade (Vasan et al., 2001), a qual é acompanhada pelo aumento no risco absoluto de desenvolvimento de doença cardiovascular (Lewington et al., 2002). Estimativas globais dão conta de que as taxas de hipertensão entre os homens são mais elevadas até os 50 anos e, entre as mulheres, a partir da sexta década (Kearney et al., 2005). O elevado consumo de sódio e um nível sócio-econômico mais baixo também contribuem para o desenvolvimento da HAS (Drummond & Barros, 1999, Lessa, 2001). Em adição, o excesso de massa corporal é um fator predisponente para a hipertensão e, coerentemente, a perda de peso acarreta em redução da pressão arterial (Neter et al., 2003). O consumo de bebidas alcóolicas (Stranges et al., 2004) e o sedentarismo aumentam a incidência de hipertensão (Paffenbarger et al., 1991) e estudos recentes apontam para o fato de que o estresse psicoemocional também pode contribuir para a elevação sustentada da pressão arterial (Thomas & Parati, 2005).

A hipertensão, todavia, não consiste somente em um fenômeno de elevação da pressão sanguínea sistêmica; ela frequentemente co-existe com outras anormalidades associadas que

podem direta ou indiretamente perpetuar o início e o progresso da sua complicação mais comum - a arteriosclerose – (Ding, 1996), e de suas conseqüências – infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, lesões renais, entre outras (Silbernagl & Despopoulos, 2003). Desta forma, a HAS pode ser referida como uma síndrome que, até hoje, pode ser tratada, porém não apresenta cura. O objetivo, portanto, de uma terapia anti-hipertensiva adequada não reside somente em diminuir os níveis da pressão sanguínea, mas também em tratar seus fatores de risco associados (Ding, 1996).

2.1. Hipertensão Arterial Induzida por L-NAME

Em 1978, Furchgott e colegas demonstraram a existência de uma substância produzida pelas EC que era capaz de relaxar os vasos sanguíneos e denominaram-na como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (Furchgott, 1983). Em 1986, o NO foi identificado como sendo este fator e, desde então, esta molécula tem sido apontada por influenciar diversos aspectos da fisiologia cardiovascular (Strijdom et al., 2009). O NO é sintetizado a partir da L-arginina por ação da óxido nítrico sintase (NOS) (Moncada et al., 1991), que atualmente é reconhecida em três isoformas: nNOS – neuronal; iNOS – induzível ou relacionada à inflamação; e eNOS – endotelial (Lowenstein & Michel, 2006).

Na vasculatura, o efeito global do NO é o de promover a vasodilatação e um estado anti-inflamatório e anti-trombótico (Strijdom et al., 2009). Esta molécula exerce seus efeitos sobre as células musculares da camada média dos vasos sanguíneos. De fato, o NO atua através da ativação da guanilato ciclase heterodimérica solúvel, estimulando-a a produzir o mensageiro intracelular GMP cíclico (GMPc). O GMPc ativa a proteína cinase G (PKG), a qual ativa a fosfatase que, por sua vez, desfosforila a cadeia leve da miosina (MLC), causando o relaxamento da musculatura lisa (Ogut & Brozovich, 2008, Surks, 2007).

A inibição crônica da produção de NO pela administração de análogos da L-arginina, como o *N*_ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Figura 9), produz uma elevação da pressão sanguínea dependente de volume, a qual está positivamente co-relacionada à dose e ao tempo de administração do L-NAME em diferentes espécies animais (Zatz & Baylis, 1998). As características fisiológicas e patológicas da HAS causada pela inibição da produção de NO assemelha-se à hipertensão essencial (Romero & Strick, 1993) e alterações nesta via de sinalização têm sido apontadas por influenciar o desenvolvimento de muitas formas de hipertensão (Lerman et al., 2005).

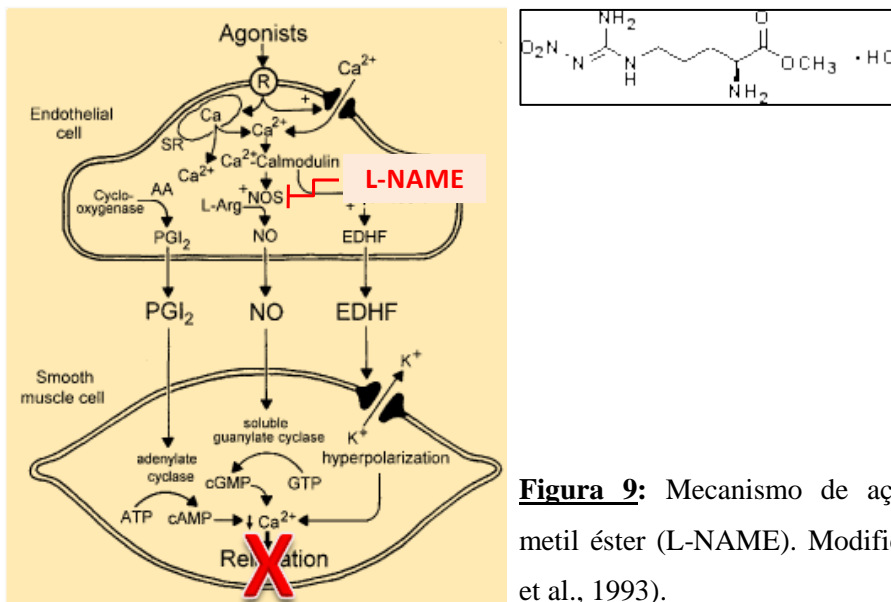


Figura 9: Mecanismo de ação do *N*_ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Modificado a partir de (Vanhoutte et al., 1993).

2.2. Hipertensão Arterial e Sinalização Purinérgica

A regulação da pressão arterial pela sinalização purinérgica é o resultado líquido do balanço entre os fatores contráteis e dilatadores (Erlinge & Burnstock, 2008). O ATP e o UTP liberados pelas células endoteliais e pelos eritrócitos no lúmen dos vasos estimulam a vasodilatação, em contraste à sua liberação pelos nervos no lado da camada adventícia, o que resulta em vasoconstrição (Erlinge & Burnstock, 2008). O ATP também pode participar da

regulação da pressão sanguínea através de mecanismos renais ou atuando em regiões do tronco cerebral relacionadas ao controle neural da pressão arterial (Inscho et al., 2004).

Diversos modelos animais de hipertensão arterial têm revelado a participação da sinalização purinérgica no contexto desta patologia. Recentemente, um estudo demonstrou uma redução na transmissão purinérgica em artérias mesentéricas de ratos hipertensos por acetato de desoxicorticosterona (DOCA-sal), provavelmente por uma diminuição na biodisponibilidade de ATP nos nervos simpáticos destes animais (Demel & Galligan, 2008). O ATP desempenha um papel muito importante como um co-transmissor simpático em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Brock & Van Helden, 1995), em cujas aortas há um prejuízo no relaxamento ao ATP dependente do endotélio devido à concomitante produção de um fator constritor derivado do endotélio (Yang et al., 2004). Ainda com relação aos SHR, resultados do nosso grupo de pesquisa mostraram um aumento na atividade da ecto-5'-nucleotidase e um decréscimo na atividade da NPP em plaquetas destes animais (Furstenau et al., 2007). Além disso, sabe-se que o receptor $P2X_4$ é o receptor P2 mais expresso no endotélio e camundongos deficientes neste receptor apresentam níveis mais altos de pressão sanguínea e excretam quantidades menores dos produtos do NO na sua urina em comparação com camundongos selvagens (Yamamoto et al., 2006). Em 2005, um estudo relatou a diminuição na fluidez da membrana plasmática das EC de ratos velhos, o decréscimo na atividade da ecto-5'-nucleotidase e a diminuição nos níveis de adenosina extracelular, sugerindo que este contexto possa estar relacionado à hipertensão nestes animais (Hashimoto et al., 2005).

O envolvimento da sinalização por nucleotídeos no desenvolvimento da HAS também tem sido evidenciado em humanos. Em 2003, um estudo demonstrou que pacientes hipertensos e diabéticos/ hipertensos apresentavam diminuição na agregação plaquetária e nos tempos de sangramento e coagulação, os quais foram acompanhados por um aumento nas

hidrólises de ATP e ADP (Lunkes et al., 2003). Além disso, a uridina tetrafosfato adenosina (Up4A) tem sido apontada como um novo fator vasoconstritor mais potente do que a endotelina na vasoconstrição renal, podendo ser clivada em ATP e UTP e estimular ambos os receptores P2X₁ e P2Y₂ nas VSMC, resultando no aumento da pressão arterial (Jankowski et al., 2005). Finalmente, a expressão proteica do receptor P2X₄ é regulada positivamente na placenta em casos de pré-eclampsia (Roberts et al., 2007). Desta maneira, a liberação de ATP estimulada por estresse de cisalhamento e sua ação através dos receptores P2X₄ pode representar um importante fator na regulação da pressão arterial.

Apesar da grande quantidade de estudos disponíveis na literatura mostrando as interações entre a sinalização purinérgica e o contexto da HAS, pouco se conhece sobre a relação entre a sinalização por nucleotídeos e a hipertensão induzida pelo bloqueio da síntese do NO por análogos da L-arginina, como o L-NAME, por exemplo.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Verificar a participação da sinalização purinérgica na hipertensão arterial induzida por L-NAME.

2. Objetivos Específicos

2.1. Avaliar o perfil das atividades de ectonucleotidases em soro e plaquetas de ratos submetidos à hipertensão arterial pela administração de L-NAME.

2.2. Avaliar o perfil das atividades de ectonucleotidases em membranas renais e o padrão de expressão destas enzimas em rins de ratos submetidos à hipertensão arterial pela administração de L-NAME.

2.3. Avaliar o efeito da hipertensão induzida por L-NAME sobre as atividades de hidrólise de nucleotídeos em soro e em sinaptossoma cardíaco de ratos fêmeas.

PARTE II

CAPÍTULO I

Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats

Cristina Ribas Fürstenau, Danielle da Silva Trentin, Agnes Nogueira Gossenheimer, Denise

Barbosa Ramos, Emerson André Casali, Maria Luiza Morais Barreto-Chaves, João José

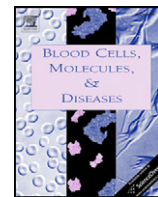
Freitas Sarkis

Artigo publicado no periódico *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 41 (2008) 223-229.



Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules, and Diseases

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

Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats

Cristina Ribas Fürstenau^{a,*}, Danielle da Silva Trentin^a, Agnes Nogueira Gossenheimer^a, Denise Barbosa Ramos^a, Emerson André Casali^b, Maria Luiza Morais Barreto-Chaves^c, João José Freitas Sarkis^a^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil^b Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS, Brazil^c Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 20 November 2007

Revised 15 February 2008

Available online 17 June 2008

(Communicated by B. Collier, M.D., 30 April 2008)

Keywords:

Ectonucleotidases

Serum

Platelets

L-NAME-induced hypertension

ABSTRACT

It is well known that hypertension is closely associated to the development of vascular diseases and that the inhibition of nitric oxide biosynthesis by administration of N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) leads to arterial hypertension. In the vascular system, extracellular purines mediate several effects; thus, ADP is the most important platelet agonist and recruiting agent, while adenosine, an end product of nucleotide metabolism, is a vasodilator and inhibitor of platelet activation and recruitment. Members of several families of enzymes, known as ectonucleotidases, including E-NTPDases (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase), E-NPP (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) and 5'-nucleotidase are able to hydrolyze extracellular nucleotides until their respective nucleosides. We investigated the ectonucleotidase activities of serum and platelets from rats made hypertensive by oral administration of L-NAME (30 mg/kg/day for 14 days or 30 mg/kg/day for 14 days plus 7 days of L-NAME washout, in the drinking water) in comparison to normotensive control rats. L-NAME promoted a significant rise in systolic blood pressure from 112 \pm 9.8 to 158 \pm 23 mmHg. The left ventricle weight index (LVWI) was increased in rats treated with L-NAME for 14 days when compared to control animals. In serum samples, ATP, ADP and AMP hydrolysis were reduced by about 27%, 36% and 27%, respectively. In platelets, the decrease in ATP, ADP and AMP hydrolysis was approximately 27%, 24% and 32%, respectively. All parameters recovered after 7 days of L-NAME washout. HPLC demonstrated a reduction in ADP, AMP and hypoxanthine levels by about 64%, 69% and 87%, respectively. In this study, we showed that ectonucleotidase activities are decreased in serum and platelets from L-NAME-treated rats, which should represent an additional risk for the development of hypertension. The modulation of ectonucleotidase activities may represent an approach to antihypertensive therapy via inhibition of spontaneous platelet activation and recruitment, as well as thrombus formation.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Hypertension has been considered as one of the most important factors associated with the development of vascular diseases. Worldwide hypertension is estimated to cause 7.1 million premature deaths and its prevalence in developing countries is already as high as those in developed countries [1]. This pathology can be caused by an increase in the cardiac output volume or by an increase in peripheral resistance [2], however, in 90% of patients with high blood pressure, the cause of hypertension is unknown and these individuals are termed carriers of essential hypertension.

Nitric oxide (NO) synthesis and release by endothelial cells play an important vascular relaxation effect [3], contributing to the modulation of vascular tone. In addition, NO has been identified as important

in other cellular events, such as vascular smooth muscle cell proliferation [4] and neural transmission [5]. Chronic inhibition of NO produces volume-dependent elevation of blood pressure and its physiological and pathological characteristics resemble essential hypertension [6]. Besides, it is well established that acute inhibition of nitric oxide biosynthesis by *in vivo* administration of N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), a L-arginine analogue, leads to arterial hypertension and renal vasoconstriction [6].

In recent years, the participation of extracellular nucleotides in the regulation of blood flow has become more evident. In the vascular system, these molecules can recruit and activate platelets, activate endothelial cells and induce vasoconstriction [7]. As such, ADP acts upon platelets, regulating their aggregation and modifying their shape [8], while ATP has been postulated to be a competitive inhibitor of ADP-induced platelet aggregation [9]. Furthermore, adenosine, produced by nucleotide catabolism, is recognized as a vasodilator and inhibitor of platelet aggregation that can decrease arterial blood pressure [10].

The modulation of the nucleotide/nucleoside ratio in the circulation can affect thrombosis and inflammation [11]. Members of several

* Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – ANEXO, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: + 55 51 3308 5540.

E-mail address: cristinafurstenau@terra.com.br (C.R. Fürstenau).

families of enzymes, known as ectonucleotidases, are able to hydrolyse extracellular ATP and ADP [12], including E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) and E-NPP (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) families. The nucleotide hydrolysis leads to AMP formation that, by the action of an ecto-5'-nucleotidase, is converted to adenosine [13]. ATP and other nucleotides can be broken down by ectonucleotidases both in the soluble form, located in the interstitial medium or within body fluids, and in the membrane-bound form [14]. The action of these enzymes is important for the efficient regulation of extracellular nucleotide and adenosine levels under physiological conditions [15,16].

Platelets maintain vascular integrity, promoting the primary and secondary hemostasis that occurs after blood vessel damage [16]. Spontaneous platelet aggregation is largely reported in hypertension cases [17] and its specific role in the pathophysiology of this disease must be considered since platelets can promote thrombotic complications, serve as control systems for vascular tone and, in the active state, promote atherosclerosis [18].

It is well established that a multienzymatic system for nucleotide hydrolysis, constituted at least by the enzymes E-NTPDase, E-NPP and ecto-5'-nucleotidase, is present both in serum [19,20] and on the surface of intact platelets [21–23]. In this study we investigated the ectonucleotidase activities in the serum and platelets of rats that developed hypertension in response to oral administration of L-NAME in comparison to normotensive control animals.

Materials

Chemicals

N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) as well as *p*-Nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP), nucleotides and Trizma Base were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tetrabutylammonium chloride was purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA) and anesthetic sodium thiopental from Cristália (São Paulo, SP, Brazil). Sepharose 2B gel was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden) and was de-aerated in a vacuum flask before packing in a polyethylene column. The creatinine dosage kit was obtained from Doles (Goiânia, GO, Brazil). Collagen was obtained from Chrono-Log Co. (Havertown, PA). All other reagents were also of analytical grade.

Animals

Male Wistar rats, weighing about 250 g, from our breeding stock were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle (lights on 7:00 a.m.) at constant room temperature. Unless otherwise mentioned, they received water and rat chow *ad libitum*. All protocols were in accordance with the guidelines of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council) and all efforts were made to minimize the number of animals used in this study and their suffering.

Experimental protocols

Protocol 1 – The rats were randomly divided in two groups, normotensive and hypertensive. In the hypertensive group, hypertension was induced by the oral administration of the NOS (nitric oxide synthase) inhibitor L-NAME (30 mg/kg body weight/day) in the drinking water for 14 days (L-NAME-treated group). In the normotensive group, the animals received normal tap water throughout the entire experiment (control group). These rats were euthanized on day 15.

Protocol 2 – For this protocol, both groups of animals (L-NAME-treated and control groups) were treated exactly as described previously in protocol 1, except for the washout (in the absence of L-NAME) per-

formed for a week between the end of the treatment and the day of the experiment. Thus, in this protocol, the animals were euthanized on day 22 and used for further experiments.

Hemodynamic parameter determination

In all rats, systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) were measured in awake animals, three times during the treatments, at approximately the same time of day by tail-cuff plethysmography (Kent Scientific; RTBP1001 Rat Tail Blood Pressure System for rats and mice, Litchfield, USA). Rats were conditioned with the apparatus before measurements were taken. In protocol 1, SBP was recorded at day 0 (before the beginning of the treatment), at day 7 (7 days after the treatment with L-NAME began) and at day 14 (the last day of the treatment). In protocol 2, SBP was measured at day 0 (before the beginning of the treatment), at day 14 (the day L-NAME administration was ceased) and at day 21 (7 days after washout and one day before the animals were euthanized). The heart rate values were derived from the pulsations detected by SBP.

Cardiac weight index

The cardiac weight index was determined as previously outlined by Zanfolin [24], except the hearts were analyzed just after they were removed (without fixation). Briefly, total ventricular weight was obtained by removing both atria and left ventricle weight was determined after the removal of the right ventricle. Thus, both ventricle VWI (Ventricle Weight Index) and LVWI (Left Ventricle Weight Index) were obtained by the ratio of VW (in milligrams) or LVW (in milligrams) to animal body weight (BW, in grams). The relationship between cardiac weight and body weight was considered as an index of cardiac hypertrophy [25]. In addition, cardiac hypertrophy was also assessed and confirmed by analyzing LVWI as dry weight (Dry-LVWI).

Platelet isolation

For platelet isolation, about 5.0 mL of blood was collected in plastic tubes containing sodium citrate (3.8%, w/v). The blood was centrifuged at 200 \times g for 5 min. The supernatant containing white blood cells was then centrifuged at 200 \times g for 30 min to generate platelet-rich plasma (PRP). Resting platelets were then isolated exactly as previously described by Hantgan [26]. Briefly, platelets were separated from plasma by gel filtration on a 1.5 \times 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% (w/v) sodium azide, pH 6.8 (Ca²⁺-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 containing the maximum platelet content (visually determined) were used for subsequent experiments. Polyethylene or siliconized labware was used for all platelet isolation and incubation procedures. The original platelet count in the animals was $503 \pm 83.35 \times 10^3/\mu\text{L}$ (control group) and $498 \pm 41.88 \times 10^3/\mu\text{L}$ (L-NAME-treated group) and the platelet count of the platelet-rich plasma (after the plasma had been eluted from the Sepharose 2B column) used for further experiments was $403 \pm 23.43 \times 10^3/\mu\text{L}$ (control group) and $427.67 \pm 92.73 \times 10^3/\mu\text{L}$ (L-NAME-treated group) (means \pm S.D., n = at least 3 per group).

Isolation of serum

For enzymatic assays, blood samples were prepared as previously described by Yegutkin (1997) [27], with minor modifications. Blood was drawn after decapitation of male Wistar rats weighing about 250 g and was allowed to clot at room temperature for 30 min. Blood

was centrifuged in glass tubes at 5000 $\times g$ for 5 min at room temperature. The resultant serum samples were kept on ice and immediately used for enzymatic assays.

The serum samples for HPLC assays were obtained by cardiac puncture from anesthetized (sodium thiopental 40 mg kg^{-1}) adult male rats. The blood was allowed to clot at room temperature for 30 min. Blood was then centrifuged at 5000 $\times g$ for 5 min at room temperature and the serum was obtained [28].

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard [29].

Assays of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) and Ecto-5'-nucleotidase activities

For the assay of E-NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase activities from platelets, the reaction mixture employed contained 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM $CaCl_2$ or 5.0 mM $MgCl_2$, pH 7.5, in a final volume of 200 μL . About 20 μg of platelet protein were added per tube and protein was preincubated for 10 min at 37 $^{\circ}C$. The enzyme reactions were started by the addition of nucleotide (ATP/ADP for E-NTPDase and AMP for Ecto-5'-nucleotidase) to a final concentration of 0.5 mM. After 60 min, trichloroacetic acid (TCA) (5%, final concentration) was added to stop the reactions. For the incubation of E-NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase from serum samples, the reaction mixtures contained 112.5 mM Tris-HCl, pH 8.0. The content of protein was 1.0 mg per tube. To start the reactions, substrates were added to the medium in a final concentration of 3.0 mM. TCA (5%, final concentration) was used to stop the enzymatic reactions after 40 min of incubation. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the enzymatic reactions. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was carried out using a colorimetric method as previously outlined [30]. Controls to correct for non-enzymatic substrate hydrolysis were performed by adding platelet preparations after the reactions had been stopped with TCA. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nmol Pi released per minute per milligram of protein.

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

The phosphodiesterase activity was assessed using *p*-Nph-5'-TMP (an artificial substrate), as previously outlined [20]. Briefly, for assay of platelet E-NPP activity, the reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM $CaCl_2$, pH 8.9 was preincubated with approximately 20 μg per tube of platelet protein for 10 min at 37 $^{\circ}C$ in a final volume of 200 μL . Additionally, for assay of E-NPP activity in serum samples, the reaction medium containing 100 mM Tris-HCl, pH 8.9, was preincubated with approximately 1.0 mg of serum protein for 10 min at 37 $^{\circ}C$. The enzyme reactions were started by the addition of *p*-Nph-5'-TMP to a final concentration of 0.5 mM. After the incubation time (80 min for platelet protein and 8 min for serum), 200 μL NaOH 0.2 N was added to the medium to stop the reactions. Incubation times and protein concentrations were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. The amount of *p*-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of $18.8 \times 10^{-3} M/cm$. Controls to correct for non-enzymatic substrate hydrolysis were performed by adding platelet preparations after the reaction had been stopped with NaOH. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nmol *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein.

Analysis of purine levels in serum by high pressure liquid chromatography (HPLC)

The denaturation of sample proteins was performed using 0.6 mol/L perchloric acid. All samples were then centrifuged (14000 $\times g$ for 10 min) and the supernatants were neutralized with 4.0 N KOH and clarified with a second centrifugation (14000 $\times g$ for 15 min). Aliquots of 50 μL were applied to a reverse-phase HPLC system using a 25 cm C_{18} Shimadzu column (Shimadzu, Japan) at 260 nm with a mobile phase containing 60 mM KH_2PO_4 , 5.0 mM tetrabutylammonium chloride, pH 6.0, in 30% methanol according to a method previously described [31]. The peaks of purines (ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine, allantoin, hypoxanthine and uric acid) were identified by their retention times and quantified by comparison with standards. The results are expressed by the amount of the different compounds per mL of serum.

Platelet aggregation assays

The blood for platelet aggregation assays was collected by cardiac puncture from anesthetized (sodium thiopental 40 mg kg^{-1}) adult male rats into plastic tubes containing sodium citrate (3.8%, w/v). Blood samples were centrifuged at 200 $\times g$ for 15 min at room temperature to achieve a platelet-rich plasma (PRP) suspension. Platelet aggregation assays were performed on a SpectraMax microplate reader (Molecular Devices, USA), as previously described [32], with further modifications. Briefly, platelet agonists (10 μM ADP or 2.0 $\mu g/mL$ collagen), 2.0 mM $CaCl_2$ and Tyrode/BSA were mixed in 96-well-flat-bottom plates. Aggregation was triggered by the addition of 100 μL of platelet suspension in a final reaction volume of 150 μL . The plate was incubated for 2 min at 37 $^{\circ}C$ before the beginning of stirring and readings were followed at 650 nm every 11 s for 20 min. Changes in turbidity were measured in absorbance units and the results were obtained as area under the aggregation curves. Platelet aggregation and shape change were also monitored using an aggregometer (Chrono-Log Co., Havertown, PA).

Data analysis

Results are expressed as means \pm standard deviation (S.D.). The comparison among groups was made by Student's *t* test for independent samples. Statistically significant differences between groups were considered for a $P \leq 0.05$.

Results

Hypertension model validation

It is well known that the inhibition of nitric oxide biosynthesis causes hypertension [3]. In the present study, the oral administration

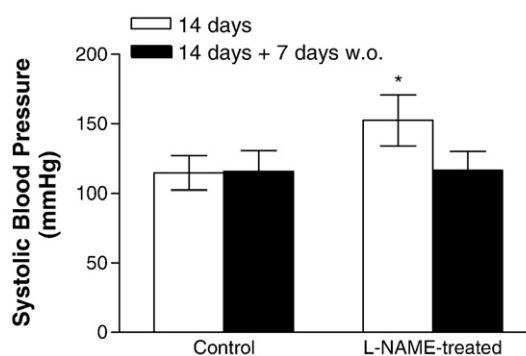


Fig. 1. Systolic blood pressure (SBP) measurements. SBP was followed as described in Materials. Results are presented as means \pm S.D. for at least 12 (Protocol 1) and 9 (Protocol 2) animals per group. The comparison among groups was made by Student's *t* test for independent samples. * Represents significant statistical difference compared to the respective control group, considering $P \leq 0.05$.

Table 1
Heart rate and cardiac index

	After 14 days of treatment		After 14 days of treatment plus 7 days of L-NAME washout	
	Control	L-NAME	Control	L-NAME
Heart rate (cpm)	369±14.5	349±16	368±23	369±1.27
BW (g)	270±28	255±29	256±21	249±27
VWI (mg/g)	2.9±0.21	3.0±0.32	2.8±0.2	2.81±0.21
LVWI (mg/g)	1.45±0.32	1.71±0.31*	1.51±0.21	1.51±0.2
Dry-LVWI (mg/g)	0.33±0.04	0.40±0.05*	–	–

Results are presented as means±S.D. of at least 12 (Protocol 1) and 9 (Protocol 2) animals per group. The comparison among groups was made by Student's *t* test for independent samples. * Represents significant statistical difference compared to the respective control group, considering $P \leq 0.05$.

of L-NAME (an inhibitor of nitric oxide synthase) in the tap water for 14 days, was associated with a progressive and significant rise in SBP from 112.52±9.87 mmHg in the control group to 157.93±23.17 mmHg in the L-NAME-treated group. After 7 days of L-NAME washout, blood pressure returned to control levels (Fig. 1).

No difference was observed in the water consumption after administration of L-NAME among the experimental groups. Moreover, the heart rate, expressed as cycles per minute (cpm), remained unchanged in the L-NAME-treated group in both protocols compared to the respective control group. With regard to the left ventricle weight index (LVWI), animals treated for 14 days with L-NAME had a significant increase in this index when compared to control animals. This index returned to normal after 7 days of L-NAME washout (Table 1). Wet-to-dry weight ratios did not differ significantly among the groups. This indicates that the L-NAME-induced changes were due to changes in cardiac muscle mass and not in myocardial water content.

Effect of L-NAME on ectonucleotidase activities in serum and platelets

The oral administration of L-NAME in the tap water for 14 days was associated with a reduction in ATP, ADP and AMP hydrolysis by serum and platelets. In serum samples, ATP, ADP and AMP hydrolysis were reduced by about 27%, 36% and 27%, respectively (Fig. 2A). In platelets, the hydrolysis of ATP was diminished by about 27%, while ADP hydrolysis was decreased by 24%, and AMP hydrolysis was reduced by approximately 32% (Fig. 2B). No changes were observed in the hydrolysis of the E-NPP substrate, *p*-Nph-5'-TMP, either in serum or platelets (Fig. 2A and B).

To determine if the effects in both serum and platelets fractions on the ectonucleotidase activities were caused by the L-NAME *per se* or by the hypertension, a second protocol was developed as described in the Materials section. After 14 days of treatment with L-NAME plus 7 days of L-NAME washout, the reduction in ectonucleotidase activities was reversed in the serum (Fig. 3A) as well as in the platelets (Fig. 3B). Systolic blood pressure levels after 14 days of L-NAME treatment plus 7 days of drug washout were also reduced to the control levels as indicated in Fig. 1.

In vitro effect of L-NAME on ectonucleotidase activities in serum and platelets

The direct effect of L-NAME upon ectonucleotidase activities was tested by incubating serum and platelet samples obtained from untreated animals with different L-NAME concentrations (from 0.1 to 1.0 mM). L-NAME administered *in vitro* was not able to alter the ectonucleotidase activities of either serum or platelets from untreated rats of all concentrations tested (Table 2).

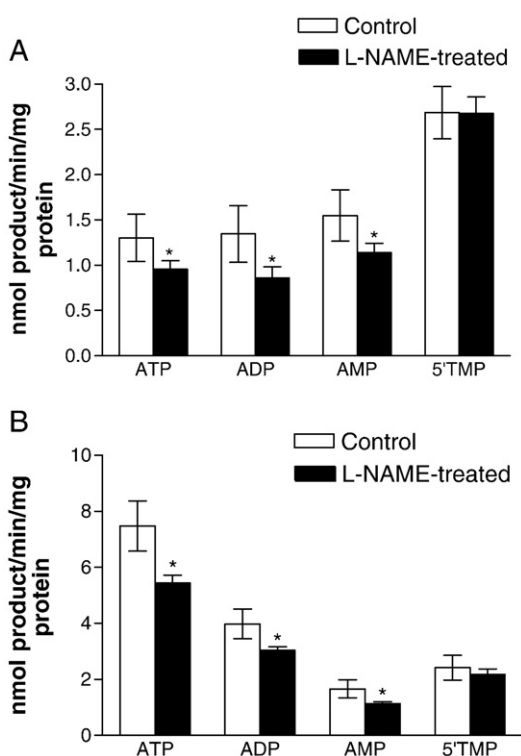


Fig. 2. Effect of L-NAME on ectonucleotidase activities. ATP, ADP and AMP hydrolysis were reduced in both serum (A) and platelets (B) from animals orally treated with L-NAME during 14 days. Results are expressed as means±S.D. ($n=6$ for each substrate tested in serum and $n=6, 9, 9, 6$ for ATP, ADP, AMP and *p*-Nph-5'TMP, respectively, in platelets). The comparison among groups was analyzed by Student's *t* test for independent samples. * Represents significant statistical difference compared to the respective control group, considering $P \leq 0.05$.

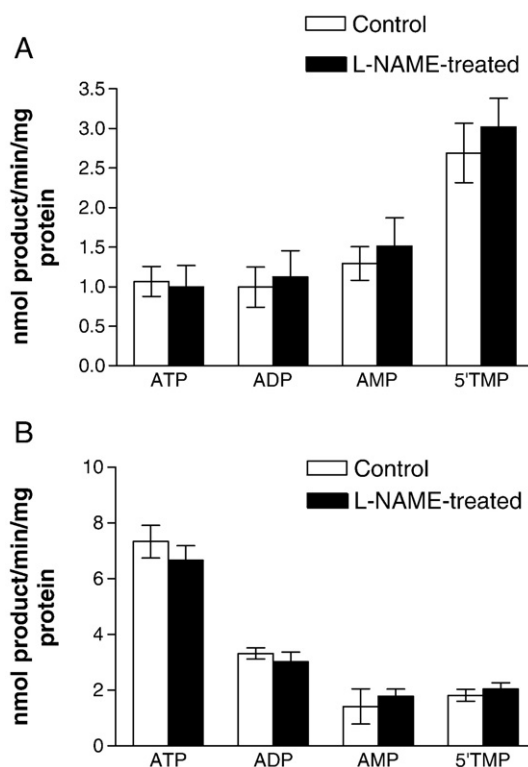


Fig. 3. Effect of L-NAME washout on ectonucleotidase activities. The decrease in ectonucleotidase activities was recovered both in serum (A) and in platelets (B) after 7 days of L-NAME washout following L-NAME treatment for 14 days. Results are presented as means±S.D. of $n=4, 5, 5, 7$ (serum) and $n=5, 5, 8, 11$ (platelets) for ATP, ADP, AMP and *p*-Nph-5'TMP as substrates, respectively. The comparison among groups was made by Student's *t* test for independent samples. * Represents significant statistical difference compared to the respective control group, considering $P \leq 0.05$.

Table 2
In vitro effect of L-NAME on ectonucleotidase activities from serum and platelets

L-NAME (mM)	Blood serum				Platelets			
	ATP	ADP	AMP	5'TMP	ATP	ADP	AMP	5'TMP
0.00	1.86±0.28	1.65±0.29	1.48±0.24	3.04±0.49	7.62±1.26	4.55±2.02	1.78±0.72	2.57±0.75
0.10	1.70±0.37	1.72±0.20	1.40±0.38	3.24±0.54	7.16±2.20	3.94±2.15	1.58±0.33	2.09±0.09
0.30	1.87±0.37	1.69±0.39	1.42±0.35	3.03±0.34	7.54±2.16	4.53±2.20	1.47±0.30	2.25±0.29
0.50	1.64±0.10	1.51±0.21	1.29±0.31	3.20±0.26	6.78±1.65	3.79±1.93	1.29±0.44	2.35±0.46
0.75	1.83±0.58	1.51±0.14	1.40±0.09	3.04±0.17	6.14±0.86	3.45±1.41	1.45±0.49	2.32±0.40
1.00	1.58±0.34	1.57±0.36	1.52±0.35	3.36±0.17	6.64±1.27	4.25±1.60	1.21±0.29	2.51±0.25

Results are presented as means±S.D. of at least 5 (serum) and 6 (platelets) independent experiments for each substrate tested.

Purine level measurement

The purine levels in the serum of control animals and animals treated with L-NAME for 14 days was measured by HPLC. The levels of ADP, AMP and hypoxanthine were significantly diminished in L-NAME-treated rats when compared to the control group. The reductions in ADP, AMP and hypoxanthine levels were of around 64%, 69% and 87%, respectively (Table 3).

Effect of L-NAME on platelet function

Fig. 4 shows the effect of L-NAME treatment on ADP and collagen-induced platelet aggregation. Results (means±S.D.) are expressed as percentage of maximal aggregation of four replicates for each group. The control group was considered as 100% of platelet aggregation. Despite the fact that no statistical differences were observed in platelet aggregation between the control and L-NAME-treated groups (Fig. 4A), it was visually noted that the size of the platelet aggregates formed when collagen was used as agonist was bigger in the L-NAME-treated group than those formed in the control group. This difference was also observed when using aggregometer to assess the platelet function (Fig. 4B).

Discussion

Arterial hypertension involves complex interactions between homeostatic control and environmental factors [6] and can frequently coexist with other abnormalities, such as aberrations in platelet function, that play an important role in the development of atherosclerosis [33]. Therefore, the goal of antihypertensive therapy is not only to reduce blood pressure, but also to treat its associated risk factors.

Many authors have reported the ability of the arginine analogue, L-NAME, to induce systemic arterial hypertension [24,34,35], which probably occurs due to the capacity of L-NAME to inhibit the production of nitric oxide, a well known vasodilator molecule, by blocking nitric oxide synthase (NOS) activity [36]. In the present study, we

Table 3
Purine level measurement

	Control (nmol/mL)	L-NAME-treated (nmol/mL)
ATP	0.600±0.194	0.469±0.180
ADP	0.249±0.061	0.090±0.040**
AMP	0.419±0.149	0.129±0.096*
Adenosine	13.515±4.239	19.519±6.168
Inosine	0.413±0.097	0.385±0.100
Allantoin	1.303±0.35	1.275±0.318
Hypoxanthine	70.670±12.41	8.810±3.273*
Uric Acid	234.481±52.52	239.263±35.972

The measurement of purine levels from serum of control and L-NAME-treated animals during 14 days was addressed using HPLC methodology, as described in the Materials section. Results are presented as means±S.D. (n=5 for control group and n=9 for L-NAME-treated group). The comparison among groups was made by Student's t test for independent samples. Statistical significant differences were considered for a P<0.05(*) and for a P<0.01 (**).

verified a significant rise in systolic blood pressure after 14 days of treatment with L-NAME (30 mg/kg/day), exactly as previously described by Balbinott and colleagues [37] (Fig. 1). It is well established that prolonged times of treatment, as well as higher doses of L-NAME, can lead to renal complications [24]. However, the specific protocol performed here to induce hypertension did not cause renal dysfunction since we could not observe differences between serum creatinine levels in control and L-NAME-treated animals (data not shown).

An increased left ventricle weight index (LVWI) value represents a cardiac alteration that is closely associated with hypertension. In Table 1, a significant increase in LVWI is shown in animals treated with L-NAME for 14 days, which reverses after 7 days of L-NAME washout. The increase in LVWI during L-NAME treatment is consistent with the cardiac hypertrophy associated with increased blood pressure [38], since the weight of the left ventricle is augmented in relation to the body weight, even considering the left ventricle dry weight. As previously indicated by Shapiro and colleagues [39], in its initial stages, the hypertrophied ventricle compensates for the increased workload, but in later stages this condition can lead to heart failure.

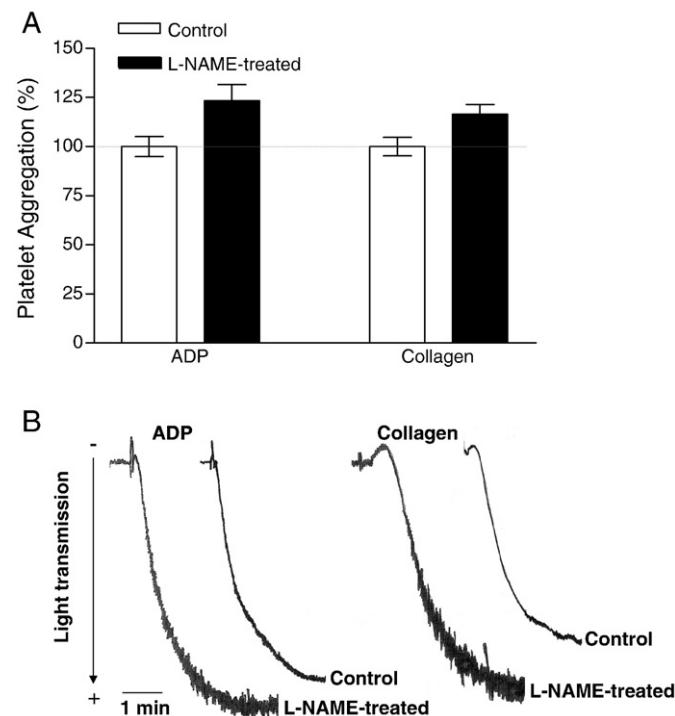


Fig. 4. Effect of L-NAME treatment on ADP- or collagen-induced platelet aggregation. (A) PRP from control animals in 96-microwell plates were exposed to 10 μM ADP or 2.0 μg/mL collagen (100% platelet aggregation). Aggregation plates were monitored every 11 s during 20 min in a SpectraMax plate reader. Results (means±S.D.) are expressed as percentage of maximal aggregation of four replicates for each group. No statistical differences were found. (B) Representative traces of platelet aggregation and shape change induced by ADP or collagen in both control and L-NAME-treated groups monitored using a Chrono-Log Aggregometer. Each tracing is representative of at least four similar experiments.

ATP, ADP and AMP hydrolysis were diminished in both serum and platelets of rats treated for 14 days with L-NAME in comparison to their respective control groups (Fig. 2). Taken together, these results could result in augmentation in platelet activation and aggregation, since ADP could accumulate in the extracellular milieu, and AMP hydrolysis is decreased, leading to decreased adenosine production. Thus, these data appear to agree with the finding that spontaneous platelet aggregation has been reported in cases of hypertension [17].

After treatment with L-NAME and subsequent 7 days of drug washout, no differences were observed in the hydrolysis of all substrates tested relative to their respective controls, both in serum and platelets (Fig. 3). Moreover, the levels of arterial systolic blood pressure returned to control levels (Fig. 1). Additionally, *in vitro* L-NAME did not alter ectonucleotidase activities in serum and platelets (Table 2), indicating that the drug was not able to induce any direct effect upon these enzymes. Thus, we cannot be certain whether the effects found in this study were due to L-NAME treatment, hypertension, or the combination of both conditions. The use of an anti-hypertensive drug that does not interact with the NO pathway together with L-NAME treatment might be able to differentiate between these effects.

Since ectonucleotidase activities are diminished in serum and platelets from L-NAME-treated animals, one would expect that serum purine levels would be increased. Surprisingly, ADP, AMP and hypoxanthine serum levels were decreased in L-NAME-treated animals (Table 3). We speculate that a compensatory mechanism occurs in order to avoid platelet aggregation and atherosclerosis development. We measured ectonucleotidase activities from serum and platelets, but we did not measure the action of NTPDase1 (endothelial CD39), the major ectonucleotidase in the vasculature [40]. This activity could be increased to compensate for the reduced ectonucleotidase activities observed in serum and platelets. Some reports describe the therapeutic potential of NTPDase1 for regulating nucleotide receptor (P2) function in the vasculature against, among other effects, thrombotic/inflammatory stress [41]. Also, Sévigny et al. [42] demonstrated that NTPDase1 interacts with the blood circulation and abrogates platelet aggregation. Thus, the participation of serum and platelets in the hydrolysis of circulating nucleotides could be different, but no less important, in comparison to the participation of NTPDase1. As such, further studies are necessary in order to answer the questions raised here.

Another consideration with regard to the discrepancy observed between the reduction in substrate hydrolysis and the results found using HPLC concerns the fact that purine catabolism is altered in essential hypertension, compared to normotensive individuals. Although Kinugawa and colleagues [43] did not address ADP and AMP levels, they reported that hypoxanthine levels were decreased in plasma from patients with hypertension submitted to exercise (to induce purine degradation).

We also performed some studies to assess the effect of L-NAME on platelet function. Fig. 4 shows that no differences in platelet aggregation were found between the control and L-NAME-treated groups. However, we observed a tendency to increased platelet aggregation in the L-NAME-treated group when either ADP or collagen was used as the platelet agonist. We speculate that this tendency could be confirmed with increases in the duration of L-NAME treatment, since the nitric oxide insufficiency is largely related to platelet activation and hyperaggregability [44–46].

In summary, we have shown that ectonucleotidase activities are altered in the serum and platelets from L-NAME-treated rats. The decrease in circulating nucleotide hydrolysis in L-NAME-treated animals may represent an additional risk factor for the initiation, the development, and the progress of arterial systemic hypertension. The modulation of ectonucleotidase activities both in serum and platelets could be valuable in antihypertensive therapy by regulating spontaneous platelet aggregation, as well as thrombus formation, which are important in the pathology of hypertension.

Acknowledgments

We thank Dr. Adriane Belló-Klein and her students from Departamento de Fisiologia of our University for technical support with blood pressure measurements. This work was supported by grants from CNPq-Brasil.

References

- [1] World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension, *J. Hypertens.* 21 (2003) 1983–1992.
- [2] W. Ganong, Review of Medical Physiology, 17th ed. Appleton & Lange, Connecticut, 1995.
- [3] H. Katsumi, M. Nishikawa, M. Hashida, Development of nitric oxide donors for the treatment of cardiovascular diseases, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 5 (2007) 204–208.
- [4] S. Moncada, E.A. Higgs, Nitric oxide and the vascular endothelium, *Handb. Exp. Pharmacol.* 176 (2006) 213–254.
- [5] G.A. Blaise, D. Gauvin, M. Gangal, et al., Nitric oxide, cell signaling and cell death, *Toxicology* 208 (2005) 177–192.
- [6] L.O. Lerman, A.R. Chade, V. Sica, C. Napoli, Animal models of hypertension: an overview, *J. Lab. Clin. Med.* 146 (2005) 160–173.
- [7] K.M. Dwyer, S.C. Robson, H.H. Nandurkar, et al., Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 1440–1446.
- [8] B.N. Kahner, H. Shankar, S. Murugappan, et al., Nucleotide receptor signaling in platelets, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 2317–2326.
- [9] S.B. Coade, J.D. Pearson, Metabolism of adenine nucleotides in human blood, *Circ. Res.* 65 (1989) 531–537.
- [10] J.C. Shryock, L. Belardinelli, Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology and pharmacology, *Am. J. Cardiol.* 79 (1997) 2–10.
- [11] M.M. El-Omar, N. Islam, M.J. Broekman, et al., The ratio of ADP- to ATP-ectonucleotidase activity is reduced in patients with coronary artery disease, *Thromb. Res.* 116 (2005) 199–206.
- [12] H. Zimmermann, J. Pearson, Extracellular metabolism of nucleotides and adenosine in the cardiovascular system, in: G. Burnstock, J.G. Dobson, B.T. Liang, J. Linden (Eds.), *Cardiovascular biology of purines*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998, pp. 342–358.
- [13] A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H. Drosopoulos, et al., Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection, *Semin. Thromb. Hemost.* 31 (2005) 234–245.
- [14] H. Zimmermann, M.T. Miras-Portugal, J. Pintor, Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature, *Drug. Dev. Res.* 52 (2001) 44–56.
- [15] H.J. Agteresch, P.C. Dagnelie, J.W. van der Berg, J.L. Wilson, Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications, *Drugs* 58 (1999) 211–252.
- [16] A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H.F. Drosopoulos, et al., Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 09–16.
- [17] M. Pravenc, J. Kunes, J. Zicha, et al., Platelet aggregation in spontaneous hypertension: genetic determination and correlation analysis, *J. Hypertens.* 10 (1992) 1453–1456.
- [18] P. Erne, T.J. Resink, E. Burgisser, et al., Platelets and hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7 (1985) 103–108.
- [19] J.P. Oses, C.M. Cardoso, R.A. Germano, et al., Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum, *Life Sciences* 74 (2004) 3275–3284.
- [20] H. Sakura, S. Nagashima, A. Nakahima, M. Maeda, Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation, *Thromb. Res.* 91 (1998) 83–89.
- [21] S.S. Frassetto, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, Characterization of an ATP diphosphohydrolyase activity (EC 3.6.1.5) in rat blood platelets, *Mol. Cell. Biochem.* 129 (1993) 47–55.
- [22] C.R. Fürstenau, D.S. Trentin, M.L.M. Barreto-Chaves, J.J.F. Sarkis, Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties, *Platelets* 17 (2006) 84–91.
- [23] M.M.F. Duarte, V.L. Loro, J.B.T. Rocha, et al., Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes, *FEBS J.* 274 (2007) 2707–2714.
- [24] M. Zanolini, M. Faro, E.G. Araújo, et al., Protective effects of BAY 41-2272 (sGC Stimulator) on hypertension, heart and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47 (2006) 391–395.
- [25] H. Kawaguchi, H. Sano, A. Kitabatake, Increased mRNA expression of renin-angiotensin system in hypertrophied rat heart, in: Sharma, et al., (Eds.), *Adaptation Biology and Medicine*, Narosa Publishing House, New Delhi, 1997.
- [26] R.R. Hantgan, A study of the kinetic ADP-triggered platelet shape change, *Blood* 64 (1984) 806–906.
- [27] G.G. Yegutkin, Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum, *Biochem.-Moscow* 62 (1997) 724–728.
- [28] G.G. Yegutkin, S.S. Samburski, S. Jalakanen, Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions, *FASEB J.* 17 (2003) 1328–1330.
- [29] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.

- [30] K. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–380.
- [31] W. Voelter, K. Zech, P. Arnold, G. Ludwig, Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography, *J. Chromatogr.* 199 (1980) 345–354.
- [32] I.M.B. Francischetti, J.M.C. Ribeiro, D. Champagne, et al., Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 12639–12650.
- [33] T.A. Duhamel, Y.J. Xu, A.S. Arneja, et al., Targeting platelets for prevention and treatment of cardiovascular disease, *Expert. Opin. Ther. Targets* 11 (2007) 1523–1533.
- [34] L.V. Rossoni, L. dos Santos, L.A. Barker, D.V. Vassalo, Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in l-NAME -induced hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41 (2003) 105–116.
- [35] R. Kalayci, M. Kaya, B. Ahishali, et al., Long-term l-NAME treatment potentiates the blood–brain barrier disruption during pentylentetrazole-induced seizures in rats, *Life Sci.* 30 (2006) 16–20.
- [36] S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43 (1991) 109–142.
- [37] A.W. Balbinott, M.C. Irigoyen, M.S. Brasileiro-Santos, et al., Dose-dependent autonomic dysfunction in chronic l-NAME hypertensive diabetic rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46 (2005) 563–569.
- [38] S.A. Doggrell, L. Brown, Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure, *Cardiovasc. Res.* 39 (1998) 89–105.
- [39] L.M. Shapiro, P.H. Sugden, Left ventricular hypertrophy, in: D.G. Julian, A.J. Camm, K.M. Fox, et al., (Eds.), *Diseases of the heart*, second ed., Saunders, London, 1996.
- [40] G.R. Dubyak, C. El-Moatassim, Signal transduction via P2 purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides, *Am. J. Physiol.* 265 (1993) 577–606.
- [41] S.C. Robson, J. Sévigny, H. Zimmermann, The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance, *Purin. Signal.* 2 (2006) 409–430.
- [42] J. Sévigny, C. Sundberg, N. Braun, et al., Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase 2 have implications for thromboregulation, *Blood* 99 (2002) 2801–2809.
- [43] T. Kinugawa, K. Ogino, S. Osaki, et al., Altered purine nucleotide degradation during exercise in patients with essential hypertension, *Metabolism* 6 (2001) 646–650.
- [44] J. Loscalzo, Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis, *Circ. Res.* 88 (2001) 756–762.
- [45] S. Moncada, E.A. Higgs, The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology, *Br. J. Pharmacol.* 147 (2006) 193–201.
- [46] L.R. Meirelles, A.C. Mendes-Ribeiro, M.M. Santoro, et al., Inhibitory effects of endogenous l-arginine analogues on nitric oxide synthesis in platelets: role in platelet hyperaggregability in hypertension, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34 (2007) 1267–1271.

CAPÍTULO II

L-NAME treatment alters ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats

Cristina Ribas Fürstenau, Denise Barbosa Ramos, Fernanda Cenci Vuaden, Danielle da Silva Trentin, Maurício Reis Bogo, Carla Denise Bonan, Maria Luiza Morais Barreto-Chaves, João José Freitas Sarkis and Susana Tchernin Wofchuk

Artigo submetido ao periódico *Life Sciences* em 24/02/2010.

Life Sciences <lifesci@elsevier.com>

1 de março de 2010 11:59

Para: cristinafurstenau@gmail.com

Dear Mrs. Basso,

Your submission entitled "L-NAME-treatment alters ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats" has been assigned the following manuscript number: LFS-D-10-00227.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Gerard Duggan
Journal Manager
Life Sciences

L-NAME-treatment alters ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats

Cristina Ribas Fürstenau^{a,✉}, Denise Barbosa Ramos^a, Fernanda Cenci Vuaden^a, Danielle da Silva Trentin^a, Maurício Reis Bogo^b, Carla Denise Bonan^c, Maria Luiza Morais Barreto-Chaves^d, João José Freitas Sarkis^a and Susana Tchernin Wofchuk^a

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ^bLaboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ^cLaboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ^dLaboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional, Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

✉Corresponding author: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica. Rua Ramiro Barcelos, 2600 – ANEXO, CEP 90035-003. Porto Alegre, RS, Brazil. Phone number: + 55 (51) 3308 5555 // Fax number: + 55 (51) 3308 5540. E-mail: cristinafurstenau@gmail.com.

Abstract

The kidneys serve to maintain fluid and electrolyte homeostasis by adapting renal excretion to bodily needs. Extracellular nucleotides (ATP, ADP, UTP and UDP) as well as the nucleoside adenosine are widely accepted as autocrine or paracrine signaling agents in different tissues, including the kidneys. The breakdown of these molecules involves several ectoenzymes called ectonucleotidases, which influence the extent of purinergic receptors activation. In the kidney, ATP and adenosine are known to participate in the regulation of renal microcirculation, renin secretion, and tubular function. Aims: To investigate the effect of N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment, known to induce a sustained elevation of blood pressure, on ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats. Main methods: L-NAME (30 mg/Kg/day) was administered to Wistar rats for 14 days in the drinking water. Enzyme activities were evaluated colorimetrically and their gene expression patterns were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. Key findings: We observed an increase in systolic blood pressure from 115 ± 12 mmHg (control group) to 152 ± 18 mmHg (L-NAME-treated group). Besides, the hydrolysis of ATP, ADP, AMP, and *p*-Nph-5'TMP were also increased (17%, 35%, 27%, 20%, respectively) as well as the gene expression of NTPDase2, NTPDase 3 and NPP3 in kidneys of hypertensive animals. Significance: The general augmentation in ATP hydrolysis and in ecto-5'-nucleotidase activity indirectly suggests an increment in renal adenosine levels and in renal autoregulatory responses in order to protect the kidney from the threat offered by hypertension.

Keywords: ectonucleotidases, L-NAME-treatment, hypertension, ATP, adenosine, kidney, rat

Introduction

Extracellular nucleotides and nucleosides exert a wide range of responses in several organs and tissues. ATP and ADP act throughout the activation of two major subfamilies of nucleotide-selective receptors, P2X and P2Y (Yegutkin 2008). Currently, seven subtypes of P2X ionotropic ligand-gated ion channel receptors (P2X₁₋₇) and eight subtypes of P2Y metabotropic G-protein coupled receptors (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) are clearly established and broadly distributed in different cell types (Burnstock 2006, Burnstock and Knight 2004). Moreover, there are four subtypes of P1 receptors (Zimmermann 2001), namely A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ that respond to the nucleoside adenosine (Burnstock 2006).

The breakdown of extracellular nucleotides involves several ectoenzymes, called ectonucleotidases (Lemmens et al. 2000). These enzymes can be located on the cell surface or may also be in the interstitial medium or within body fluids (Zimmermann 2001) and exhibit a broad substrate specificity and tissue distribution. The hydrolysis of nucleotides have included a role for ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases), ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs), ecto-5'-nucleotidases, and alkaline phosphatases (Yegutkin 2008). In mammals, eight different genes encode members of the NTPDase protein family (NTPDase1-8), which present different preference for substrates as well as different tissue distribution (Robson et al. 2006). NTPDase1, 2, 3 and 8 are expressed as cell surface-located enzymes; NTPDase5 and 6 exhibit intracellular localization and can be secreted; and NTPDase4 and 7 have an intracellular localization (Yegutkin 2008). The E-NPP family consists of seven members (NPP1 – NPP7), but only the first three members (NPP1 – NPP3) are able to hydrolyze extracellular nucleotides (Goding et al. 2003). Surface-associated ecto-5'-nucleotidase (CD73) efficiently hydrolyzes AMP leading to the production of adenosine (Zimmermann 1992). The coordinated action of these enzymes is important for

the efficient regulation of extracellular nucleotide and adenosine levels under physio(patho)logical conditions (Agteresch et al. 1999).

Kidneys are important excretory and regulatory organs since they serve to maintain fluid and electrolyte homeostasis by adapting renal excretion to bodily needs (Vallon 2008). It is known that ATP can be released by virtually all renal cells and it has been found in the tubular fluid and final urine (Vekaria et al. 2006, Schwiebert 2001). The kidney is composed of several different cell types and reveals a complex pattern of expression for P1 and P2 receptors, which are particularly found in glomeruli and tubules (Guan et al. 2007, Vitzthum et al. 2004, Turner et al. 2003). Accordingly, ectonucleotidases are also differentially expressed along the rat nephron and they can influence the activation of kidney purinoceptors by nucleotides and nucleosides (Vekaria et al. 2006). The purinergic signaling has been shown to participate in the regulation of renal function in a wide range of processes, including glomerular hemodynamics, microvascular function, tubuloglomerular feedback (TGF) and tubular transport (Kishore et al. 2005).

Arterial hypertension has been considered as one of the main factors associated to the development of vascular diseases (Whitworth 2003). Kidneys are important regulators of blood pressure since they are directly committed with the control of sodium and water balance and, consequently, with the control of extracellular volume (Rodrigues et al. 2006). Experimental evidence shows that in some hypertensive animal models renal autoregulation is impaired or renal autoregulatory response is reduced (Imig and Inscho 2002, Persson 2002). Chronic inhibition of NO synthesis, by the administration of L-arginine analogues like N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), produces volume-dependent elevation of blood pressure and renal vasoconstriction (Lerman et al. 2005).

Considering the wide range of effects of purines in the kidney and the broad distribution of purinoceptors and ectonucleotidases along this organ, it is reasonable to question the general balance of ectonucleotidases activities in the pathophysiology of hypertension. In the present study we investigated the effect of L-NAME treatment on ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats.

Materials and Methods

Chemicals

N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), *p*-Nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP), nucleotides, and Trizma Base were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Percoll was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden) and was routinely filtered through Millipore AP15 prefilters to remove aggregated and incompletely coated particles. Creatinine dosage kit was obtained from Doles (Goiânia, GO, Brazil). TRIzol® Reagent, dNTPs, oligonucleotides, Taq polymerase, Low DNA Mass Ladder and SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Primers were obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) and GelRed™ was obtained from Biotium (Hayward, CA).

Animals

Male Wistar rats (~ 250 g) from our breeding stock were maintained on a 12 h light/ 12 h dark cycle (lights on 7:00 a.m.) at a constant room temperature of 23 ± 1°C. Unless otherwise mentioned, they received water and rat chow ad libitum. All protocols were performed in accordance with the guidelines of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

(COBEA), based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council) and all efforts were made to minimize the number of animals used as well as their suffering.

Experimental Protocols

In the first set of experiments, the animals were randomly divided in two groups, normotensive and hypertensive. Hypertension was induced as previously outlined (Balbinott et al. 2005). Briefly, the inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), L-NAME (30 mg/Kg body weight/day), was administered in the drinking water for 14 days (L-NAME-treated group). The normotensive group received normal tap water throughout the entire experiment (control group). The animals were euthanized on day 15.

In the second set of experiments, both groups (L-NAME-treated and control) received the treatments exactly as described above, except for the washout period (in the absence of L-NAME), performed for a week between the end of the treatment and the day of the experiment. Therefore, in this set of experiments, the animals were euthanized on day 22.

Systolic Blood Pressure Determination

Systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) were assessed in awake animals for three times during the treatments, at approximately the same time of day by tail-cuff plethysmography (Kent Scientific; *RTBP1001 Rat Tail Blood Pressure System for rats and mice*, Litchfield, USA). The rats were accommodated to the apparatus before taking the measurements. In the first set of experiments, SBP was recorded at day 0 (before the beginning of the treatment), at day 7 (7 days after starting L-NAME treatment) and at day 14 (the last day of the treatment). In the second set of experiments, SBP was measured at day 0

(before the beginning of the treatment), at day 14 (the day in which the L-NAME administration was ceased) and at day 21 (7 days after L-NAME washout and one day before animals were euthanized). The heart rate values were derived from the pulsations detected by SBP.

Creatinine Levels Measurements

Increased levels of creatinine in the serum can indicate loss of renal function. We assessed the levels of serum creatinine in both control and L-NAME-treated animals, using a colorimetric kit according to the manufacturer's instructions.

Kidney Membranes Preparation

Kidney membranes were prepared essentially as previously outlined by Nagy and Delgado-Escueta (Nagy and Delgado-Escueta 1984) with minor modifications. Briefly, about 1.0 g of both right and left kidneys were dissected on ice, washed and homogenized (20 strokes at 1500 rpm) in 10 volumes of a medium containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM EDTA and 5.0 mM HEPES, pH 7.5 (Medium I), and then centrifuged at 1000 \times g during 10 minutes. The supernatant was collected and centrifuged again at 12000 \times g for 20 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1.2 mL of Medium I, and an aliquot of 1.0 mL was mixed with 4.0 mL of 8.5% Percoll solution and layered onto an isoosmotic discontinuous Percoll/sucrose gradient (10%/16%). After another centrifugation at 15000 \times g for 20 minutes, the fractions that banded at the 10%/16% Percoll interface were collected with a wide-tip disposable plastic transfer pipette. The kidney membrane fraction was washed twice with Medium I at 15000 \times g for 20 minutes to remove the contaminating Percoll. The pellet from the second centrifugation was resuspended in order to reach a final concentration

of 0.5 – 0.8 mg/mL. The membranes were prepared fresh daily and maintained at 0 – 4°C throughout the experimental procedure.

Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford 1976).

Assays of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) and Ecto-5'-nucleotidase Activities

For the measurement of ATP hydrolysis in membrane fractions, the reaction mixture employed contained 45 mM Tris-HCl, 5.0 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM sodium azide, 2.0 µg/mL oligomycin, pH 7.5, in a final volume of 200 µL. ADP hydrolysis was assessed using the same reaction mixture described above, except by the fact that 1.0 mM CaCl₂ was used and neither sodium azide nor oligomycin were employed in these assays. The activity of ecto-5'-nucleotidase was determined in a reaction medium containing 100 mM Tris-HCl, 1.0 mM MgSO₄, pH 7.5, in a final volume of 200 µL. About 13 µg of kidney membrane protein were added per tube and were preincubated for 10 minutes at 37 °C. The enzyme reactions were started by the addition of nucleotide as substrates in a final concentration of 1.0 mM (ATP/ADP) or 2.0 mM (AMP). After 10 minutes of incubation, trichloroacetic acid (TCA) (5%, v/v, final concentration) was added to stop the reactions. Incubation times, protein concentrations, reaction mixtures, and substrate concentration were used according to a study previously published (Vieira et al. 2001). The amount of inorganic phosphate (Pi) released was carried out using a colorimetric method as previously outlined by Chan and colleagues (Chan et al. 1986). Controls to correct for the non-enzymatic hydrolysis of the substrate were performed by adding membrane

proteins after stopping the reactions with TCA. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nmol Pi released per minute per milligram of protein.

Assay of Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) Activity

The phosphodiesterase activity was assessed using *p*-Nph-5'-TMP as an artificial substrate. Briefly, the reaction medium contained 50 mM Tris-HCl buffer, 5.0 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose, 1.5 mM CaCl₂, pH 8.9 and was preincubated with approximately 13 µg per tube of kidney membrane protein for 10 minutes 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 10 minutes of incubation, 200 µL of 0.2 N NaOH was used to stop the reaction. Incubation time and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. The amount of *p*-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of $18.8 \times 10^{-3}/\text{M}/\text{cm}$. Controls to correct for the non-enzymatic substrate hydrolysis were performed by adding kidney membrane protein after stopping the reaction NaOH. All samples were performed in triplicate. Enzyme activity was generally expressed as nmol *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein.

Analysis of Gene Expression by Semi-quantitative RT-PCR

Analysis of the expression of NTPDases 1, 2, 3 and 8, 5'-nucleotidase, and NPPs 1, 2 and 3 were carried out by a semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. After 14 days of the treatment with L-NAME, about 1.0 g of both right and left kidneys of rats was isolated for total RNA extraction using TRIzol[®] Reagent. RNA purity was quantified spectrophotometrically and assessed by electrophoresis in a 1.0% agarose gel

containing ethidium bromide. The cDNA species were synthesized using SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix from 3 µg of total RNA following suppliers. For PCR assays, 1 µL cDNA was used as a template. cDNA was screened with specific primers for NTPDase1-3 and 8, 5'-nucleotidase, and NPP1-3. The β-actin gene was used for normalization as a constitutive gene. PCR reactions had a volume of 25 µL using a concentration of 0.2 µM of each primer, 200 µM MgCl₂ and 1 U Taq polymerase. The cycling conditions for all PCR were as follows: Initial 1 minute of denaturation at 94°C, 1 min at 94°C, 1 minute of annealing (NTPDase1, 3, 8, NPP2, 3 and 5'-nucleotidase: 65°C; NTPDase2: 66°C; NPP1: 60°C; β-actin: 58.5°C), and 1 minute of extension at 72°C. These steps were repeated for 35 cycles. Finally, a 10 minutes final extension step at 72°C was performed. Primers sequences as well as the amplification products are listed in Table 1. Ten microliters of the PCR reaction were analyzed on 1% agarose gel using GelRed™ and photographed under UV light. The Low DNA Mass Ladder was used as a molecular marker. The images of stained PCR products were analyzed by optical densitometry and semi-quantified (enzyme/ β-actin mRNA ratio) using the computer software *Image J*.

Data Analysis

Results are expressed as means ± standard deviation (S.D.). The comparison among groups was made by Student's *t* test for independent samples. Statistically significant differences between groups were considered for a $P \leq 0.05$.

Results

Blood Pressure and Levels of Serum Creatinine

The hypertension caused by the inhibition of nitric oxide biosynthesis is well established (Katsumi et al. 2007). In the present study, we reported that oral administration of L-NAME (30 mg/Kg/day for 14 days) lead to a remarkable increase in SBP from 114.63 ± 12.38 mmHg (control group, n=10) to 152.43 ± 18.38 mmHg (L-NAME-treated group, n=13). After 7 days of L-NAME washout, blood pressure values returned to control levels (115.78 ± 14.93 mmHg, n=5 and 116.47 ± 13.60 mmHg, n=5, in the control and L-NAME-treated groups, respectively). Additionally, no differences were observed in the HR between the experimental groups (data not shown). Moreover, the arterial hypertension induced by L-NAME treatment was not able to modify serum creatinine levels (0.706 ± 0.010 mg/dL, n=10 in control group versus 0.682 ± 0.09 mg/dL, n=13 in L-NAME-treated group).

Effect of L-NAME on ectonucleotidase activities in kidney membranes

Figure 1 shows that oral administration of L-NAME for 14 days was associated to an increase in ATP, ADP, AMP and *p*-Nph-5'TMP hydrolysis in kidney membranes. The pattern of substrate hydrolysis reveals a ratio of ATP/ADP/AMP/*p*-Nph-5'TMP hydrolysis of approximately 2.3:1:1:1. Furthermore, ATP hydrolysis (A) was augmented by about 17%; ADP hydrolysis (B) was increased in 35%; the hydrolysis of AMP (C) was augmented in 27%; and the hydrolysis of the E-NPP substrate (D) was increased in 20%. In order to determine if the effects on ectonucleotidase activities could be reversed by stopping the treatment, a 7 days period of L-NAME washout was performed and enzymatic activities were evaluated again. Figure 2 shows that after 14 days of treatment with L-NAME plus 7 days of

L-NAME washout, both the hypertension and the increase in ectonucleotidase activities were reversed to control levels.

In addition to the results presented above, it was performed an in vitro protocol in order to assess the direct effect of L-NAME upon ectonucleotidase activities by incubating kidney membranes obtained from untreated animals with five different concentrations of L-NAME ranging from 0.1 to 1.0 mM. We found that L-NAME in vitro was not able to alter ectonucleotidase activities in kidney membranes in all concentrations tested (data not shown).

Effect of L-NAME treatment on ectonucleotidases mRNA expression

Since we found alterations on nucleotide hydrolysis after L-NAME treatment, we further evaluated the ectonucleotidases mRNA expression patterns after such treatment. Using specific primers (listed in Table 1), mRNAs for NTPDase1,2,3 and 8, ecto-5'-nucleotidase, NPP1,2 and NPP3 (Figure 3 and data not shown) were detected. The increases observed in ectonucleotidase activities can be a consequence of transcriptional control and/or post-translational regulation. Then, semi-quantitative RT-PCR analyses were made when kinetic alterations were observed. Results showed that the relative amount of E-NTPDase2, 3 and E-NPP3 transcripts were significantly increased (26.4%, 16% and 11%, respectively) in L-NAME-treated animals when compared to control animals (Figure 3A, 3B and 3C, respectively).

Discussion

The hydrolysis of ATP, ADP, AMP, and *p*-Nph-5'-TMP were increased in animals treated with L-NAME when compared to their respective untreated controls (Figure 1A – D, respectively). In addition, we found that ATP is hydrolyzed approximately 2.30 times better than other substrates, which is consistent with data previously reported in the literature for kidney membranes (Vieira et al. 2001). Different mechanisms can regulate ectonucleotidase activities, including transcriptional and/ or post-translational modifications. A semi-quantitative RT-PCR analysis of the patterns of ectonucleotidase gene expression after L-NAME treatment showed a significant increase in mRNA transcript levels of NTPDase2 and 3, and NPP3 (Figure 3A, 3B and 3C, respectively). Previous studies have already demonstrated that the enzymes able to hydrolyze extracellular nucleotides can be regulated at the transcriptional level following a drug treatment (Vuaden et al. 2007, Pedrazza et al. 2008, Rico et al. 2008). Therefore, we believe that augmented expression of NTPDase2, NTPDase3, and NPP3 could contribute for the enhancement observed in ATP, ADP and *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis in kidney membranes of L-NAME-treated animals.

Conversely, the increase observed in AMP hydrolysis in hypertensive group was not followed by an increase in ecto-5'-nucleotidase mRNA transcript levels (data not shown). However, this activity could be regulated by post-translational events, which could explain the increment verified in AMP hydrolysis. Using NetPhosK, a kinase-specific prediction of protein phosphorylation sites tool at <http://www.cbs.dtu.dk>, we verified that ecto-5'-nucleotidase sequence presents at least two sites with high possibility of phosphorylation by PKC located at threonine-432 and 479 residues. Our hypothesis is supported by other studies that have already demonstrated the modulatory effect of PKC on ecto-5'-nucleotidase (Sato et al. 1998, Node et al. 1997, Siegfried et al. 1995). Based on the different expression profiles of

NTPDases, NPPs and ecto-5'-nucleotidase found in kidney, it is possible to suggest that transcriptional and post-translational events, such as phosphorylation, are acting in a coordinated manner to up-regulate these enzyme activities.

After the 7 days of L-NAME washout period, both blood pressure and substrate hydrolysis (Figure 2) returned to control levels. In this sense, we can hypothesize that the results found in this study were probably due to the hypertensive condition since L-NAME in vitro had no direct effect upon nucleotide hydrolysis and the reversion in blood pressure levels led to the disappearance of the effect on ectonucleotidase activities.

Systemic hypertension is the main risk factor for the progressive loss of renal function. It is well known that in vivo administration L-NAME leads to arterial hypertension (Lerman et al. 2005) and that prolonged times of treatment as well as higher doses of L-NAME can cause renal complications (Zanfolin et al. 2006). However, the arterial hypertension induced by the treatment performed in this study was not able to cause renal damage since no significant differences in serum creatinine levels were detected among experimental groups. It was not surprisingly since the progression to kidney failure in primary hypertensive patients is a rare event as previously outlined (Tomson et al. 1991).

Extracellular purines are widespread molecules involved in a great number of pathophysiological processes. Despite the fact that only NTPDase2, NTPDase3, and NPP3 had their mRNA levels altered in this study, we also detected the presence of NTPDase1 and 8, NPP1 and 2 (the low mass splice variant), and ecto-5'-nucleotidase in kidney of rats (data not shown). In fact, this is in accordance to recent studies that have described the presence of several ectonucleotidases and purinoceptors along the nephron, the glomerulus, and the renal vascular system in the kidney (Vekaria et al. 2006, Kishore et al. 2005, Vitzthum et al. 2004,

Bailey et al. 2004, Turner et al. 2003, Unwin et al. 2003, Chan et al. 1998, Harahap and Goding 1988).

It is well known that afferent arteriolar resistance usually determines the degree of transmission of systemic pressure to glomerular capillary network. The normal kidney develops an autoregulatory mechanism in order to alter renal vascular resistance in response to alterations in transmural pressure (Guan et al. 2007). Despite the fact that kidney autoregulation process is not completely understood, it is generally recognized that this response involves a myogenic mechanism operating along the preglomerular vascular tree and the tubuloglomerular feedback (TGF), which enable the kidney to maintain blood flow and glomerular filtration rate (GFR) during fluctuations of systemic arterial pressure (Guan et al. 2007). Adenosine is able to cause a biphasic response in the kidney causing both vasoconstriction and vasodilatation through the activation of A_1 and A_{2A} receptors, respectively (Osswald et al. 1982). Extracellular ATP has been supported as the major local autocrine and paracrine regulator of pre-glomerular microvasculature reactivity, specially through the constriction of smooth muscle cells of afferent arterioles, involving both P2Y and P2X receptors (Inscho 2001, Inscho et al. 1992).

In the present study, we verified a general increase in ectonucleotidase activities in kidney membranes of L-NAME-treated rats. Several controversies have been raised about the role of ATP and/ or adenosine as mediators of TGF. Recent studies have offered a solution for this question suggesting that both molecules are involved in this process. The hypothesis accounts that ATP released by macula densa cells would be the primary mediator of TGF, being further converted to adenosine that would cause the constriction of afferent arterioles (Castrop 2007).

Conclusion

The results obtained in this study fit with the proposition stated above since they show an augmentation in ATP hydrolysis and indirectly suggest an increment in renal adenosine levels in hypertensive animals. Moreover, despite the fact that impairment in renal autoregulatory responses are reported in some animal models of hypertension (Imig and Inscho 2002, Persson 2002), in this case our data may reflect a significant increment in renal autoregulatory responses as an adaptative mechanism developed in order to protect the kidney from the threat offered by an increase of blood pressure. It is relevant to consider that increased concentrations of L-NAME as well as prolonged times of treatment could not have evoke the same responses. In this way, further studies are necessary to determine the degree of participation of these enzymes in the renal context of arterial hypertension as well as their consideration as potential targets for the adjuvant treatment of this pathology.

Acknowledgements

This work was supported by grants of CNPq-Brazil, FINEP research grant (IBN-Net) # 01.06.0842-00 and INCTen (National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection (CNPq-FINEP)).

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 58(2), 211-232, 1999.

Bailey MA, Turner CM, Hus-Citharel A, Marchetti J, Imbert-Teboul M, Milner P, Burnstock G, Unwin RJ. P2Y receptors present in the native and isolated rat glomerulus. *Nephron Physiology* 96(3), 79-90, 2004.

Balbinott AW, Irigoyen MC, Brasileiro-Santos MS, Zottis B, de Lima NG, Passaglia J, Schaan BD. Dose-dependent autonomic dysfunction in chronic L-NAME-hypertensive diabetic rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 46(5), 563-569, 2005.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254, 1976.

Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology* 240, 31-304, 2004.

Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological Reviews* 58(1), 58-86, 2006.

Castrop H. Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiologica (Oxford)* 189(1), 3-14, 2007.

Chan CM, Unwin RJ, Bardini M, Oglesby IB, Ford AP, Townsend-Nicholson A, Burnstock G. Localization of P2X1 purinoceptors by autoradiography and immunohistochemistry in rat kidneys. *American Journal of Physiology* 274 (4 Pt 2), F799-804, 1998.

Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157(2), 375-380, 1986.

Goding JW, Grobden B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica Biophysica Acta* 1638(1), 1-19, 2003.

Guan Z, Osmond DA, Inscho EW. Purinoceptors in the kidney. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 232(6), 715-726, 2007.

Harahap AR, Goding JW. Distribution of the murine plasma cell antigen PC-1 in non-lymphoid tissues. *Journal of Immunology* 141(7), 2317-2320, 1988.

Imig JD, Inscho EW. Adaptations of the renal microcirculation to hypertension. *Microcirculation* 9(4), 315-328, 2002.

Inscho EW, Ohishi K, Navar LG. Effects of ATP on pre- and postglomerular juxtamedullary microvasculature. *American Journal of Physiology* 263(5 Pt 2), F886-893, 1992.

Inscho EW. P2 receptors in regulation of renal microvascular function. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 280(6), F927-944, 2001.

Katsumi H, Nishikawa M, Hashida M. Development of nitric oxide donors for the treatment of cardiovascular diseases. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 5(3), 204-208, 2007.

Kishore BK, Isaac J, Fausther M, Tripp SR, Shi H, Gill PS, Braun N, Zimmermann H, Sévigny J, Robson SC. Expression of NTPDase1 and NTPDase2 in murine kidney: relevance

to regulation of P2 receptor signaling. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 288(5), F1032-1043, 2005.

Lemmens R, Kupers L, Sévigny J, Beaudoin AR, Grondin G, Kittel A, Waelkens E, Vanduffel L. Purification, characterization, and localization of an ATP diphosphohydrolase in porcine kidney. *American Journal Physiology - Renal Physiology* 278(6), F978-988, 2000.

Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 146(3), 160-173, 2005.

Nagy A, Delgado-Escueta AV. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *Journal of Neurochemistry* 43(4), 1114-1123, 1984.

Node K, Kitakaze M, Minamino T, Tada M, Inoue M, Hori M, Kamada T. Activation of ecto-5'-nucleotidase by protein kinase C and its role in ischaemic tolerance in the canine heart. *British Journal of Pharmacology* 120(2), 273-281, 1997.

Osswald H, Hermes HH, Nabakowski G. Role of adenosine in signal transmission of tubuloglomerular feedback. *Kidney International Supplement* 12, S136-142, 1982.

Pedrazza EL, Rico EP, Senger MR, Pedrazza L, Zimmermann FF, Sarkis JJ, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-nucleotidase pathway is altered by different treatments with fluoxetine and nortriptyline. *European Journal of Pharmacology* 583(1), 18-25, 2008.

Persson PB. Renal blood flow autoregulation in blood pressure control. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 11(1), 67-72, 2002.

Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, de Bem Arizi M, Dias RD, Souto AA, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Neurochemistry International* 52(1-2), 290-296, 2008.

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

Rodrigues CIS, D'Avila R, Fernandes FA, Almeida FA. Rim e hipertensão arterial (Chapter 3.8). In: Brandão AA, Amodeo C, Nobre F, Fuchs FD (Eds) *Hipertensão*. Elsevier, Rio de Janeiro, pp 86-93, 2006.

Sato T, Obata T, Yamanaka Y, Arita M. Effects of lysophosphatidylcholine on the production of interstitial adenosine via protein kinase C-mediated activation of ecto-5'-nucleotidase. *British Journal of Pharmacology* 125(3), 493-498, 1998.

Schwiebert EM. ATP release mechanisms, ATP receptors and purinergic signalling along the nephron. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28(4), 340-350, 2001.

Siegfried G, Vrtovsnik F, Prie D, Amiel C, Friedlander G. Parathyroid hormone stimulates ecto-5'-nucleotidase activity in renal epithelial cells: role of protein kinase-C. *Endocrinology* 136(3), 1267-1275, 1995.

Tomson CR, Petersen K, Heagerty AM. Does treated essential hypertension result in renal impairment? A cohort study. *Journal of Human Hypertension* 5(3), 189-192, 1991.

Turner CM, Vonend O, Chan C, Burnstock G, Unwin RJ. The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study. *Cells Tissues Organs* 175(2), 105-117, 2003.

Unwin RJ, Bailey MA, Burnstock G. Purinergic signaling along the renal tubule: the current state of play. *News in Physiological Sciences* 18, 237-241, 2003.

Vallon V. P2 receptors in the regulation of renal transport mechanisms. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 294(1), F10-27, 2008.

Vekaria RM, Shirley DG, Sévigny J, Unwin RJ. Immunolocalization of ectonucleotidases along the rat nephron. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 290(2), F550-560, 2006.

Vekaria RM, Unwin RJ, Shirley DG. Intraluminal ATP concentrations in rat renal tubules. *Journal of the American Society of Nephrology* 17(7), 1841-1847, 2006.

Vieira VP, Rocha JB, Stefanello FM, Balz D, Morsch VM, Schetinger MR. Heparin and chondroitin sulfate inhibit adenine nucleotide hydrolysis in liver and kidney membrane enriched fractions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33(12), 1193-1201, 2001.

Vitzthum H, Weiss B, Bachleitner W, Kramer BK, Kurtz A. Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney International* 65(4), 1180-1190, 2004.

Vuaden FC, Cognato GP, Bonorino C, Bogo MR, de Freitas Sarkis JJ, Bonan CD. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. *Life Sciences* 80(19), 1784-1791, 2007.

Whitworth JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension* 21(11), 1983-1992, 2003.

Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochimica Biophysica Acta* 1783(5), 673-694, 2008.

Zanfolin M, Faro R, Araujo EG, Guaraldo AM, Antunes E, De Nucci G. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 47(3), 391-395, 2006.

Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal* 285(Pt 2), 345-365, 1992.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research* 52, 44-56, 2001.

Table 1

Table 1: Primers sequences and PCR amplification products.

<i>Enzyme</i>	<i>Primers Sequences</i>	<i>Amplification Product (bp)</i>
β -actin	Rn β -actinF 5'-TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG-3' Rn β -actinR 5'-TAC TCC TGC TTC CTG ATC CAC AT-3'	210
NTPDase1	RnNTPDase1F 5'-GAT CAT CAC TGG GCA GGA GGA AGG-3' RnNTPDase1R 5'-AAG ACA CCG TTG AAG GCA CAC TGG-3'	543
NTPDase2	RnNTPDase2F 5'-GCT GGG TGG GCC GGT GGA TAC G-3' RnNTPDase2R 5'-ATT GAA GGC CCG GGG ACG CTG AC-3'	331
NTPDase3	RnNTPDase3F 5'-CGG GAT CCT TGC TGT GCG TGG CAT TTC TT-3' RnNTPDase3R 5'-TCT AGA GGT GCT CTG GCA GGA ATC AGT-3'	267
NTPDase8	RnNTPDase8F 5'-CCA CAC TGT CAC TGG CTT CCT TG-3' RnNTPDase8R 5'-ACG AGG ATG TAT AGG CCT GAG G-3'	394
5'-nucleotidase	RnCD73F 5'-CCC GGG GGC CAC TAG CAC CTC A-3' RnCD73R 5'-GCC TGG ACC ACG GGA ACC TT-3'	405
NPP1	RnNPP1F 5'- GAA TTC TTG AGT GGC TAC AGC TTC CTQ-3' RnNPP1R 5'-CTC TAG AAA TGC TGG GTT TTG CTC CCG GCA-3'	410
NPP2 (2)	RnNPP2F 5'-CCA TGC CAG ACG AAG TCA GCC GAC C-3' RnNPP2R 5'-CCA AAC ACG TTT GAA GGC GGG GTA C-3'	512
NPP3	RnNPP3F 5'-GAG AAG ACA AAT TTG CCA TTT GGG AGG-3' RnNPP3R 5'-TCT CAT TAT TTC CTT TGA TTG CGG GAG-3'	301

(2) Represents that the low mass (512 bp) splice isoform of NPP2 was found in kidney membranes.

Legends to Figures

Figure 1: Effect of L-NAME treatment on ectonucleotidase activities. ATP (A), ADP (B), AMP (C), and *p*-Nph-5'TMP (D) hydrolysis were increased in kidney membranes from animals orally treated with L-NAME for 14 days. Results are expressed as means \pm S.D. (n=9, 10, 13, and 6 for ATP, ADP, AMP, and *p*-Nph-5'TMP hydrolysis, respectively). The comparison among groups was analyzed by Student's *t* test for independent samples. * Represents the significant statistical difference in comparison to the respective control group, considering $P \leq 0.05$.

Figure 2: Effect of L-NAME washout on ectonucleotidase activities. The increase observed on ectonucleotidase activities was recovered in kidney membranes after 7 days of L-NAME washout following the L-NAME treatment during 14 days. Results are presented as means \pm S.D. of n=6, 8, 9, 5 for ATP, ADP, AMP, and *p*-Nph-5'TMP as substrates, respectively. The comparison among groups was analyzed by Student's *t* test for independent samples. * Represents the significant statistical difference in comparison to the respective control group, considering $P \leq 0.05$.

Figure 3: Semi-quantitative RT-PCR analysis of patterns of ectonucleotidase genes expression after L-NAME treatment (30 mg/Kg/day for 14 days). Kidneys were excised and total RNA was isolated. An increase in the number of transcripts of NTPDase2 (A), NTPDase3 (B) and NPP3 (C) were found in kidneys from hypertensive animals. The enzyme/ β -actin mRNA ratios were obtained by optical densitometry analysis. Data are expressed as means \pm S.D. of at least 5 experiments, with entirely consistent results. *Represents the significant statistical difference in comparison to the respective control group, considering $P \leq 0.05$.

Figure 1

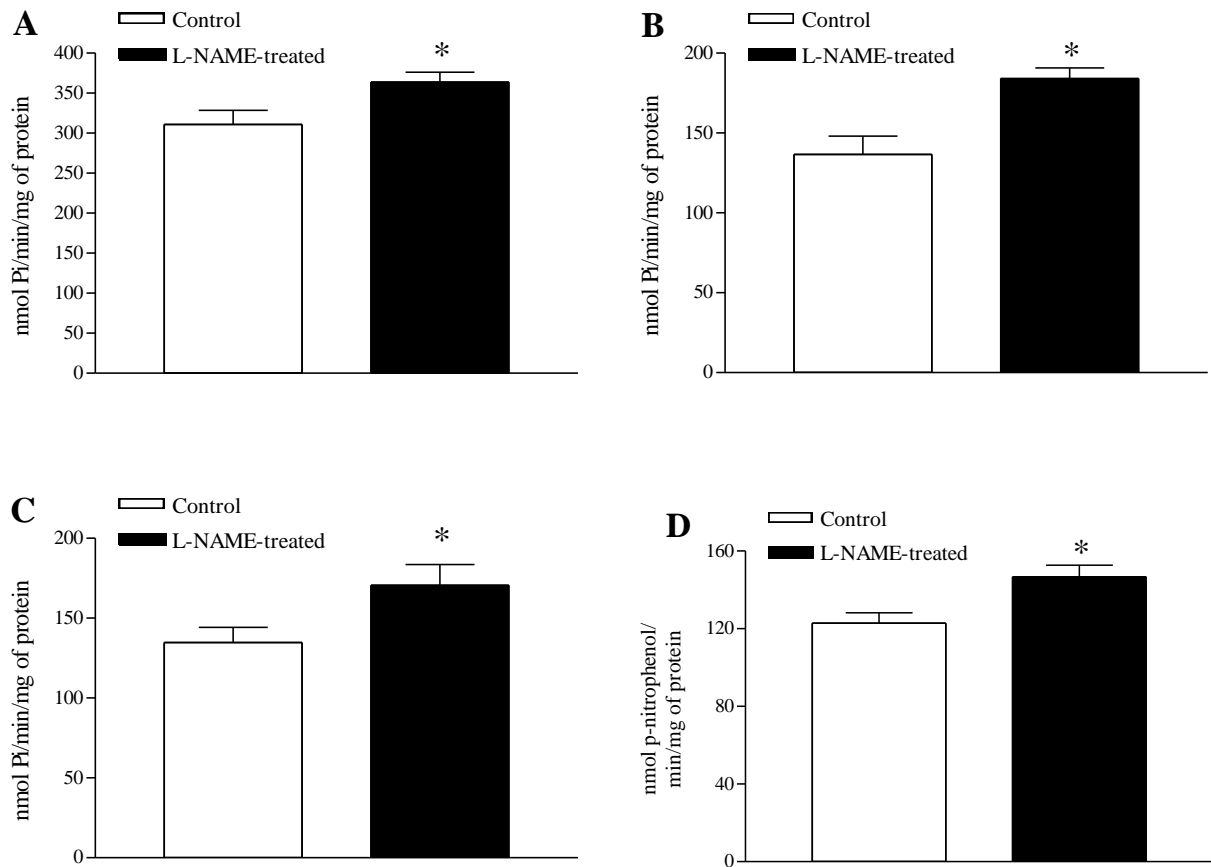


Figure 2

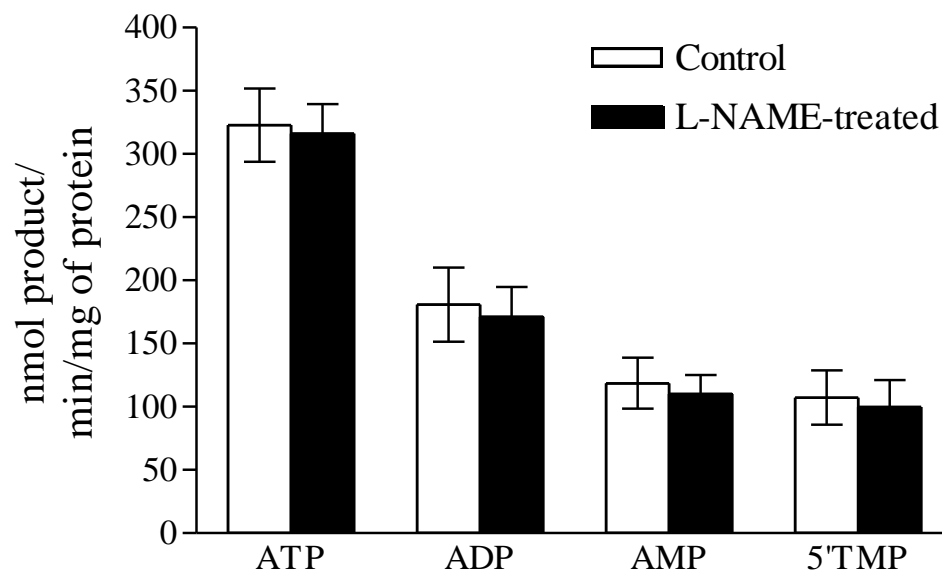
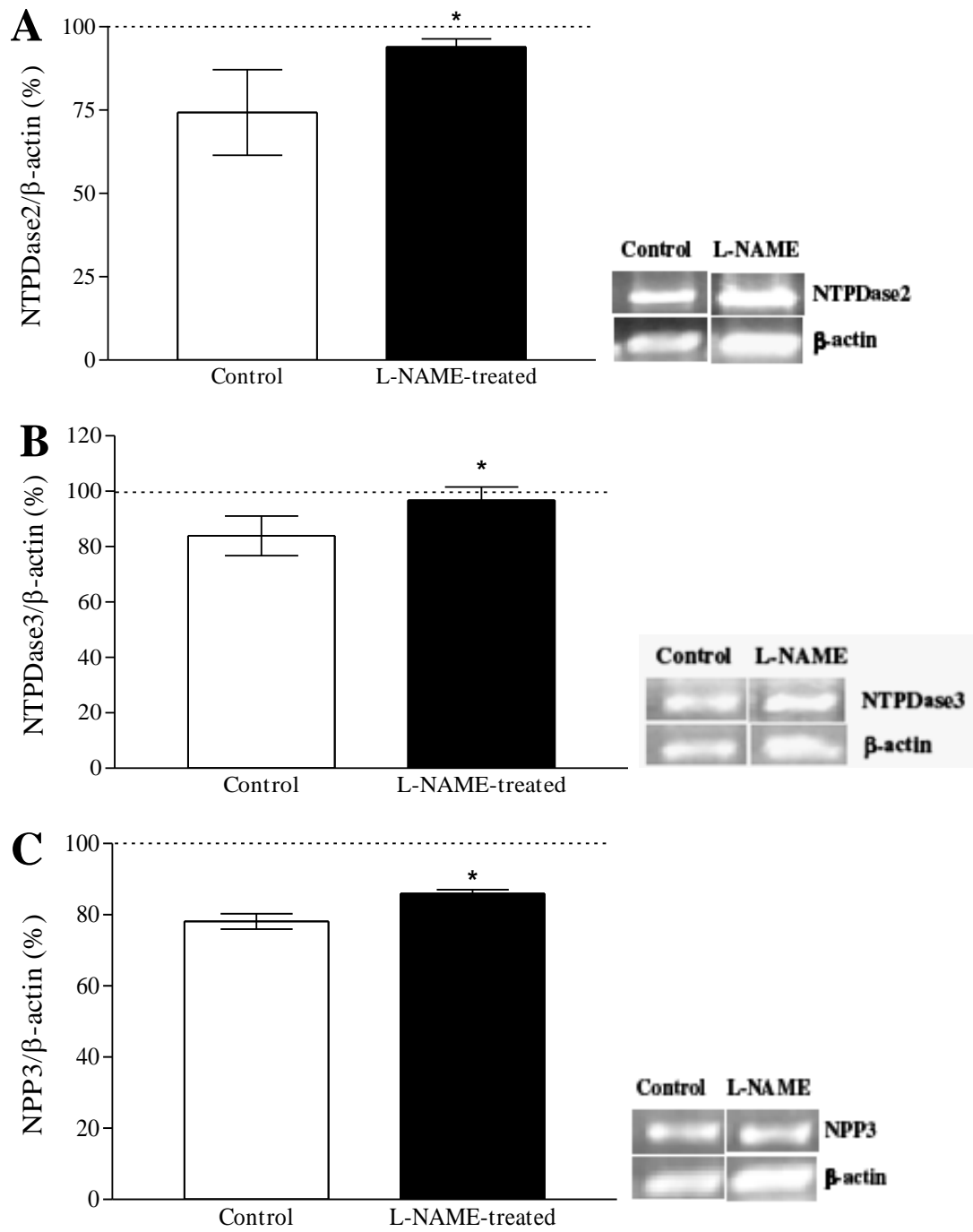


Figure 3



CAPÍTULO III

Perfil de hidrólise de nucleotídeos em soro e sinaptossoma cardíaco de ratos fêmeas submetidos à hipertensão arterial por L-NAME

Cristina Ribas Fürstenau, Bárbara Rücker, Denise Barbosa Ramos, Agnes Gossenheimer,
Maria Luiza Morais Barreto-Chaves e Susana Tchernin Wofchuk

Resultados Preliminares

**Perfil de hidrólise de nucleotídeos em soro e sinaptossoma cardíaco de ratos fêmeas
submetidos à hipertensão arterial por L-NAME**

Cristina Ribas Fürstenau¹, Bárbara Rücker¹, Denise Barbosa Ramos¹, Agnes Gossenheimer¹,
Maria Luiza Morais Barreto-Chaves² e Susana Tchernin Wofchuk¹

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional, Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

1. Introdução:

A sinalização purinérgica tem um importante papel na vasculatura, podendo influenciar as respostas vasomotoras, a agregação plaquetária, os processos inflamatórios e a função cardíaca (Erlinge & Burnstock, 2008). De maneira geral, a ativação dos receptores purinérgicos (P2) endoteliais induz uma vasodilatação local. Em artérias de resistência, o ATP pode ligar-se aos receptores P2X₁ e P2X₄ promovendo a vasodilatação (Harrington et al., 2007, Yamamoto et al., 2006); e, na maioria dos vasos, o ADP, o ATP e o UTP podem ativar os receptores P2Y₁ e P2Y₂ causando vasorelaxamento (Burnstock, 2006b). Por outro lado, a ativação dos receptores P2 em células musculares lisas vasculares promove uma vasoconstrição através dos receptores P2X (Gitterman & Evans, 2001, Malmjö et al., 2000) ou dos receptores P2Y sensíveis às pirimidinas (von Kugelgen et al., 1987). Além das ações sobre a vasculatura, o ATP apresenta efeitos cronotrópicos, dromotrópicos e inotrópicos em preparações de coração isolado (Rongen et al., 1997). O ATP, geralmente, é responsável por efeitos inotrópicos positivos e sua rápida aplicação em células induz várias formas de arritmia. Outros possíveis papéis para o ATP no coração incluem a hipertrofia, o condicionamento e a apoptose (Vassort, 2001).

Como consequência dos efeitos vasculares, a modulação da razão nucleotídeos/nucleosídeos na circulação tem um importante impacto na regulação da pressão arterial. Esta razão é finamente regulada pelas ectonucleotidases, um sub-conjunto de enzimas ligadas à membrana plasmática que são capazes de hidrolisar os nucleotídeos extracelulares (Plesner, 1995). Membros das famílias ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases (E-NPPs) e ecto-5'-nucleotidases são capazes de metabolizar os nucleotídeos extracelulares e sua presença já foi descrita e caracterizada tanto em soro sanguíneo (Oses et al., 2004, Sakura et al., 1998) quanto em sinaptossoma cardíaco (Rucker et al., 2007, Rucker et al., 2008).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a incidência e a severidade da hipertensão arterial, um dos principais riscos para as doenças cardiovasculares, são menores em mulheres do que em homens (Schenck-Gustafsson, 1996). Uma vez que estas diferenças não são observadas após a menopausa, os hormônios sexuais femininos têm sido postulados como agentes cardioprotetores em mulheres (Hinojosa-Laborde et al., 1999). Desta maneira, mulheres em idade reprodutiva (pré-menopausa) estão protegidas contra doenças cardiovasculares quando comparadas aos homens (Lerner & Kannel, 1986). Esta redução no risco diminui com o início da menopausa (Eaker et al., 1993) e a terapia de reposição de estrógeno parece diminuir significativamente o risco de doença cardiovascular em mulheres pós-menopausa (Stampfer et al., 1991).

As diferenças sexuais na regulação da pressão arterial também têm sido documentadas em diversos modelos animais (Chen, 1996, Reckelhoff, 2001), incluindo os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e os ratos Dahl sensíveis ao sal, cujos machos apresentam pressão arterial mais elevada do que as fêmeas da mesma idade (Ganten et al., 1989, Kahonen et al., 1998, McIntyre et al., 1997, Reckelhoff et al., 1998). Sabe-se que o estrógeno pode exercer efeitos rápidos sobre as células da vasculatura, ativando a óxido nítrico sintase (NOS) de uma maneira não genômica (Chen et al., 1999). Além disso, este hormônio pode atuar a longo-prazo devido, pelo menos em parte, a aumentos na expressão gênica da NOS (Weiner et al., 1994). Portanto, estes estudos parecem indicar que o estrógeno protege contra a hipertensão via óxido nítrico (Sainz et al., 2004).

A inibição crônica da síntese de óxido nítrico pela administração oral de análogos da L-arginina, como o N ω -Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), produz uma elevação volume-dependente da pressão arterial (Lerman et al., 2005). Considerando a participação da sinalização pelos nucleotídeos na regulação do tônus vascular e nas funções cardíacas, o

dimorfismo sexual na modulação das atividades ectonucleotidases (Fontella et al., 2005, Rucker et al., 2004) e no desenvolvimento da hipertensão arterial (Chen, 1996), o objetivo deste estudo consiste em avaliar o efeito da hipertensão induzida por L-NAME sobre as atividades de hidrólise de nucleotídeos em soro e em sinaptossoma cardíaco de ratos fêmeas.

2. Materiais e Métodos:

Reagentes

N^ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), *p*-Nitrofenil timidina 5'-monofosfato (5'-TMP), nucleotídeos, oligomicina, azida de sódio, HEPES, EGTA e Trizma Base foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Colagenase tipo II foi comprada da Worthington Biochemical Co. (Lakewood, NJ, USA). A solução de Ringer foi comprada da Basa (Caxias do Sul, RS, Brasil). O kit para dosagem de creatinina foi obtido da Biotécnica Indústria e Comércio Ltda. (Varginha, MG, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados apresentavam alto grau de pureza.

Animais

Ratos *Wistar* fêmeas com 60 a 90 dias de idade foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos em ciclo 12 horas claro/ 12 horas escuro (luzes acesas às 7:00 h) em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). A menos que mencionado de outra maneira, os ratos receberam água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos foram realizados de acordo com as instruções do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), baseado no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council) e todos os

esforços foram feitos no sentido de minimizar o número de animais utilizados bem como seu sofrimento.

Protocolos Experimentais

Os animais foram divididos em três grupos: 1) controle, 2) L-NAME 30 mg/Kg/dia e 3) L-NAME 50 mg/Kg/dia. A hipertensão foi induzida pela administração do inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) nas doses de 30 ou 50 mg/Kg de peso corporal/dia na água de beber por 14 dias conforme previamente descrito (Balbinott et al., 2005). O grupo controle recebeu água da torneira regular durante todo o curso do experimento. Os animais foram eutanizados no 15º dia após o início do tratamento.

Determinação da Pressão Arterial Sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada em animais conscientes três vezes durante o tratamento, aproximadamente no mesmo horário do dia, através de pletismografia caudal (Kent Scientific; *RTBP1001 Rat Tail Blood Pressure System for rats and mice*, Litchfield, USA). Os ratos foram habituados ao aparelho antes de serem tomadas as medidas de pressão arterial. A PAS foi aferida no dia 0 (antes do início do tratamento), no dia 7 (7 dias após o início do tratamento com L-NAME) e no dia 14 (último dia de tratamento com L-NAME).

Índices Cardíacos

Os índices de peso cardíaco foram determinados conforme descrito previamente (Zanfolin et al., 2006), exceto pelo fato de que os corações foram analisados logo após sua remoção (sem fixação). O peso ventricular total foi obtido após a remoção dos átrios e o peso

do ventrículo esquerdo foi determinado após a excisão do ventrículo direito. O índice de peso ventricular (VWI) e o índice de peso do ventrículo esquerdo (LVWI) foram obtidos obtidos pela razão do peso dos ventrículos (VW, em miligramas) ou do peso do ventrículo esquerdo (LVW, em miligramas) pelo peso corporal do animal (BW, em gramas).

Isolamento do soro sanguíneo

O soro sanguíneo utilizado para os ensaios enzimáticos foi obtido conforme descrito por Yegutkin (Yegutkin, 1997), com pequenas modificações. Os animais foram mortos por decapitação e o sangue coletado foi deixado à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para coagulação. Em seguida, o sangue foi centrifugado em tubos de vidro a $5000 \times g$ por 5 minutos à temperatura ambiente. O soro resultante foi mantido em gelo e imediatamente utilizado para os ensaios enzimáticos.

Preparação da fração sinaptossomal cardíaca

A fração sinaptossomal foi preparada conforme descrito previamente (Aloyo et al., 1991). Os animais foram eutanizados por decapitação e os corações imediatamente removidos e perfundidos com uma solução de Ringer-lactato por 10 minutos para garantir a remoção de todo o sangue da circulação coronariana. Em seguida, o ventrículo esquerdo foi separado e cortado em pequenos pedaços em uma solução de sacarose 0.32 M contendo 1 mM de EGTA, pH 7.5. O tecido foi transferido para uma solução de Krebs-Ringer Hepes (KRH) (em mM: 50 de HEPES, 144 de NaCl, 1.2 de $MgCl_2$, 1.2 de $CaCl_2$, 5 de KCl, 10 de glicose, 1 de ácido ascórbico, pH 7.4) contendo 12 U de colagenase tipo II por miligrama de tecido. Esta suspensão foi então incubada a $37^\circ C$ por 40 minutos e continuamente aerada com oxigênio. Após uma centrifugação de baixa velocidade (10 minutos, $120 \times g$, $4^\circ C$), o precipitado resultante foi suspenso em 10 volumes de sacarose 0.32 M e homogeneizado com um homogeneizador Teflon/vidro. Os debris celulares, os núcleos e os restos de tecidos foram

removidos por uma centrifugação de 10 minutos a $650 \times g$, 4°C . O sobrenadante resultante foi centrifugado por 20 minutos a $21000 \times g$ a 4°C e o precipitado foi resuspenso em KRH gelado e oxigenado. Duas novas centrifugações (20 minutos, $21000 \times g$, 4°C) foram executadas e o precipitado final contendo os sinaptossomas cardíacos foi resuspenso em KHR a fim de atingir um concentração proteica final entre 0.5-0.7 mg/mL.

Determinação da Proteína

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

Ensaio enzimáticos para as E-NTPDases e para a Ecto-5'-nucleotidase

Para a análise das atividades E-NTPDases e ecto-5'-nucleotidase em soro, a mistura de reação utilizada continha 112.5 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.0. A quantidade de proteína adicionada foi de 1 mg por tubo e as reações foram iniciadas pela adição dos nucleotídeos (ATP, ADP ou AMP) na concentração final de 3 mM. Os ensaios enzimáticos foram terminados após 40 minutos de incubação. Nos sinaptossomas cardíacos, a hidrólise de ATP e ADP foram medidas em um meio de reação contendo 2 mM de CaCl_2 , 5 mM de KCl, 10 mM de glicose, 225 mM de sacarose, 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.0, e 6 μg de proteína. Para a hidrólise de ATP, foram adicionadas ao meio 2 $\mu\text{g/mL}$ de oligomicina e 0.1 mM de azida de sódio. A oligomicina foi adicionada a partir de uma solução concentrada de etanol (1% final no meio de incubação do ATP), a qual não foi capaz de interferir na atividade enzimática. A mistura de reação para acessar a hidrólise de AMP continha 2 mM de MgCl_2 , 150 mM de sacarose e 50 mM de glicina, pH 9.5, e 10 μg de proteína. As frações sinaptossomais foram incubadas por 6 minutos (ATP e ADP) ou 10 minutos (AMP) a 37°C . As reações enzimáticas foram iniciadas pela adição dos nucleotídeos em uma concentração

final de 1 mM. Todas as reações enzimáticas foram realizadas em um volume final de 200 µL e terminadas pela adição de 5% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA). O fosfato inorgânico liberado foi determinado colorimetricamente (Chan et al., 1986). Os tempos de incubação e as concentrações de proteína utilizados foram determinados a fim de assegurar a linearidade das reações enzimáticas. A hidrólise não enzimática dos substratos foi corrigida com a realização de controles nos quais a fração proteica foi adicionada após a reação ter sido parada com TCA. As atividades enzimáticas estão expressas como nmol Pi liberado por minuto por miligrama de proteína.

Ensaio enzimático para as E-NPPs

A atividade fosfodiesterase foi acessada a partir da utilização de um substrato artificial (*p*-Nph-5'TMP ou 5'TMP) como reportado previamente (Sakura et al., 1998). Para o ensaio da atividade E-NPP em soro sanguíneo, o meio de reação continha 100 mM de Tris-HCl, pH 8.9 e amostra contendo 1 mg de proteína por tubo. A reação foi iniciada pela adição de 0.5 mM de 5'TMP (concentração final), o qual foi incubado por 8 minutos a 37°C. A mistura de reação para medir a atividade E-NPP em sinaptossomas cardíacos continha 50 mM de tampão Tris-HCl, 5 mM de KCl, 10 mM de glicose, 225 mM de sacarose, pH 8.9, e aproximadamente 10 µg de proteína por tubo. A reação foi iniciada pela adição de 0.5 mM de 5'TMP, o qual foi incubado por 30 minutos a 37°C. O volume final das reações foi de 200 µL. As reações foram terminadas pela adição de 0.1 N de NaOH (v/v) (concentração final). A quantidade de *p*-nitrofenol liberado do substrato foi medida a 400 nm utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 18.8×10^{-3} M/cm. Controles para corrigir a hidrólise não enzimática do substrato foram realizados pela adição das frações proteicas após o término das reações com NaOH. As atividades enzimáticas estão expressas como nmol *p*-nitrofenol liberado por minuto por miligrama de proteína.

Medida dos Níveis de Creatinina

Os níveis de creatinina no soro dos animais controle, L-NAME 30 mg/Kg/dia e L-NAME 50 mg/Kg/dia foram avaliados utilizando-se um kit colorimétrico, conforme as instruções do fabricante.

Análise dos Dados

Os resultados estão expressos como médias \pm desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pelo test *t* de Student para amostras independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um $p \leq 0.05$.

3. Resultados Preliminares e Discussão:

Como descrito anteriormente, a incidência e severidade da hipertensão arterial parecem ser menores em mulheres quando comparadas aos homens em idade semelhante (Schenck-Gustafsson, 1996). Neste estudo, observamos que o tratamento com L-NAME na dose de 30 mg/Kg/dia por 14 dias não foi capaz de induzir o aumento da pressão arterial em todas as fêmeas como havia ocorrido com machos em um trabalho previamente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (Furstenau et al., 2008). Portanto, decidimos aumentar a dose de tratamento para 50 mg/Kg/dia por 14 dias, na qual todos os animais encontravam-se hipertensos ao final das duas semanas de administração do L-NAME. É imprescindível ressaltar que todos os dados considerados neste estudo relativos à dose de 30 mg/kg/dia são oriundos dos animais que tornaram-se hipertensos, sendo que os não hipertensos foram descartados. A figura 1 mostra que ambas as doses de L-NAME administradas causaram um aumento de cerca de 30% na PAS ao final dos 14 dias de tratamento quando comparadas ao

grupo controle. Em machos da mesma idade, demonstramos um aumento em torno de 40% com a dose de L-NAME 30 mg/Kg/dia administrada por 14 dias (Furstenau et al., 2008).

Um acréscimo no valor do índice de peso do ventrículo esquerdo representa uma alteração cardíaca que está intimamente relacionada à hipertensão (Kawagushi et al., 1997), uma vez que a hipertrofia do ventrículo compensa o aumento na carga de trabalho, podendo levar à falência cardíaca em estágios avançados (Shapiro & Sugden, 1996). A tabela 1 mostra que em ratos fêmeas nenhum dos parâmetros avaliados (peso corporal, índice de peso ventricular e índice de peso do ventrículo esquerdo) foram alterados em resposta ao tratamento com L-NAME nas doses administradas. Contrariamente, em machos submetidos ao tratamento com L-NAME 30 mg/Kg/dia por 14 dias, encontramos um aumento significativo no índice de peso do ventrículo esquerdo, o qual estava associado a alterações na massa muscular cardíaca e não ao conteúdo de água no miocárdio (Furstenau et al., 2008).

O tratamento com L-NAME nas doses de 30 e 50 mg/Kg/dia por 14 dias não foi capaz de alterar as hidrólises dos nucleotídeos (ATP, ADP e AMP), tampouco a hidrólise do substrato marcador para a atividade E-NPP (5'TMP), em soro sanguíneo (Figura 2) e em sinaptossoma cardíaco (Figura 3A-D) de ratos fêmeas. Em ratos machos, o tratamento com L-NAME 30 mg/Kg/dia por 14 dias diminuiu as hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro sanguíneo e em plaquetas, o que poderia contribuir para um aumento na agregação plaquetária observado em casos de hipertensão (Pravenec et al., 1992).

A hipertensão arterial é o principal fator de risco para a perda da função renal. A administração de altas doses bem como tempos prolongados de tratamento com L-NAME causam hipertensão arterial (Furstenau et al., 2008, Lerman et al., 2005) e complicações renais (Zanfolin et al., 2006). Neste estudo, verificamos que os níveis de creatinina sérica, um

indicador do funcionamento dos rins, permaneceram dentro dos valores normais estabelecidos para este parâmetro em ambas as doses de L-NAME administradas (Figura 4).

De maneira geral, os resultados obtidos com ratos fêmeas neste estudo até o presente momento mostram que, apesar da elevação significativa nos níveis de pressão arterial sistólica, a sinalização purinérgica em soro sanguíneo e em sinaptossoma cardíaco parece não ser alterada. Desta maneira, estes resultados preliminares parecem corroborar as evidências de que as fêmeas em idade reprodutiva estão protegidas contra a severidade da hipertensão quando comparadas aos machos de idade equivalente, pelo menos no que tange aos aspectos relacionados à sinalização purinérgica. É importante enfatizar que a sinalização por nucleotídeos pode ter uma importância similar a dos sistemas simpático e renina-angiotensina-aldosterona na regulação e patofisiologia cardiovascular (Erlinge & Burnstock, 2008). Portanto, o sistema purinérgico parece estar também mais protegido contra os distúrbios causados pela HAS em fêmeas do que em machos.

Este estudo tem como perspectivas a análise da hidrólise dos nucleotídeos em membranas renais e em plaquetas de ratos fêmeas com as duas doses de tratamento com L-NAME e em comparação com ratos machos. Neste estudo, acompanhamos a fase do ciclo estral em que se encontravam as fêmeas utilizadas. Entretanto, o desenvolvimento da HAS não parece estar relacionado à fase do ciclo estral, embora os dados obtidos até o momento não sejam conclusivos e necessitem uma maior exploração. Além disso, pretendemos avaliar os mesmos parâmetros em fêmeas ovariectomizadas (submetidas à cirurgia para remoção dos ovários), no intuito de melhor estabelecer o papel do estrógeno em uma possível cardioproteção oferecida às fêmeas hipertensas também no aspecto relativo ao sistema purinérgico.

Figura 1

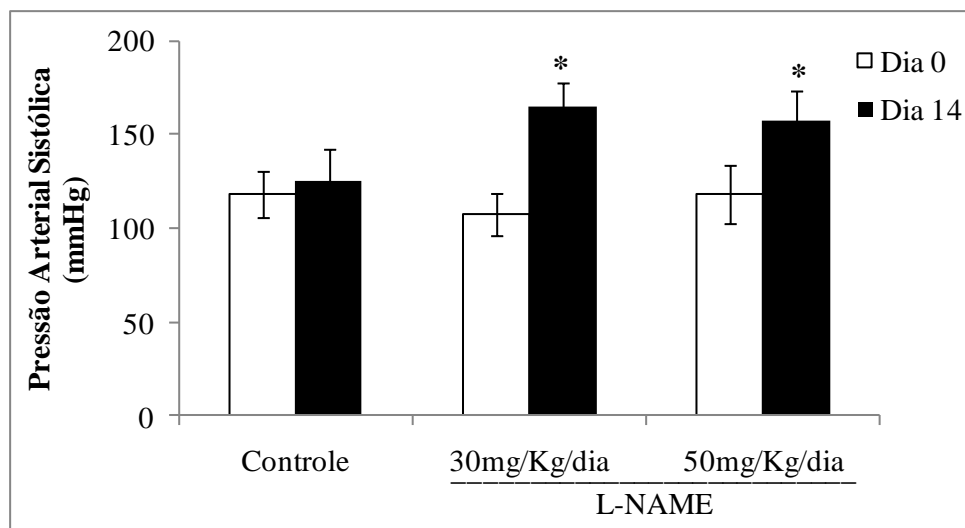


Figura1: Medidas de pressão arterial sistólica (PAS, em mmHg). Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 a 9 fêmeas por grupo. *Representa uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle para o mesmo tempo de tratamento, considerando um $p \leq 0.05$.

Figura 2

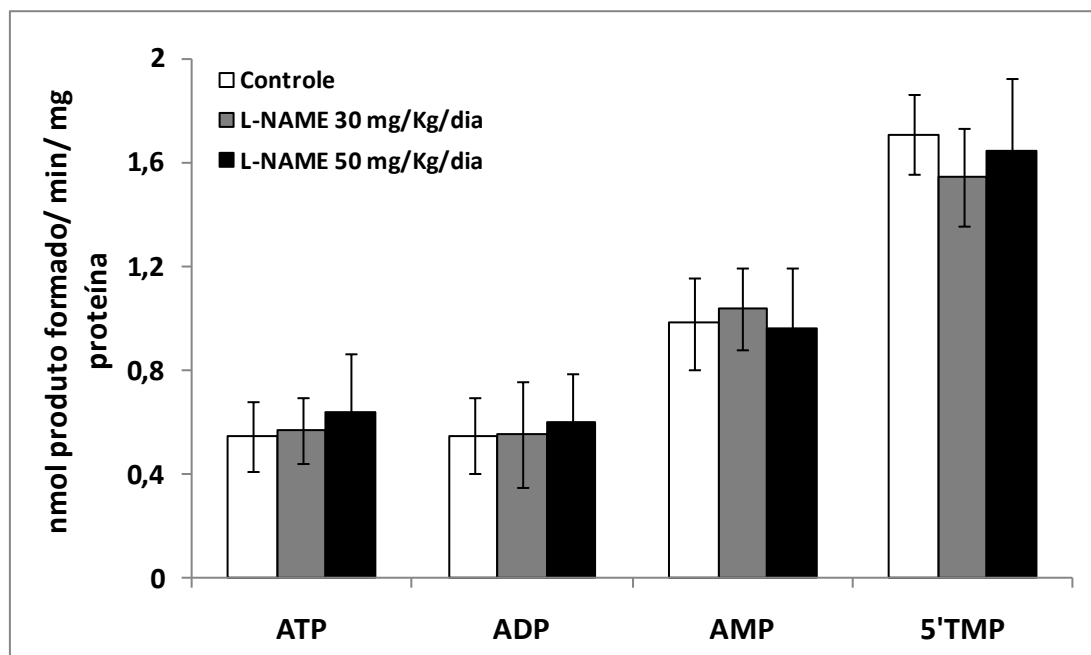


Figura 2: Efeito do tratamento com L-NAME por 14 dias sobre a hidrólise de nucleotídeos em soro sanguíneo de ratos fêmeas. Os resultados estão apresentados com média \pm desvio padrão de pelo menos 6 experimentos independentes para cada substrato em cada grupo avaliado.

Figura 3

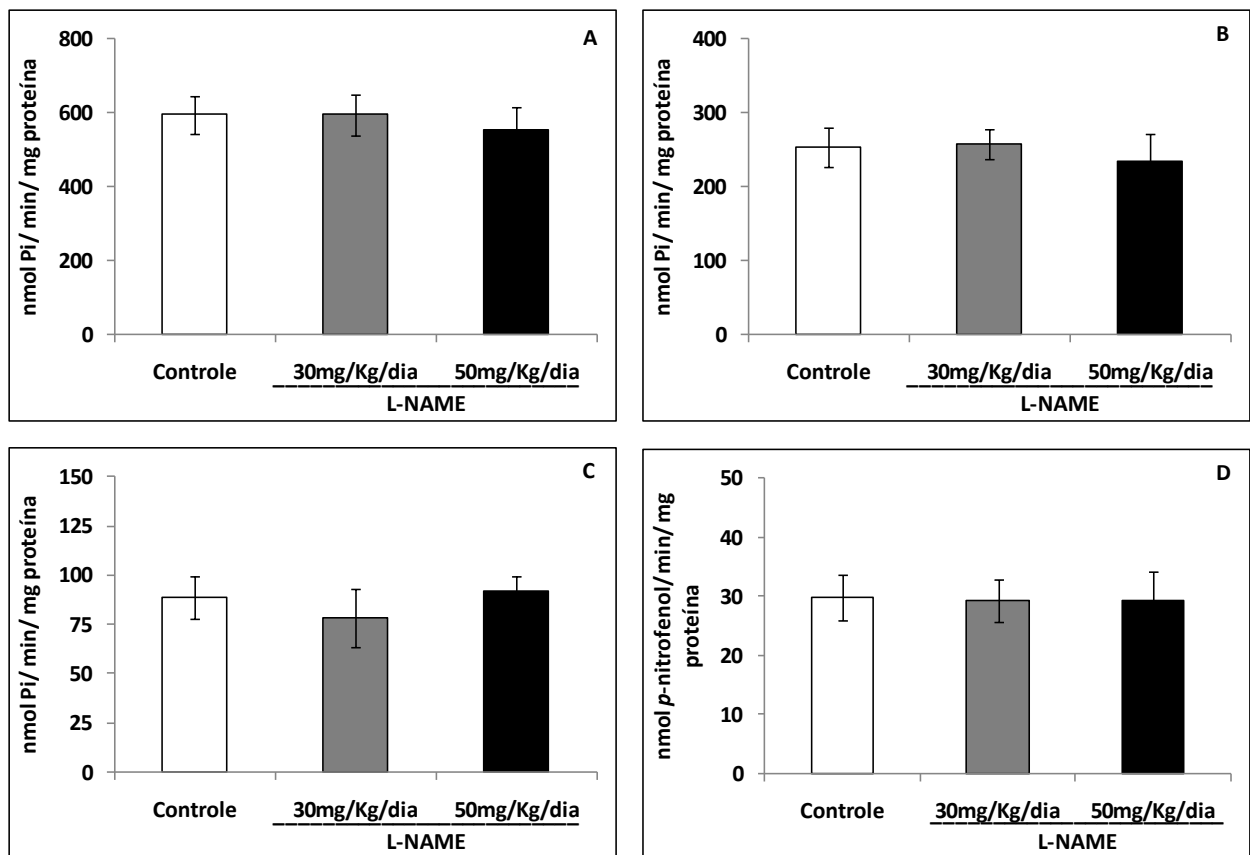


Figura 3: Efeito do tratamento com L-NAME por 14 dias sobre as hidrólises de ATP (A), ADP (B), AMP (C) e 5'TMP (D) em sinaptossoma cardíaco de ratos fêmeas. Os resultados estão apresentados com média \pm desvio padrão de pelo menos 6 experimentos independentes para cada substrato em cada grupo avaliado.

Figura 4

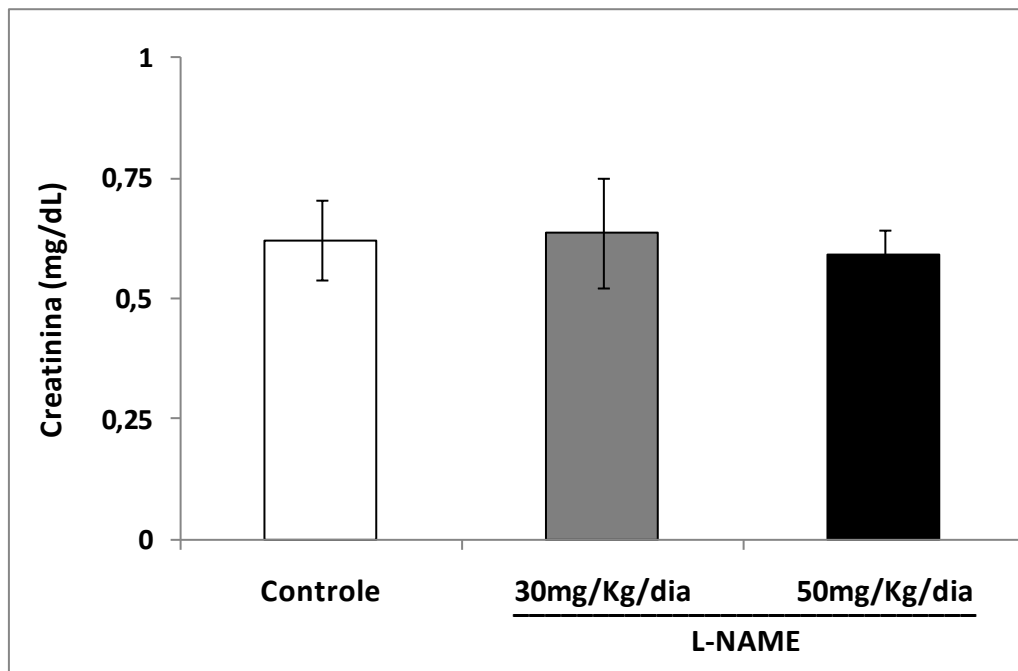


Figura 4: Determinação dos níveis de creatinina sérica. Os resultados representam média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes para cada grupo avaliado.

Tabela 1

	Controle	L-NAME (30 mg/Kg/dia)	L-NAME (50 mg/Kg/dia)
Peso Corporal (g)	180.5 ± 19.95	181.46 ± 16.05	163.17 ± 20.68
VWI (mg/g)	319.36 ± 65.84	340.79 ± 76.72	308.03 ± 49.34
LVWI (mg/g)	2.98 ± 0.45	2.98 ± 0.40	3.06 ± 0.25

(VWI: ventricle weight index; LVWI: left ventricle weight index)

Tabela 1: Peso corporal e índices cardíacos. Os índices cardíacos foram determinados conforme descrito na seção Materiais e Métodos. Os resultados representam média ± desvio padrão de 6 a 9 animais por grupo.

4. Referências Bibliográficas:

- [1] Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 2008;4 (1):1-20.
- [2] Harrington LS, Evans RJ, Wray J, Norling L, Swales KE, Vial C, Ali F, Carrier MJ, Mitchell JA. Purinergic 2X1 receptors mediate endothelial dependent vasodilation to ATP. *Mol Pharmacol* 2007;72 (5):1132-6.
- [3] Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Kobayashi M, Kawamura K, Masuda H, Kamiya A, Ando J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 2006;12 (1):133-7.
- [4] Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 2006;58 (1):58-86.
- [5] Gitterman DP, Evans RJ. Nerve evoked P2X receptor contractions of rat mesenteric arteries; dependence on vessel size and lack of role of L-type calcium channels and calcium induced calcium release. *Br J Pharmacol* 2001;132 (6):1201-8.
- [6] Malmström M, Adner M, Harden TK, Pendergast W, Edvinsson L, Erlinge D. The stable pyrimidines UDPbetaS and UTPgammaS discriminate between the P2 receptors that mediate vascular contraction and relaxation of the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 2000;131 (1):51-6.
- [7] von Kugelgen I, Haussinger D, Starke K. Evidence for a vasoconstriction-mediating receptor for UTP, distinct from the P2 purinoceptor, in rabbit ear artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987;336 (5):556-60.
- [8] Rongen GA, Floras JS, Lenders JW, Thien T, Smits P. Cardiovascular pharmacology of purines. *Clin Sci (Lond)* 1997;92 (1):13-24.
- [9] Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium. *Physiol Rev* 2001;81 (2):767-806.
- [10] Plesner L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 1995;158:141-214.
- [11] Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rucker B, Furstenuau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci* 2004;74 (26):3275-84.
- [12] Sakura H, Nagashima S, Nakashima 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 (2):83-9.
- [13] Rucker B, Almeida ME, Libermann TA, Zerbini LF, Wink MR, Sarkis JJ. Biochemical characterization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP, E.C. 3.1.4.1) from rat heart left ventricle. *Mol Cell Biochem* 2007;306 (1-2):247-54.

- [14] Rucker B, Almeida ME, Libermann TA, Zerbini LF, Wink MR, Sarkis JJ. E-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings. *Life Sci* 2008;82 (9-10):477-86.
- [15] Schenck-Gustafsson K. Risk factors for cardiovascular disease in women: assessment and management. *Eur Heart J* 1996;17 Suppl D:2-8.
- [16] Hinojosa-Laborde C, Chapa I, Lange D, Haywood JR. Gender differences in sympathetic nervous system regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26 (2):122-6.
- [17] Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986;111 (2):383-90.
- [18] Eaker ED, Chesebro JH, Sacks FM, Wenger NK, Whisnant JP, Winston M. Cardiovascular disease in women. *Circulation* 1993;88 (4 Pt 1):1999-2009.
- [19] Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med* 1991;325 (11):756-62.
- [20] Chen YF. Sexual dimorphism of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996;5 (2):181-5.
- [21] Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001;37 (5):1199-208.
- [22] Ganten U, Schroder G, Witt M, Zimmermann F, Ganten D, Stock G. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens* 1989;7 (9):721-6.
- [23] Kahonen M, Tolvanen JP, Sallinen K, Wu X, Porsti I. Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *Am J Physiol* 1998;275 (1 Pt 2):H15-22.
- [24] McIntyre M, Hamilton CA, Rees DD, Reid JL, Dominiczak AF. Sex differences in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. *Hypertension* 1997;30 (6):1517-24.
- [25] Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31 (1 Pt 2):435-9.
- [26] Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999;103 (3):401-6.
- [27] Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91 (11):5212-6.

- [28] Sainz J, Osuna A, Wangenstein R, de Dios Luna J, Rodriguez-Gomez I, Duarte J, Moreno JM, Vargas F. Role of sex, gonadectomy and sex hormones in the development of nitric oxide inhibition-induced hypertension. *Exp Physiol* 2004;89 (2):155-62.
- [29] Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* 2005;146 (3):160-73.
- [30] Fontella FU, Bruno AN, Balk RS, Rucker B, Crema LM, Correa MD, Battastini AM, Sarkis JJ, Alexandre Netto C, Dalmaz C. Repeated stress effects on nociception and on ectonucleotidase activities in spinal cord synaptosomes of female rats. *Physiol Behav* 2005;85 (2):213-9.
- [31] Rucker B, Pereira GS, Furstenau CR, Izquierdo I, Bonan CD, Sarkis JJ. Inhibitory avoidance task reveals differences in ectonucleotidase activities between male and female rats. *Neurochem Res* 2004;29 (12):2231-7.
- [32] Balbinott AW, Irigoyen MC, Brasileiro-Santos Mdo S, Zottis B, de Lima NG, Passaglia J, Schaan BD. Dose-dependent autonomic dysfunction in chronic L-NAME-hypertensive diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;46 (5):563-9.
- [33] Zanfolin M, Faro R, Araujo EG, Guaraldo AM, Antunes E, De Nucci G. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47 (3):391-5.
- [34] Yegutkin GG. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochemistry (Mosc)* 1997;62 (6):619-22.
- [35] Aloyo VJ, McIlvain HB, Bhavsar VH, Roberts J. Characterization of norepinephrine accumulation by a crude synaptosomal-mitochondrial fraction isolated from rat heart. *Life Sci* 1991;48 (13):1317-24.
- [36] 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;72:248-54.
- [37] Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157 (2):375-80.
- [38] Furstenau CR, Trentin Dda S, Gossenheimer AN, Ramos DB, Casali EA, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41 (2):223-9.
- [39] Kawagushi H, Sano H, Kitabatake A. Increased mRNA expression of renin-angiotensin system in hyperthrophied rat heart. In: Sharma, editor. *Adaptation Biology and Medicine*. New Delhi: Narosa Publishing House, 1997.
- [40] Shapiro L, Sugden P. Left ventricular hypertrophy. In: Julian D, Camm A, Fox K, editors. *Diseases of the heart*. London: Saunders, 1996.

- [41] Pravenec M, Kunes J, Zicha J, Kren V, Klir P. Platelet aggregation in spontaneous hypertension: genetic determination and correlation analysis. *J Hypertens* 1992;10 (12):1453-6.

CAPÍTULO IV

ANEXOS

Resultados obtidos durante o período do Doutorado-Sanduíche (Setembro 2008 a Setembro 2009) junto ao *Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canadá.*

- I. **The ecto-nucleotidase NTPDase1 differentially regulates P2Y₁ and P2Y₂ receptor-dependent vasorelaxation.** Gilles Kauffenstein, Cristina Ribas Fürstenau, Pedro D'Orléans-Juste, Jean Sévigny. Artigo publicado no periódico *British Journal of Pharmacology* 159 (2010) 576-585.

- II. **The contribution of P2 receptors in the activated-platelets-dependent vasorelaxation.** Padronização de metodologia e resultados preliminares.

ANEXO I

**The ecto-nucleotidase NTPDase1 differentially regulates P2Y₁ and P2Y₂
receptor-dependent vasorelaxation.**

Gilles Kauffenstein, Cristina Ribas Fürstenau, Pedro D'Orléans-Juste, Jean Sévigny.

Artigo publicado no periódico *British Journal of Pharmacology* 159 (2010) 576–585.

RESEARCH PAPER

The ecto-nucleotidase NTPDase1 differentially regulates P2Y1 and P2Y2 receptor-dependent vasorelaxation

Gilles Kauffenstein¹, Cristina Ribas Fürstenau^{1,2}, Pedro D'Orléans-Juste³ and Jean Sévigny¹

¹Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada, ²Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, and ³Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

Background and purpose: Extracellular nucleotides produce vasodilatation through endothelial P2 receptor activation. As these autacoids are actively metabolized by the ecto-nucleotidase nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase1), we studied the effects of this cell surface enzyme on nucleotide-dependent vasodilatation.

Experimental approach: Vascular NTPDase expression and activity were evaluated by immunohistochemistry and histochemistry. The vascular effects of nucleotides were tested *in vivo* by monitoring mean arterial pressure, and *in vitro* comparing reactivity of aortic rings using wild-type and *Entpd1*^{-/-} (lacking NTPDase1) mice.

Key results: The absence of NTPDase1 in *Entpd1*^{-/-} mice led to a dramatic drop in endothelial nucleotidase activity. This deficit was associated with an exacerbated decrease in blood pressure after nucleotide injection. Following ATP injection, mean arterial pressure was decreased in *Entpd1*^{+/+} and *Entpd1*^{-/-} mice by 5.0 and 17%, respectively, and by 0.1 and 19% after UTP injection (10 nmole·kg⁻¹ both). *In vitro*, the concentration-response curves of relaxation to ADP and ATP were shifted to the left, revealing a facilitation of endothelial P2Y1 and P2Y2 receptor activation in *Entpd1*^{-/-} mice. EC₅₀ values in *Entpd1*^{+/+} versus *Entpd1*^{-/-} aortic rings were 14 µM versus 0.35 µM for ADP, and 29 µM versus 1 µM for ATP. In *Entpd1*^{-/-} aortas, P2Y1 receptors were more extensively desensitized than P2Y2 receptors. Relaxations to the non-hydrolysable analogues ADPβS (P2Y1) and ATPγS (P2Y2) were equivalent in both genotypes confirming the normal functionality of these P2Y receptors in mutant mice.

Conclusions and implications: NTPDase1 controls endothelial P2Y receptor-dependent relaxation, regulating both agonist level and P2 receptor reactivity.

British Journal of Pharmacology (2010) **159**, 576–585; doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00566.x; published online 8

January 2010

Keywords: nucleotides; vasodilatation; P2 receptors; P2Y1; P2Y2; NTPDase1; desensitization; mouse

Abbreviations: ADPβS, adenosine 5'-O-(2-thiodiphosphate); ARL67156, 6-N, N-diethyl-D-β,γ-dibromomethyleneATP trisodium salt; ATPγS, adenosine 5'-O-(3-thio) triphosphate; *Entpd1*^{-/-}, E-NTPDase1 knock-out mice; MRS2500, 2-iodo-N⁶-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine 3',5'-bisphosphate; NTPDase1, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1; *P2ry2*^{-/-}, P2Y2 receptor knock-out mice; PGF_{2α}, prostaglandin F_{2α}; U46619, 9, 11-dideoxy-9α, 11α-methanoepoxy PGF_{2α}; VSMC, vascular smooth muscle cell

Introduction

Extracellular nucleotides take part to a wide range of physiological and pathological processes in virtually every tissue

(Burnstock, 2006). In the circulation, red blood cells, endothelial cells, activated platelets and neutrophils release ATP and ADP in the lumen of the vessel in response to shear stress (Bodin *et al.*, 1991), hyperoxia (Ahmad *et al.*, 2004), hypoxia (Gordon, 1986) or agonist stimulation (Yang *et al.*, 1994; Ostrom *et al.*, 2000; Joseph *et al.*, 2003). Nucleotides and nucleosides (adenosine) regulate cell function following autocrine and paracrine activation of purinergic (P2) receptors (nomenclature follows Alexander *et al.*, 2008). To date, seven ligand-gated P2X (P2X1–7) (North, 2002) and eight G

Correspondence: Jean Sévigny, Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, 2705 Boulevard Laurier, local T1-49, Québec, QC, G1V 4G2, Canada. E-mail: Jean.Sevigny@crchul.ulaval.ca

Received 3 August 2009; revised 11 September 2009; accepted 13 September 2009

protein-coupled P2Y receptors (P2Y1, 2, 4, 6, 11–14) (Abbracchio *et al.*, 2006) have been cloned in human. P2X receptors are activated by ATP, while P2Y receptors differ from each other according to the nucleotide(s) they respond to (ATP, ADP, UTP, UDP or UDP-glucose).

Nucleotides participate in local and systemic control of blood flow (Burnstock, 2002). The activation of P2 receptors on vascular smooth muscle cells (VSMCs) promotes vasoconstriction via either P2X (Gitterman and Evans, 2001) or pyrimidine-sensitive P2Y receptors. These processes take part in the neurogenic response of resistance arteries (von Kugelgen *et al.*, 1987). In contrast, the activation of endothelial P2 receptors induces a local vasodilatation. This effect involves three major vasodilator factors depending on the species and the vascular territories considered: nitric oxide (NO), prostacyclin and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Erlinge and Burnstock, 2008). P2Y1 and P2Y2 receptors are thought to be responsible for ADP and UTP/ATP-induced vasodilator responses in most tissues (Boarder and Hourani, 1998). More recently, P2X1 and P2X4 receptors were proposed to contribute to ATP-induced vasodilatation in mouse resistance arteries (Yamamoto *et al.*, 2006; Harrington *et al.*, 2007).

Once released, the biological effect of extracellular nucleotides is tightly regulated by ecto-nucleotidases (Zimmermann, 2000). Among these enzymes, members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family are dominant (Robson *et al.*, 2006). Two NTPDases are expressed in the vasculature: NTPDase1 is expressed on endothelial cells and VSMCs, while NTPDase2 is expressed in the adventitia of blood vessels, probably at the surface of fibroblasts (Sévigny *et al.*, 2002). NTPDase1 regulates local concentration of nucleotides in the blood stream, and, as a consequence, affects the activation of P2 receptors expressed in blood cells and endothelial cells (Enjyoji *et al.*, 1999). NTPDase1 contributes to the anti-thrombotic property of endothelial cells by actively hydrolysing ADP, which promotes platelet aggregation (Marcus *et al.*, 1991; Cote *et al.*, 1992). The key role of this enzyme in the prevention of thrombosis was confirmed in knockout mice (*Entpd1*^{-/-}) (Enjyoji *et al.*, 1999; Pinsky *et al.*, 2002). Further work with *Entpd1*^{-/-} mice highlighted a role of NTPDase1 in regulating other endothelium-related functions, such as angiogenesis (Goepfert *et al.*, 2001) and vascular permeability (Guckelberger *et al.*, 2004).

We recently observed that the absence of NTPDase1 was associated with an enhanced vasoconstrictor effect of nucleotides through the activation of P2 receptors on VSMCs (Kauffenstein *et al.*, 2009). Considering the importance of NTPDase1 as the major ecto-nucleotidase in the vasculature, as well as the central role of nucleotides in vasomotor responses, in the present study, we explored the role of NTPDase1 on endothelial P2 receptor-dependent relaxation. Our results show that NTPDase1 tightly regulated nucleotide-dependent vascular relaxation *in vivo* and *in vitro*. Moreover, our *in vitro* experiments revealed that NTPDase1 exerted a complex role, limiting endothelial P2 receptor activation, but also protecting P2Y1 receptors from homologous desensitization.

Methods

Animals

All animal care and experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the Institutional Ethical Committee for Experimental Animals. NTPDase1-deficient (*Entpd1*^{-/-}) mice were provided by Dr SC Robson (BIDMC, HMS, Boston, MA, USA). *Entpd1*^{-/-} mice, originally from the background 129 SVJ × C57 BL/6, were backcrossed for seven generations onto a C57 BL/6 background. Male mice aged of 16–25 weeks were used in all experiments. A confirmatory experiment was also performed with *P2ry2*^{-/-} mice, backcrossed seven generations onto a C57 BL/6 background, provided by Dr. B. Robaye (ULB, Belgium).

Enzyme histochemistry and immunolocalization

Nucleotide hydrolysis *in situ* was evaluated as previously described (Braun *et al.*, 2000). Briefly, 6 µm cryosections of mouse aorta and liver were fixed in cold acetone mixed with 10% phosphate-buffered formalin and then preincubated for 45 min at room temperature in 0.25 mM sucrose, 2 mM CaCl₂ and 50 mM Tris-maleate, pH 7.4. Enzymatic assays were carried out at 37°C for 60 min in the same buffer, complemented with 2 mM Pb(NO₃)₂, 5 mM MnCl₂, 3% dextran T-250 and 200 µM nucleotides (ATP, ADP) as substrate. In control experiments, divalent cations were replaced by 10 mM EDTA. The lead orthophosphate precipitate (brown deposit) resulting from nucleotide hydrolysis was visualized by incubating the sections in an aqueous solution of 1% v/v (NH₄)₂S. Sections were counterstained with haematoxylin, mounted with 20% mowiol 4–88 in 50% glycerol, 0.2 M Tris HCl, pH 8.5. For immunohistochemistry, the endothelial cell marker anti-mouse CD31/PECAM (clone MEC13.3, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) and the guinea pig anti-mouse NTPDase1 anti-sera (mN1-2_c) were used (Martín-Satué *et al.*, 2009). Staining was performed with Vectastain ABC elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), with 3,30-diaminobenzidine as chromogen.

In vivo blood pressure measurement

The carotid artery of anaesthetized mice was cannulated with PE-10 polyethylene tubing (Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada) containing 50 U·mL⁻¹ heparin in saline. A second cannula, inserted in the contralateral jugular vein, was used for intravenous infusions of agonists. Changes in mean arterial pressure (ΔMAP) were detected through the carotid with a pressure transducer connected to a Blood Pressure Analyzer-200A (Micro-Med, Tustin, CA, USA).

Isometric contraction of aortic rings

Mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine hydrochloride (100 mg·kg⁻¹) and xylazine (20 mg·kg⁻¹). Thoracic aortas were carefully removed and washed in saline/heparin (20 U·mL⁻¹) at room temperature. Extra adventitial fat was removed with microscissors, and vessels were kept on ice until used in Krebs solution

[composition (in mM): 118 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, and 5.5 glucose]. Aortas were divided into 2 mm segments and mounted between two tungsten triangles in 5 mL organ baths containing Krebs solution (37°C, aerated with 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4). Aortic rings were gradually stretched during 1 h to reach a stable loading tension of 0.75 g. Overall, the procedure from death until the first measurement took approximately 2.5 h. Isometric changes in vascular tone were measured by force transducers (model 52–9545, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA), coupled to LKB chart recorders (model 2210 or REC 102, LKB, Rockville, MD, USA). After two equilibrating contractions with depolarizing KCl (50 mM), the relaxing effect of nucleotides was measured on U46619- (a thromboxane mimetic, 30 nM) precontracted aortic rings. In desensitization experiments, the stable nucleotides ADPβS and ATPγS were used to induce P2Y1 and P2Y2 receptor-dependent relaxation, respectively. ATPγS relaxation was performed in the presence of the P2Y1-receptor antagonist MRS2500 (1 μM) to avoid responses from P2Y1 receptors, due to contaminating ADP present in ATPγS. Desensitization of P2Y1 receptors was achieved by ADP (10 μM–10 mM), while desensitization of P2Y2 receptors was achieved by ATP (10 μM–10 mM) for 30 min followed by seven washes with 5 mL Krebs solution.

Statistical analyses

The data were compared by two-way ANOVA, followed by a Bonferroni post-hoc test for multi-group comparisons.

Materials

U46619 was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), ARL67156 and MRS2500 from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). Apyrase (grade VII), ADP, ATP, ADPβS, and ATPγS were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Results

Functional expression of NTPDase1 in endothelial cells

The contribution of NTPDase1 in the hydrolysis of nucleotides was evaluated *in situ* by a lead precipitation method (Braun *et al.*, 2000). *Entpd1*^{-/-} vessels exhibit an important deficit in ATPase and ADPase activity in the vascular wall. Figure 1 illustrates the nucleotidase activity of an aorta and a hepatic central vein. The ATPase activity localized in the adventitial layer of *Entpd1*^{-/-} aorta is due to NTPDase2, which is a nucleoside triphosphatase with low diphosphatase activity (Heine *et al.*, 1999; Sévigny *et al.*, 2002). The endothelial activity of NTPDase1 was more evident in veins, such as the hepatic central vein (Figure 1B), of wild-type animals because of the near absence of SMC. This activity was virtually absent in *Entpd1*^{-/-} vessels (Figure 1). The same observations were made in the *Entpd1*^{-/-} vasculature of other tissues analysed, namely heart, lungs, bowel, bladder and vas deferens (data not shown). In accordance with its activity, NTPDase1 immunoreactivity was localized in the vascular wall at the level of the intima and the media layers (Figure 1: *Entpd1*^{+/+}). It is noteworthy that prolonged exposure of *Entpd1*^{-/-} aortas to

ADP, but not ATP, led to a slight lead precipitation at the endothelial surface (data not shown), suggesting the presence of an ADPase activity. This activity may be attributable to NTPDase6 that has previously been shown to be expressed by endothelial cells in the heart (Yeung *et al.*, 2000).

Effect of intravenous injection of nucleotides

We questioned whether NTPDase1 could affect nucleotide-induced hypotensive responses *in vivo*. Thus, blood pressure was monitored on anaesthetized mice via a carotid catheter as described in the Methods section. Resting mean arterial pressure (MAP) was similar in *Entpd1*^{+/+} and *Entpd1*^{-/-} mice (mean ± SEM: 62.1 ± 1.9 vs. 64.2 ± 1.3 mmHg, respectively).

Most of the nucleotides (ATP, ADP, UTP and UDP) are vasodilators *in vitro* through activation of endothelial P2 receptors (Erlinge and Burnstock, 2008), and accordingly, their i.v. injection induces a transient drop in MAP (Shah and Kadowitz, 2002). To assess the contribution of NTPDase1 in the nucleotide-dependent vasorelaxation and the resulting drop in MAP, we compared the effect of i.v. injections of ATP and UTP in *Entpd1*^{+/+} and *Entpd1*^{-/-} mice (from 0.01 to 1000 nmole·kg⁻¹). The drop in MAP following ATP injection was greater in *Entpd1*^{-/-} mice (Figure 2A and B). UTP was as potent as ATP in decreasing blood pressure in *Entpd1*^{-/-} mice, but it did not have any effects in wild-type animals (Figure 2A and B). Because of its ability to promote platelet aggregation, the effect of ADP was not tested *in vivo*. These results show that NTPDase1 activity limits the vasoactive effect of circulating ATP and UTP.

P2Y receptor-induced relaxation in aortic rings

P2 receptors have already been characterized in mouse aortic rings: P2Y1 (ADP) and P2Y2 (ATP) receptors are responsible for adenine nucleotide-dependent vasorelaxation, and P2Y6 receptors mediates UDP and part of UTP-dependent relaxation (Guns *et al.*, 2005; 2006; Bar *et al.*, 2008). This relaxation depends on NO release, and is abolished in the presence of NO synthase inhibitors. To assess the role of NTPDase1 in P2Y1 and P2Y2-dependent relaxation, we evaluated ADP and ATP-induced relaxation of aortic rings from wild type and *Entpd1*^{-/-} mice, pre-contracted by U46619 to 80% of the maximal response (Figure 3). U46619 induced similar contraction level in both strain of mice (mean ± SEM of 30 nM U46619-induced tension: 0.33 ± 0.07 vs. 0.35 ± 0.08 g of tension for *Entpd1*^{+/+} and *Entpd1*^{-/-} aortic rings, respectively).

The relaxation induced by ATP was stable, and the shape of the dose response curves induced by cumulative or single concentrations of ATP was similar, suggesting that there was no or moderate desensitization of this response. In contrast, for ADP-induced relaxation, the concentration-response curve did not follow a sigmoid shape, suggesting that some desensitization occurred (data not shown). To avoid such desensitization, we constructed dose-response curves with a single concentration of each agonist per aortic ring. Both ADP and ATP-induced relaxation were potentiated in *Entpd1*^{-/-} aortic rings (Figure 3 and Table 1), suggesting that NTPDase1 activity limited activation of endothelial cell P2Y1 and P2Y2 receptors, respectively. In contrast, the non-hydrolysable

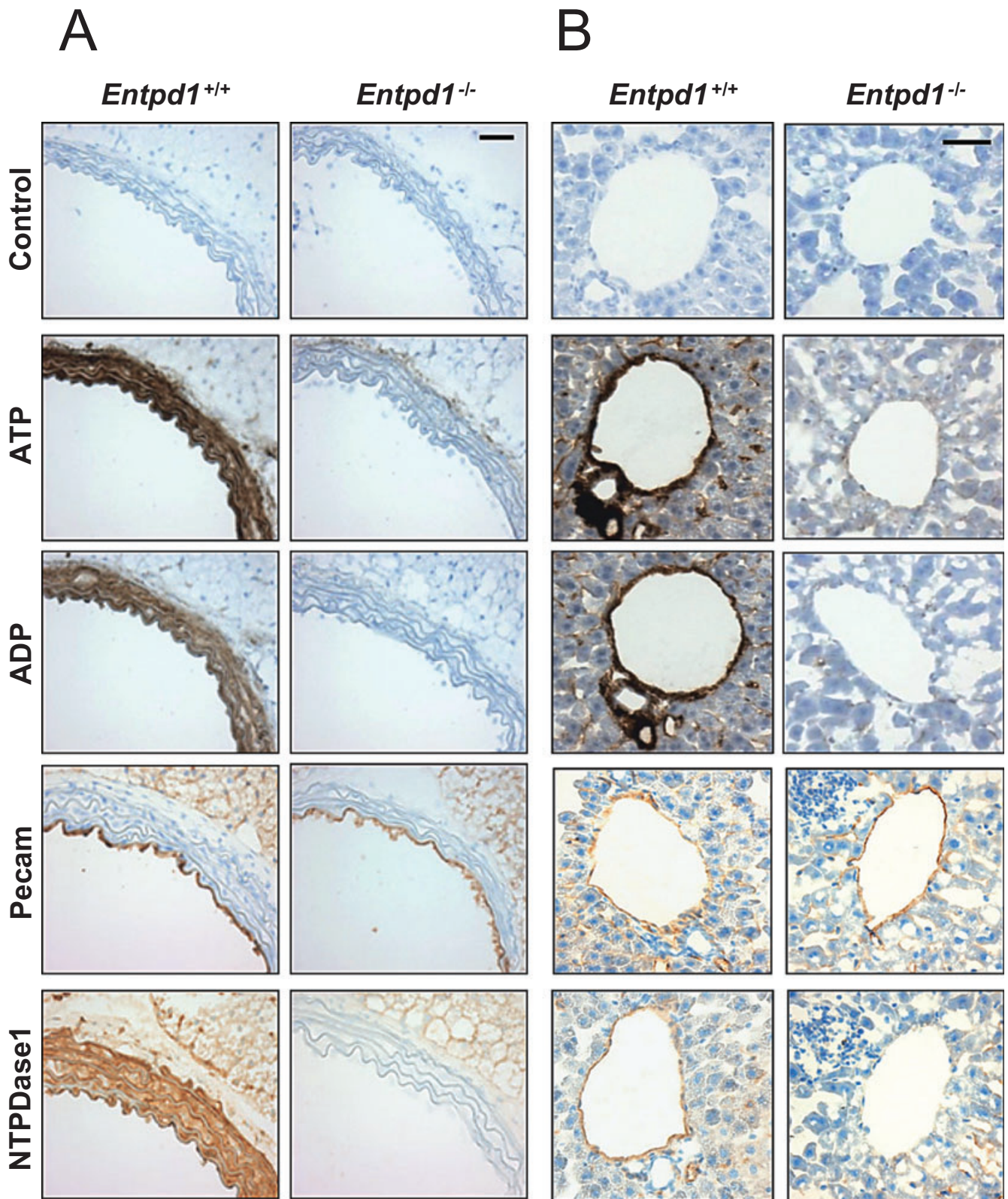


Figure 1 Deficit of nucleotidase activity in *Entpd1*^{-/-} mouse vasculature *in situ*. (A) Aorta sections: Nucleotide hydrolysis is impaired in the wall of *Entpd1*^{-/-} vessels compared with *Entpd1*^{+/+} aortas, which display significant ADPase and ATPase activity, as shown by the brown deposit on VSMCs and endothelial cells. The remaining ATPase activity in the adventitia is due to nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2). (B) Liver sections: The deficit in nucleotidase activity in the endothelium is more obvious in the hepatic central vein. The activity in canalicules is attributable to NTPDase8 (Fausther *et al.*, 2007). (A and B) Control immunolabelling of the endothelium (PECAM) and NTPDase1 immunolabelling was performed as described. Note that NTPDase1 is expressed on both endothelial cells and VSMCs, in agreement with the ATPase and ADPase activities in these cells. Scale bars represent 50 μ m.

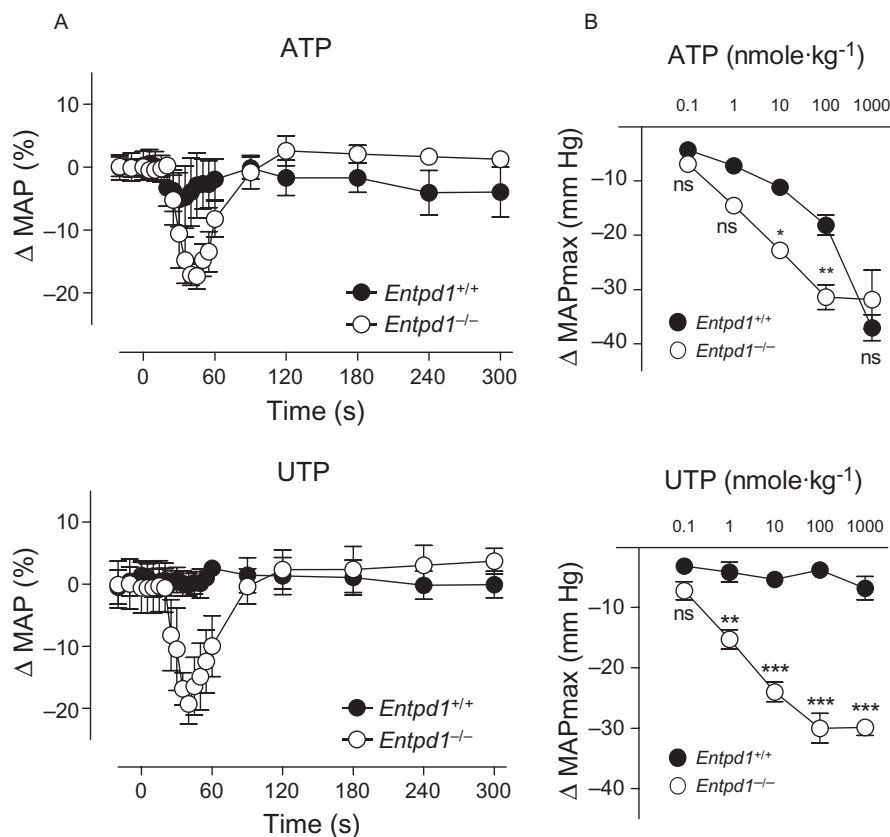


Figure 2 The absence of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase1) reveals a potent hypotensive effect of nucleotides. (A) Time course of the vascular response on the mean arterial pressure to injections of 10 nmole·kg⁻¹ of ATP (upper panel) or UTP (lower panel) in wild-type (*Entpd1*^{+/+}) and *Entpd1*^{-/-} mice. (B) Concentration-response curves comparing the maximal decrease in mean arterial pressure (Δ MAP max) in response to i.v. injections of ATP (upper panel) or UTP (lower panel). Data are representative of the mean \pm SEM of four to five experiments performed on different mice. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

analogues ADP β S and ATP γ S induced similar dose-dependent relaxation in either *Entpd1*^{+/+} or *Entpd1*^{-/-} aortic rings (Figure 3C and D and Table 1), revealing that endothelial P2Y receptor functionality was comparable in vessels of both genotypes. The specificity of these non-hydrolysable agonists for P2Y1 and P2Y2 was verified by showing that ADP β S relaxation was blocked by the specific P2Y1 receptor antagonist MRS2500, while the response to ATP γ S was absent in *P2ry2*^{-/-} aortas (data not shown), in agreement with previous studies (Guns *et al.*, 2006).

We previously observed that uracil nucleotides induced a strong contractile response in *Entpd1*^{-/-} denuded aortic rings (Kauffenstein *et al.*, 2009). We have found here that this exacerbated contractile response was by far exceeding the relaxing effect of these nucleotides, making the study of endothelial P2Y6 receptor dependent relaxation impossible in *Entpd1*^{-/-} tissues in this system (data not shown). In contrast, ATP and ADP did not display constrictor effect at concentrations below 30 μ M, making the study of their relaxing effect possible with no interference resulting from the direct VSMC contractile responses.

Endothelial P2Y receptor desensitization

The ability of nucleotides to desensitize endothelial P2Y1 and P2Y2 receptors was tested in presence and absence of

NTPDase1. For this, the relaxing effect of the non-hydrolysable analogues ADP β S and ATP γ S were measured in wild type and *Entpd1*^{-/-} aortas before and after exposure to different concentrations of the physiological agonists, ADP and ATP, at the P2Y1 and P2Y2 receptors, respectively (Figure 4). In *Entpd1*^{-/-} aortic rings, P2Y1 receptors desensitized partially after being exposed to 10 μ M ADP (44% of control relaxation), and completely after exposure to 100 μ M ADP for 30 min, resulting in the absence of ADP β S-induced relaxation (Figure 4B and D). In contrast, in *Entpd1*^{+/+} aortic rings, ADP β S-induced relaxation was only moderately affected after exposure to a much higher concentration of ADP (10 mM; 56% of control relaxation remaining; Figure 4D), revealing that NTPDase1 provides an efficient protection of P2Y1 receptor against desensitization by ADP. The P2Y2 receptors presented a different behaviour: ATP γ S-induced relaxation desensitized only weakly, even after exposing aortic rings to the high concentration of ATP (10 mM), and no significant difference between *Entpd1*^{+/+} and *Entpd1*^{-/-} aortic rings could be detected (Figure 4C and E). Besides, carbachol-induced relaxation was not modified after ATP (10 mM) desensitization, showing that the functionality of relaxation was preserved (data not shown). Note that this concentration of ATP also desensitizes P2Y1 receptors (Enjoji *et al.*, 1999).

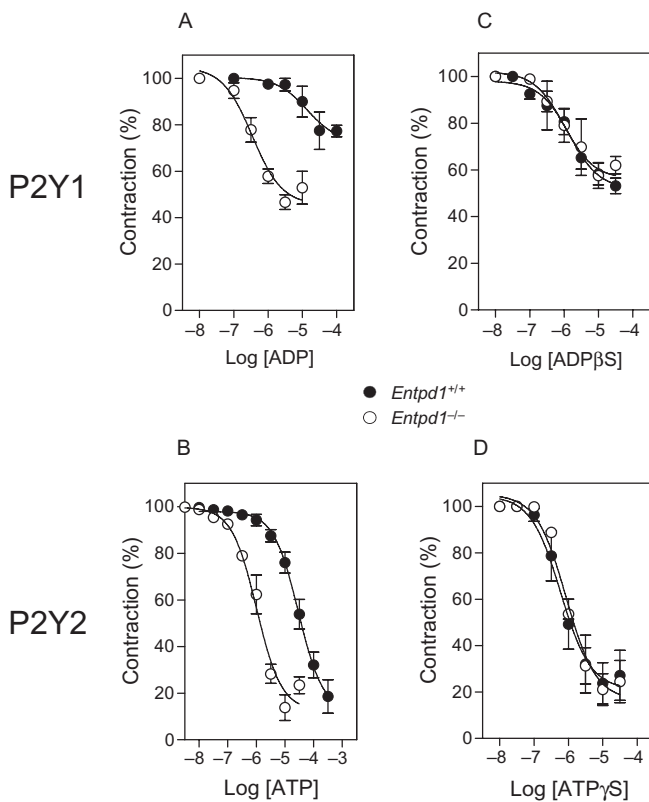


Figure 3 The relaxing effect of nucleotides is potentiated in *Entpd1*^{-/-} aortas. The relaxing effect of nucleotides was evaluated on U46619-precontracted aortas (30 nM). ADP and ATP were used as P2Y1 and P2Y2 receptor agonists, respectively. Both ADP (A) and ATP-dependent (B) relaxations were enhanced in *Entpd1*^{-/-} aortas. Relaxations induced by the non-hydrolysable analogues ADPβS (C) or ATPγS (D) were equivalent in both genotypes.

Table 1 Relaxation of *Entpd1*^{+/+} and *Entpd1*^{-/-} aortic rings in response to natural or non-hydrolysable agonists of P2Y1 and P2Y2 receptors

	<i>E</i> _{max} (% of relaxation)		<i>EC</i> ₅₀ (μM)	
	<i>Entpd1</i> ^{+/+}	<i>Entpd1</i> ^{-/-}	<i>Entpd1</i> ^{+/+}	<i>Entpd1</i> ^{-/-}
ADP	54	27	14	0.35
ADPβS	44	48	1.4	0.99
ATP	96	96	29	1.0
ATPγS	83	79	0.6	0.86

Values shown in the table are derived from concentration-response curves obtained with a single concentration for each aortic ring. The relaxant effect of each agonist concentration was determined on aortic rings from three to five different mice.

Discussion and conclusions

The study of *Entpd1*^{-/-} mice brought to light a role of this enzyme in thromboregulation (Enjyoji *et al.*, 1999; Pinsky *et al.*, 2002), angiogenesis (Goepfert *et al.*, 2001) and vascular permeability (Guckelberger *et al.*, 2004). As circulating nucleotides are potent vasodilators through activation of endothelial P2 receptors (Erlinge and Burnstock, 2008), we assessed the role of NTPDase1 in the regulation of nucleotide-

dependent relaxation. Both ATPase and ADPase activities were virtually absent in *Entpd1*^{-/-} mouse vessels (Figure 1), suggesting that NTPDase1 is the major enzyme responsible for the hydrolysis of nucleotides at the endothelial surface, in agreement with previous observations showing that NTPDase1 was the major ectonucleotidase in cardiac endothelial cells (Enjyoji *et al.*, 1999).

In vivo, the absence of NTPDase1 led to a more pronounced hypotension following i.v. injection of ATP and UTP. More striking was our finding that, when injected *in vivo*, UTP did not induce a hypotensive response (up to 1 μmole·kg⁻¹) in wild-type mice, while it was as potent as ATP in *Entpd1*^{-/-} mice (Figure 2). The fact that exogenous UTP did not modify arterial blood pressure in wild-type mice suggests that the receptor(s) involved (P2Y6 and/or P2Y2) is (are) tightly regulated by NTPDase1. These results also demonstrate that NTPDase1 differentially influences UTP and ATP responses *in vivo*.

An explanation for that discrepancy may be that the UTP receptor is located closer to NTPDase1 than the ATP receptor(s), as found for other P2 receptors. For example, P2Y1 and NTPDase1 have both been reported to be specifically located in the cholesterol-rich micro-domains of endothelial cells (Kaiser *et al.*, 2002; Papanikolaou *et al.*, 2005). Second, the vasodilator effect of adenine nucleotides may involve several P2Y (P2Y1,2,4) and P2X (P2X1,4) receptors, making the control of their activation by the action of NTPDase1 a more complex process. Finally, the major difference in the effect of UTP on blood pressure in wild-type and *Entpd1*^{-/-} mice may also be due to the low redundancy of uracil nucleotide hydrolyzing enzymes compared with the wide range of adenine nucleotide metabolizing ecto-enzymes (Robson *et al.*, 2006), making NTPDase1 particularly important in the regulation of uracil nucleotide action.

In aortic rings *in vitro*, we measured a leftward shift of the concentration-response curve of relaxation produced by the addition of either ADP or ATP. This reveals that NTPDase1 controls P2Y1 and P2Y2 receptor activation, as these are the receptors mediating the relaxant effects (Guns *et al.*, 2005; 2006) (Figure 3). The present observations *in vitro* and *in vivo* suggest that during conditions in which endothelial NTPDase1 activity is reduced, such as in vascular inflammation or oxidative stress (Robson *et al.*, 1997), the vasodilator effects of nucleotides would be potentiated.

As a counterpart, the absence of NTPDase1 revealed the propensity of endothelial P2Y1 receptors to undergo desensitization when exposed to ADP *in vitro* (Figure 4). The latter is in agreement with the rapid and complete P2Y1 receptor desensitization in the presence of its natural ligand ADP (Baurand *et al.*, 2000). The desensitization of P2Y1 receptors has been particularly examined on blood platelets, since it is responsible for the well-known refractory state of stored platelets (Holme and Holmsen, 1975). Indeed, apyrase, a potato enzyme that hydrolyses nucleotides similarly to NTPDase1, has been used since a long time to circumvent desensitization during platelet isolation (Ardlie *et al.*, 1971). This function is fulfilled by NTPDase1 *in vivo*. As a consequence, the absence of NTPDase1 leads to a bleeding disorder specifically linked to platelet P2Y1 receptor desensitization and a failure of aggregation (Enjyoji *et al.*, 1999). Here we found that NTPDase1 protects endothelial P2Y1 receptors and its associated

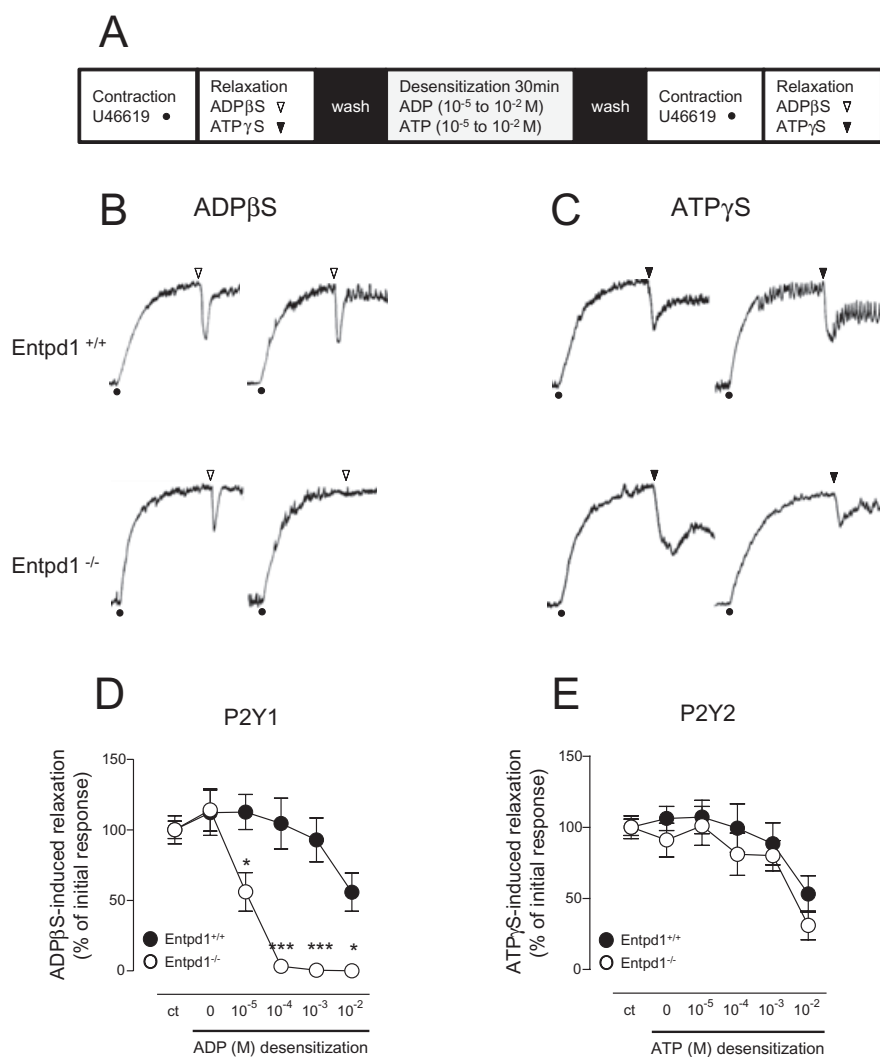


Figure 4 Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase1) differentially regulates the homologous desensitization of endothelial P2Y1 and P2Y2 receptors. Panel (A) represents the sequence of the protocol. *Entpd1^{+/+}* and *Entpd1^{-/-}* aortic rings were contracted with 30 nM U46619 and challenged for a first relaxation with 10 μ M of either ADP β S (white arrow) or ATP γ S (black arrow). After extensive washing of the non-hydrolysable analogue, the rings were exposed respectively to ADP or ATP for 30 min (0.01 to 10 mM), washed and challenged a second time for their ability to relax in response to the same non-hydrolysable agonist (second set of arrows). Panels (B) and (C) show representative tracings of the relaxation in response to ADP β S (b) or ATP γ S (C) before (left) and after (right) desensitization to 100 μ M ADP (B) or ATP (C). Panels (D) and (E) summarize the effects of the various concentrations of ADP and ATP used to desensitize ADP β S and ATP γ S responses, respectively. Results are expressed as percentage of the first relaxation produced before desensitization. Data are representative of the mean \pm SEM of 4–10 experiments performed on different mice. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

relaxation against desensitization. The fact that ADP β S-dependent relaxation was unchanged between *Entpd1^{+/+}* and *Entpd1^{-/-}* aortas in these *in vitro* experiments suggests that these receptors are not desensitized in the long term. However, we cannot exclude that endothelial P2Y1 receptors may desensitize when exposed to significant ADP concentrations released by blood cells, as from aggregating platelets (Enjyoji *et al.*, 1999). The *in vivo* hypotensive effect of ADP was not tested due to its pro-aggregatory properties.

On the other hand, P2Y2 receptor was only poorly desensitized in our experimental conditions. High concentrations of ATP were required to diminish P2Y2-dependent relaxation (Figure 4). These results clearly indicate that, in the same arterial preparation, P2Y2 receptors are less prone to desensitization than P2Y1 receptors and correlate with the earlier

observation that in bovine aortic endothelial cells, IP₃ accumulation induced by 2MeS-ADP- (a P2Y1 agonist) was more easily desensitized than responses to ATP/UTP (P2Y2 agonists) (Motte *et al.*, 1993; Wilkinson *et al.*, 1994). Similarly, repeated stimulation with 2MeS-ADP resulted in desensitization of the relaxing response in rat aorta, while UTP-induced relaxation was not affected (Dol-Gleizes *et al.*, 1999). Altogether, these data reveal that P2Y1 receptors are more likely to undergo homologous desensitization when compared with P2Y2 receptors, and that NTPDase1 plays a role in the protection of the former receptor.

Thus, even if P2Y1 and P2Y2 receptors are both coupled to Gq, they may display distinct desensitizing mechanisms. Indeed, it was recently shown that P2Y1 receptors recruit the G-protein-coupled receptor kinase-2 (GRK2), while P2Y2

receptors recruit GRK1 for their desensitization (Hoffmann *et al.*, 2008). Moreover, in endothelial cells, the effect of 2MeS-ATP (a P2Y1 agonist) on IP₃ was significantly inhibited after a short exposure to phorbol 12-myristate 13-acetate as compared with the effect of UTP (a P2Y2 agonist), suggesting that the P2Y1 receptor response was more sensitive to protein kinase C (PKC)-dependent desensitization than that of P2Y2 receptors (Communi *et al.*, 1995). Thus, sensitivity to PKC probably also contributes to the difference in desensitization of P2Y1 and P2Y2 receptors. Nevertheless, P2Y2 receptors did show a weaker desensitization in comparison with that of P2Y1 receptors, as its associated dependent relaxing effect was only diminished by half after 10 mM ATP exposure (Figure 4). Interestingly, NTPDase1 did not exert a protective effect on P2Y2, as it did for P2Y1 receptors. It is noteworthy that this high ATP concentration necessary for desensitization suggests that such desensitization of P2Y2 receptors does not occur *in vivo*.

In *Entpd1*^{-/-} arteries, the accumulation of UTP and UDP at the surface of VSMCs mediated a significant contraction (Kauffenstein *et al.*, 2009). The net effect of uracil nucleotides resulted in a constriction in *Entpd1*^{-/-} aortas instead of the relaxation obtained in the same vessels in *Entpd1*^{+/+}. For this reason, it was not possible to use *Entpd1*^{-/-} mice in this model to study the role of NTPDase1 on the function of endothelial P2Y6 receptors, which have been proposed to mediate UDP- and a part of UTP-dependent relaxation (Bar *et al.*, 2008). This apparent greater contribution of NTPDase1 to vasoconstriction *in vitro* is likely to be linked to the smaller intercellular space and the slower diffusion in the multi-layer-organized VSMCs, favouring the exposure of nucleotides to ectonucleotidases, limiting their effects. In our experimental model, the exogenous nucleotides had free access to both endothelial cells and VSMCs. Therefore, the bioavailability of nucleotides within smooth muscle would be strongly influenced by NTPDase1 action, and the absence of this enzyme would have more impact on VSMC activation (contraction) than on the endothelial function (relaxation), as observed here. This makes the full picture more complex to analyse, as P2Y1, P2Y2 and P2Y6 receptors are all expressed by both endothelial cells and VSMCs, making the bioavailability of nucleotides a crucial factor in the regulation of the vascular tone.

Our results suggest that physio(patho)logical modulation of NTPDase1 expression or activity in endothelial cells may differently affect P2Y1, P2Y2, and probably other endothelial P2 receptor activation and the consequent relaxation. Hypoxia was shown to dramatically increase NTPDase1 expression (Eltzschig *et al.*, 2003). The increased endothelial nucleotidase activity may diminish the potency of vasodilator effect of nucleotides, and, as a consequence, increase vascular tone. On the other hand, a reduced NTPDase1 activity has been reported in inflammatory and oxidative environments (Robson *et al.*, 1997). We can speculate that moderate down-regulation of NTPDase1 would facilitate P2 receptor activation, while a more profound drop in activity would lead to P2Y1 receptor desensitization and a loss in nucleotide-dependent relaxation. In considering NTPDase1 as a regulator of vascular tone, it is important to integrate the contribution of NTPDase1 at the surface of smooth muscles and endothelial cells, because variations in the expression or the activity of

the enzyme will have an opposite effect on vascular tone modulation, a drop in the activity enhancing the constrictor effect of nucleotides and vice versa. The final outcome of NTPDase1 modulation on vascular tone will depend on its respective endothelial versus muscular expression, as well as on the site of nucleotide release.

In conclusion, NTPDase1 constitutes the major ectoenzyme hydrolysing extracellular nucleotides at the surface of the vascular endothelium. Its absence allows a facilitated relaxation *in vitro* and a hypotensive effect *in vivo*, in response to nucleotides. The enzyme prevents endothelial P2 receptor overactivation and provides an efficient protection of P2Y1 receptors against desensitization. Endothelial P2Y2 receptors exhibited a limited desensitization that was not affected by NTPDase1 activity. In addition, *Entpd1*^{-/-} mice provide a useful model to highlight the predominant P2 receptors implicated in particular vascular fields. Further work is required to establish the *in vivo* relevance of such enzymatic control of vascular tone, taking into consideration physio(patho)logical conditions where the expression or activity of NTPDase1 is modified.

Acknowledgements

The authors are grateful to Drs SC Robson and K Enjyoji (HMS, Boston, MA, USA) for providing *Entpd1*^{-/-} mice, Dr B Robaye (ULB, Belgium) for *P2ry2*^{-/-} mice, and I Brochu (Sherbrooke University, QC, Canada) for technical assistance. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by a small pilot grant from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). GK received a fellowship from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale de France (INSERM) in partnership with the FRSQ, which was followed by an award from the Heart and Stroke Foundation of Canada in partnership with the CIHR and the Canadian Stroke Network. CRF was a recipient of a fellowship for visiting scholar at Université Laval sponsored by CAPES (Brazilian Ministry of Education), and JS was a recipient of a new investigator award from the CIHR and of a Junior 2 scholarship from the FRSQ.

Statement of conflicts of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C *et al.* (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58 (3): 281–341.
- Ahmad S, Ahmad A, Ghosh M, Leslie CC, White CW (2004). Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress. *J Biol Chem* 279 (16): 16317–16325.
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2008). Guide to receptors and channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol* 153 (Suppl 2): S1–S209.

- Ardlie NG, Perry DW, Packham MA, Mustard JF (1971). Influence of apyrase on stability of suspensions of washed rabbit platelets. *Proc Soc Exp Biol Med* **136** (4): 1021–1023.
- Bar I, Guns PJ, Metallo J, Cammarata D, Wilkin F, Boeynaems JM *et al.* (2008). Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **74** (3): 777–784.
- Baurand A, Eckly A, Bari N, Leon C, Hechler B, Cazenave JP *et al.* (2000). Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thromb Haemost* **84** (3): 484–491.
- Boarder MR, Hourani SM (1998). The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol Sci* **19** (3): 99–107.
- Bodin P, Bailey D, Burnstock G (1991). Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **103** (1): 1203–1205.
- Braun N, Sévigny J, Robson SC, Enjyoji K, Guckelberger O, Hammer K *et al.* (2000). Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur J Neurosci* **12** (12): 4357–4366.
- Burnstock G (2002). Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22** (3): 364–373.
- Burnstock G (2006). Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* **58** (1): 58–86.
- Communi D, Raspe E, Pirotton S, Boeynaems JM (1995). Coexpression of P2Y and P2U receptors on aortic endothelial cells. Comparison of cell localization and signaling pathways. *Circ Res* **76** (2): 191–198.
- Cote YP, Filep JG, Battistini B, Gauvreau J, Sirois P, Beaudoin AR (1992). Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovine aorta: evidence for a regulatory role in platelet activation in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1139** (1–2): 133–142.
- Dol-Gleizes F, Mares AM, Savi P, Herbert JM (1999). Relaxant effect of 2-methyl-thio-adenosine diphosphate on rat thoracic aorta: effect of clopidogrel. *Eur J Pharmacol* **367** (2–3): 247–253.
- Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K *et al.* (2003). Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ecto-nucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* **198** (5): 783–796.
- Enjyoji K, Sévigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS 2nd *et al.* (1999). Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* **5** (9): 1010–1017.
- Erlinge D, Burnstock G (2008). P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* **4** (1): 1–20.
- Fausther M, Lecka J, Kukulski F, Levesque SA, Pelletier J, Zimmermann H *et al.* (2007). Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292** (3): G785–G795.
- Gitterman DP, Evans RJ (2001). Nerve evoked P2X receptor contractions of rat mesenteric arteries; dependence on vessel size and lack of role of L-type calcium channels and calcium induced calcium release. *Br J Pharmacol* **132** (6): 1201–1208.
- Goepfert C, Sundberg C, Sévigny J, Enjyoji K, Hoshi T, Csizmadia E *et al.* (2001). Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice. *Circulation* **104** (25): 3109–3115.
- Gordon JL (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* **233** (2): 309–319.
- Guckelberger O, Sun XF, Sévigny J, Imai M, Kaczmarek E, Enjyoji K *et al.* (2004). Beneficial effects of CD39/ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost* **91** (3): 576–586.
- Guns PJ, Korda A, Crauwels HM, Van Assche T, Robaye B, Boeynaems JM *et al.* (2005). Pharmacological characterization of nucleotide P2Y receptors on endothelial cells of the mouse aorta. *Br J Pharmacol* **146** (2): 288–295.
- Guns PJ, Van Assche T, Fransen P, Robaye B, Boeynaems JM, Bult H (2006). Endothelium-dependent relaxation evoked by ATP and UTP in the aorta of P2Y2-deficient mice. *Br J Pharmacol* **147** (5): 569–574.
- Harrington LS, Evans RJ, Wray J, Norling L, Swales KE, Vial C *et al.* (2007). Purinergic 2X1 receptors mediate endothelial dependent vasodilation to ATP. *Mol Pharmacol* **72** (5): 1132–1136.
- Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H (1999). Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem* **262** (1): 102–107.
- Hoffmann C, Ziegler N, Reiner S, Krasel C, Lohse MJ (2008). Agonist-selective, Receptor-specific Interaction of Human P2Y Receptors with {beta}-Arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* **283** (45): 30933–30941.
- Holme S, Holmsen H (1975). ADP-induced refractory state of platelets in vitro. I. Methodological studies on aggregation in platelet rich plasma. *Scand J Haematol* **15** (2): 96–103.
- Joseph SM, Buchakjian MR, Dubyak GR (2003). Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* **278** (26): 23331–23342.
- Kaiser RA, Oxhorn BC, Andrews G, Buxton IL (2002). Functional compartmentation of endothelial P2Y receptor signaling. *Circ Res* **91** (4): 292–299.
- Kauffenstein G, Drouin A, Thorin-Trescases N, Bachelard H, Robaye B, D'Orleans-Juste P *et al.* (2009). NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. *Cardiovasc Res* [Epub ahead of print] doi: 10.1093/cvr/cvp265.
- von Kugelgen I, Haussinger D, Starke K (1987). Evidence for a vasoconstriction-mediating receptor for UTP, distinct from the P2 purinoceptor, in rabbit ear artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **336** (5): 556–560.
- Marcus AJ, Safer LB, Hajjar KA, Ullman HL, Islam N, Broekman MJ *et al.* (1991). Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells. *J Clin Invest* **88** (5): 1690–1696.
- Martín-Satué M, Lavoie EG, Pelletier J, Fausther M, Csizmadia E, Guckelberger O *et al.* (2009). Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* **131** (5): 615–628.
- Motte S, Pirotton S, Boeynaems JM (1993). Heterogeneity of ATP receptors in aortic endothelial cells. Involvement of P2y and P2u receptors in inositol phosphate response. *Circ Res* **72** (3): 504–510.
- North RA (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82** (4): 1013–1067.
- Ostrom RS, Gregorian C, Insel PA (2000). Cellular release of and response to ATP as key determinants of the set-point of signal transduction pathways. *J Biol Chem* **275** (16): 11735–11739.
- Papanikolaou A, Papafotika A, Murphy C, Papamarcaki T, Tsolas O, Drab M *et al.* (2005). Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *J Biol Chem* **280** (28): 26406–26414.
- Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R *et al.* (2002). Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* **109** (8): 1031–1040.
- Robson SC, Kaczmarek E, Siegel JB, Candinas D, Koziak K, Millan M *et al.* (1997). Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med* **185** (1): 153–163.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* **2**: 409–430.
- Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I *et al.* (2002). Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* **99** (8): 2801–2809.

- Shah MK, Kadowitz PJ (2002). Cyclic adenosine monophosphate-dependent vascular responses to purinergic agonists adenosine triphosphate and uridine triphosphate in the anesthetized mouse. *J Cardiovasc Pharmacol* **39** (1): 142–149.
- Wilkinson GF, Purkiss JR, Boarder MR (1994). Differential heterologous and homologous desensitization of two receptors for ATP (P2y purinoceptors and nucleotide receptors) coexisting on endothelial cells. *Mol Pharmacol* **45** (4): 731–736.
- Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N *et al.* (2006). Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* **12** (1): 133–137.
- Yang S, Cheek DJ, Westfall DP, Buxton IL (1994). Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. *Circ Res* **74** (3): 401–407.
- Yeung G, Mulero JJ, McGowan DW, Bajwa SS, Ford JE (2000). CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. *Biochemistry* **39** (42): 12916–12923.
- Zimmermann H (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362** (4–5): 299–309.

ANEXO II

Contribuição dos receptores P2 no vasorelaxamento dependente de plaquetas ativadas

Cristina Ribas Fürstenau[#], Gilles Kauffenstein[#], Susana Tchernin Wofchuk e Jean Sévigny

[#] Ambos são autores principais

Padronização de Metodologia e Resultados Preliminares

Contribuição dos receptores P2 no vasorelaxamento dependente de plaquetas ativadas

Cristina Ribas Fürstenau^{1,#}, Gilles Kauffenstein^{2,#}, Susana Tchernin Wofchuk¹ e Jean Sévigny³

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ²UFR Sciences Médicales, Angers, France (UMR CNRS 6214 - INSERM 771). ³Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada.

Ambos são autores principais

1. Introdução:

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos versáteis cuja principal função é cessar o sangramento (Zucker & Nachmias, 1985). No entanto, sabe-se que, sob ativação, as plaquetas liberam ou produzem diferentes substâncias capazes de afetar o tônus vascular (Forstermann et al., 1988, Kaul et al., 1991, Kaul et al., 1992, Vanhoutte & Houston, 1985). Dentre estas substâncias, a 5-hidroxitriptamina (5HT, serotonina) e o tromboxano A₂ (TXA₂) podem induzir a constrição dos vasos sanguíneos, enquanto que os nucleotídeos da adenina (ATP e ADP) podem levar ao relaxamento vascular (Kaul et al., 1994). A vasoconstrição local em resposta às plaquetas agregadas é considerada um importante mecanismo que contribui para o vasoespasm observado em estados patológicos (Vanhoutte & Houston, 1985). Entretanto, as plaquetas de humanos ativadas liberam muito mais ADP do que serotonina e tromboxano (Meyers et al., 1982), de maneira que a resposta predominante às substâncias liberadas por estes fragmentos é a vasodilatação (Kaul et al., 1994).

A ativação dos receptores purinérgicos (P2) endoteliais provoca uma vasodilatação local envolvendo os três principais fatores vasodilatadores: óxido nítrico (NO), prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Erlinge & Burnstock, 2008). Os receptores P2Y₁ e P2Y₂ têm sido apontados como os responsáveis pela vasodilatação causada pelos nucleotídeos ADP e ATP/UTP na maioria dos tecidos (Boarder & Hourani, 1998).

A participação dos nucleotídeos oriundos de plaquetas sob ativação no relaxamento vascular tem sido evidenciada em diferentes estudos. Houston e colaboradores mostraram que os nucleotídeos da adenina de plaquetas humanas causam o relaxamento direto das artérias coronárias em cães (Houston et al., 1986). Além disso, sabe-se que o ATP e o ADP produzem um potente relaxamento dependente do endotélio em artéria femural e carótida de cães (De Mey & Vanhoutte, 1981, Houston et al., 1985). Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a

contribuição dos receptores P2Y endoteliais específicos (P2Y₁, P2Y₂ e/ ou P2Y₆), bem como da NTPDase1, no relaxamento dependente da ativação plaquetária.

2. Protocolo Experimental Geral:

Utilização do sobrenadante de plaquetas humanas ativadas (APSN) para induzir o relaxamento de anéis aórticos de camundongos em experimentos de reatividade vascular.

3. Padronização da Metodologia:

a. Lavagem das plaquetas:

A lavagem das plaquetas foi baseada em um protocolo previamente descrito (Cazenave et al., 1983). Brevemente, cerca de 50 mL de plasma rico em plaquetas (PRP) de humanos foi centrifugado por 14 minutos a 2900 rpm (Centrífuga IEC Centra 8R, Rotor IEC 216) à temperatura ambiente. Em seguida, o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi cuidadosamente removido. O precipitado foi resuspenso com o auxílio de uma pipeta plástica em 25 mL de tampão Krebs (em mM: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25 e glicose 5.5, pH 7.4) contendo 0.35% de albumina sérica bovina (BSA), 0.05 U/mL de apirase, 10 U/mL de heparina e 1 µM de adenosina, pré-aquecido à 37°C. As plaquetas foram novamente centrifugadas (Centrífuga IEC Centra 8R, Rotor IEC 216) a 2100 rpm à temperatura ambiente por 8 minutos e o precipitado resultante foi resuspenso no mesmo tampão, à exceção da heparina e da adenosina que não foram adicionadas a partir desta etapa. Posteriormente, as plaquetas foram contadas com o auxílio de um hemocítômetro e, finalmente, centrifugadas (Centrífuga IEC Centra 8R, Rotor IEC 216) a 2100 rpm por 8

minutos à temperatura ambiente. O precipitado de plaquetas foi resuspenso em tampão Krebs (pH 7.4) contendo apenas 0.35% de BSA, pré-aquecido a 37°C, a fim de se obter uma suspensão final contendo 500000 plaquetas/ μ L (para os ensaios de agregação) ou a concentração desejada (100000 plaquetas/ μ L para os experimentos de reatividade vascular no banho orgânico).

b. Teste da qualidade da suspensão de plaquetas:

A qualidade da suspensão de plaquetas foi avaliada a partir de sua capacidade de resposta à agregação a 5 μ M de ADP e a 1 U/mL de trombina em um volume final de reação de 500 μ L em tampão Krebs + 0.35% BSA. A reação foi iniciada pela adição dos agonistas à suspensão de plaquetas (concentração final de 500000 plaquetas/ μ L) sob agitação. A agregação plaquetária e a mudança de forma das plaquetas foram monitoradas por até 5 minutos em um agregômetro Payton de dois canais – modelo1020B (Payton Scientific Inc., NY, USA) com controle de temperatura, a qual foi mantida a 37°C durante todo o curso da reação. A agregação máxima (100%) foi considerada como a transmissão de luz produzida somente pelo tampão sem plaquetas.

c. Obtenção do sobrenadante de plaquetas ativadas (APSN):

As plaquetas foram ativadas utilizando-se 5 U/mL de trombina sob agitação por 4 minutos. Durante este tempo, foi possível observar a degranulação das plaquetas a olho nu. Posteriormente, a suspensão de plaquetas ativadas e agregadas foi centrifugada (Centrífuga Eppendorf, tubo de 1.5 mL) a 14000 rpm por 2 minutos a 4°C. O APSN foi mantido em gelo e imediatamente utilizado para os experimentos de reatividade vascular.

d. Determinação da concentração de plaquetas:

A concentração de plaquetas a ser ativada para a obtenção do APSN e posterior utilização nos experimentos de reatividade vascular foi determinada a partir de diferentes suspensões de plaquetas com concentrações finais no banho orgânico que variaram de 25000 a 200000 plaquetas/ μ L. Estas suspensões foram testadas em anéis aórticos intactos (com a camada endotelial preservada) em repouso ou pré-contraídos, conforme descrito posteriormente.

e. Determinação dos níveis de nucleotídeos no APSN:

O APSN oriundo da ativação das plaquetas foi submetido a um processo para a extração de nucleotídeos. Primeiramente, o sobrenadante foi misturado com 1 mM de EGTA e 1 mM de EDTA. Posteriormente, ácido perclórico gelado em uma proporção de 1:1 foi adicionado à mistura que foi centrifugada (Centrífuga Eppendorf, tubo de 1.5 mL) a 14000 rpm por 3 minutos a 4°C. Uma alíquota do sobrenadante foi coletada, neutralizada com 0.5 M KOH e misturada com 17% (v/v) de n-heptano. Uma segunda centrifugação a 14000 (Centrífuga Eppendorf, tubo de 1.5 mL) rpm por 3 minutos a 4°C foi realizada para a remoção dos lipídeos e a precipitação do ácido perclórico. Após a centrifugação, uma solução heterogênea com três camadas foi obtida, na qual a camada superior estava composta por n-heptano e lipídeos, a camada do meio era constituída pelos nucleotídeos e a camada inferior continha o precipitado de ácido perclórico. Uma alíquota de 100 μ L da camada do meio foi coletada para imediata detecção dos níveis de nucleotídeos por HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) como previamente descrito (Kukulski et al., 2005). Em alguns experimentos, as plaquetas foram degranuladas em presença de 5 U/mL de apirase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) – uma enzima conhecida por hidrolisar os nucleotídeos di e trifosfatos.

f. Dissociação do efeito dos nucleotídeos dos demais agentes vasoativos:

Considerando-se que as plaquetas sob ativação liberam, além dos nucleotídeos, outras moléculas vasoativas, o objetivo desta etapa consistiu em eliminar os efeitos constritores da 5HT e do TXA₂. Para determinar o melhor antagonista para os receptores de serotonina, foram realizadas curvas concentração-resposta à 5HT (10⁻⁹ a 10⁻⁴ M) na ausência ou presença de quetanserina (10⁻⁶ e 10⁻⁷M), metiotepina (10⁻⁵ e 10⁻⁶M) e metilsergida (10⁻⁶ e 10⁻⁷M) diretamente sobre os anéis aórticos no banho orgânico. Para inibir a síntese de TXA₂, as suspensões de plaquetas foram incubadas com ozagrel (10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷M) por 40 minutos a 37°C antes da sua degranulação e utilização nos experimentos de reatividade vascular.

g. Experimentos de reatividade vascular:

Para os experimentos de reatividade vascular, os camundongos (linhagem: C57Bl6) foram anestesiados com uma injeção i.p. de uma mistura de quetamina (100 mg/kg) e xilasina (20 mg/kg). A porção torácica das aortas foi removida, lavada com uma solução salina/heparina 20 U/mL e mantida em tampão Krebs a 4°C até sua utilização. Em seguida, as aortas foram divididas em segmentos de 2 mm e montadas entre dois triângulos de tungstênio em banhos orgânicos de 5 mL contendo Krebs (a 37°C, aerado com 95% O₂/ 5% CO₂, pH 7.4). Os anéis aórticos foram gradualmente estirados durante 1 hora até atingirem uma tensão de 0.75 g. As mudanças isométricas no tônus vascular foram medidas por transdutores de força (modelo 52-9545, Harvard Apparatus, South Natick, MA) acoplados a gravadores gráficos (modelo 2210 ou REC, LKB, Rockville, MD). Após duas constrições ao KCl (50 mM), o efeito relaxante dos nucleotídeos foi avaliado em anéis aórticos em repouso ou pré-contraídos com 30 nM U46619 (análogo do TXA₂).

4. Resultados Preliminares e Discussão:

O passo inicial e limitante para a padronização desta metodologia consistia na obtenção de uma suspensão de plaquetas lavadas e separadas dos outros constituintes plasmáticos que permanecesse responsiva após as etapas de lavagem. Desta maneira, a qualidade da suspensão de plaquetas lavadas, em uma concentração da ordem de 500000 plaquetas/ μL , foi avaliada em um ensaio de agregação em resposta ao ADP (5 μM) e à trombina (1 U/mL). A figura 1 mostra um gráfico representativo deste experimento, em que as plaquetas lavadas, quando desafiadas com 5 μM de ADP, apresentaram o típico perfil de agregação esperado para este agonista (Cazenave et al., 1983), começando com a alteração da sua forma, atingindo em torno de 40% da agregação máxima e sendo completamente reversível após 3 a 4 minutos. É importante salientar que a agregação ao ADP requer a presença de fibrinogênio, o qual foi devolvido à suspensão de plaquetas lavadas pela adição de uma alíquota de PPP. Da mesma maneira, a agregação plaquetária em resposta à trombina ocorreu conforme o esperado (Cazenave et al., 1983), ou seja, começando com uma alteração na sua forma, atingindo em torno de 50 a 60% da agregação máxima e sendo completamente irreversível. Os ensaios de agregação foram realizados em diferentes tempos após o término da lavagem das plaquetas. Na figura 1, o tempo representado é o de 2 horas após o término das lavagens, o qual foi condizente com o tempo necessário para o preparo e equilíbrio dos anéis aórticos no banho orgânico. A preparação mostrou-se estável e responsiva por até 8 horas (dados não mostrados). A partir destes dados, concluímos que a primeira parte desta padronização da metodologia, ou seja, a lavagem de plaquetas, foi grandemente satisfatória.

Posteriormente, suspensões de plaquetas com concentrações diferentes (de 25000 a 200000 plaquetas/ μL , concentração final no banho orgânico) foram ativadas com 5 U/ mL de trombina e centrifugadas para obtenção do APSN contendo as substâncias vasoativas, o que

foi testado sobre os anéis aórticos (dados não mostrados). O sobrenadante resultante da suspensão contendo 100000 plaquetas/ μL (concentração final no banho orgânico) foi estabelecido como a melhor concentração a ser utilizada para os experimentos de reatividade vascular. Esta concentração mostrou-se capaz de produzir um efeito, o qual pôde ser medido no nosso sistema experimental, e está de acordo com a concentração previamente utilizada por Houston (Houston et al., 1986). O APSN levou à constrição dos anéis intactos em repouso (Figura 2A) e ao relaxamento dos anéis pré-contraídos com U46619 (Figura 2B). Considerando o exposto anteriormente de que a resposta predominante às substâncias liberadas pelas plaquetas ativadas é a vasodilatação (Kaul et al., 1994), a não observância deste comportamento nos anéis em repouso pode ser devido a uma limitação técnica, uma vez que é impossível obter traçados abaixo daqueles da linha de base no sistema de registro utilizado. Porém, quando pré-contraídos com o análogo do TXA_2 , os anéis responderam ao APSN com um considerável relaxamento.

Tendo caracterizado a lavagem das plaquetas, bem como a concentração a ser utilizada para os experimentos de reatividade vascular, o passo seguinte foi a determinação dos níveis de purinas no APSN. Para tanto, os nucleotídeos foram extraídos e medidos como descritos anteriormente. Um fator de diluição igual a 5 deve ser considerado, uma vez que a extração dos nucleotídeos foi feita a partir de uma suspensão contendo 500000 plaquetas/ μL , a qual foi adicionada ao banho orgânico de maneira a alcançar concentração final de 100000 plaquetas/ μL . Desta maneira, a figura 3A mostra que os níveis de ATP e ADP encontrados no sobrenadante de plaquetas ativadas se encontra em torno de 1 μM , o qual é suficiente para a ativação dos receptores P2 endoteliais em aorta de camundongos (Guns et al., 2005). Além disso, a adição de apirase (5 U/ mL), conhecida por hidrolisar nucleotídeos di e tri-fosfatos, à suspensão de plaquetas antes da sua degranulação, fez com que o ATP e o ADP fossem

praticamente abolidos do APSN, além de favorecer o acúmulo de AMP (Figura 3B). Portanto, com este experimento ficou confirmada a presença dos nucleotídeos no APSN, em concentrações compatíveis com a ativação de receptores P2 endoteliais.

A etapa seguinte desta padronização consistiu em dissociar os efeitos dos nucleotídeos das demais substâncias vasoativas (5HT e TXA₂) liberadas ou produzidas pelas plaquetas sob ativação. Desta maneira, a metilsergida, um antagonista misto dos receptores 5HT₁ e 5HT₂, na concentração 10⁻⁷ M foi determinada como a melhor molécula para bloquear os efeitos da 5HT (dados não mostrados). A partir deste resultado, a metilsergida foi adicionada ao banho orgânico em todos os experimentos subsequentes 20 minutos antes da adição do APSN.

A figura 4 mostra um resumo dos efeitos do APSN sobre os anéis aórticos pré-contraídos com 30 nM de U46619. O APSN controle apresentou um relaxamento em torno de 30%, enquanto que a apirase (2U/mL) adicionada à suspensão de plaquetas durante a degranulação foi capaz de reduzir esta resposta em quase 50%, possivelmente por abolir os nucleotídeos da preparação. Além disso, o bloqueio dos receptores de serotonina pela metilsergida (10⁻⁷ M, adicionada aos anéis aórticos 20 minutos antes do APSN) aumentaram o relaxamento pelo APSN, provavelmente por inibir a resposta vasoconstritora desta molécula. O ozagrel (10⁻⁷ M), inibidor da síntese de TXA₂, adicionado à suspensão de plaquetas a 37°C por 40 minutos antes de sua degranulação, parece não ter exercido nenhum efeito sobre a resposta do APSN. As possíveis explicações para este resultado são a ocupação prévia do receptor de TXA₂ pelo seu análogo (U46619) utilizado para pré-contrair os anéis aórticos e, ainda, o tempo curtíssimo de meia-vida do tromboxano A₂ (em torno de 32 segundos em pH 7.2) (Bhagwat et al., 1985).

No final do meu período de estágio no exterior, a maioria das condições para a avaliação do efeito dos nucleotídeos provenientes do APSN sobre o relaxamento de anéis aórticos havia

sido estabelecida, fortalecendo a viabilidade do projeto proposto. No entanto, o efeito direto da trombina (utilizada para a ativação das plaquetas) sobre as aortas permanece por ser estabelecido, uma vez que esta molécula parece ter um efeito vasorelaxante *per se* (Kataoka et al., 2003). Após este último passo da padronização, o APSN poderá ser testado nos diferentes genótipos animais a fim de avaliar a participação da enzima NTPDase1, bem como determinar qual(is) os receptores P2 endoteliais (P2Y₁, P2Y₂ e/ou P2Y₆) específicos envolvidos nesta resposta.

Plaquetas hiper-responsivas têm sido frequentemente encontradas em casos de hipertensão essencial (Pravenec et al., 1992), e o aumento da sua ativação na HAS provavelmente desempenha um importante papel no início e no progresso da aterosclerose e das desordens associadas (Islim et al., 1995). O relaxamento dependente do endotélio em resposta aos nucleotídeos em aortas de camundongos passa pela ativação dos receptores P2Y₁ (ADP), P2Y₂ (ATP) e P2Y₆ (UDP) (Guns et al., 2006). O receptor P2Y₁ é absolutamente necessário para a agregação plaquetária induzida por ADP e tem sido sugerido com um alvo relevante para novos compostos anti-plaquetários (Gachet, 2008). Portanto, o entendimento da contribuição deste receptor na vasodilatação mediada por plaquetas ativadas torna-se imprescindível ao considerar-se o uso de antagonistas para este receptor na saúde humana, sob a pena de um aumento geral no *status* vasoconstritor e suas consequências.

Figura 1

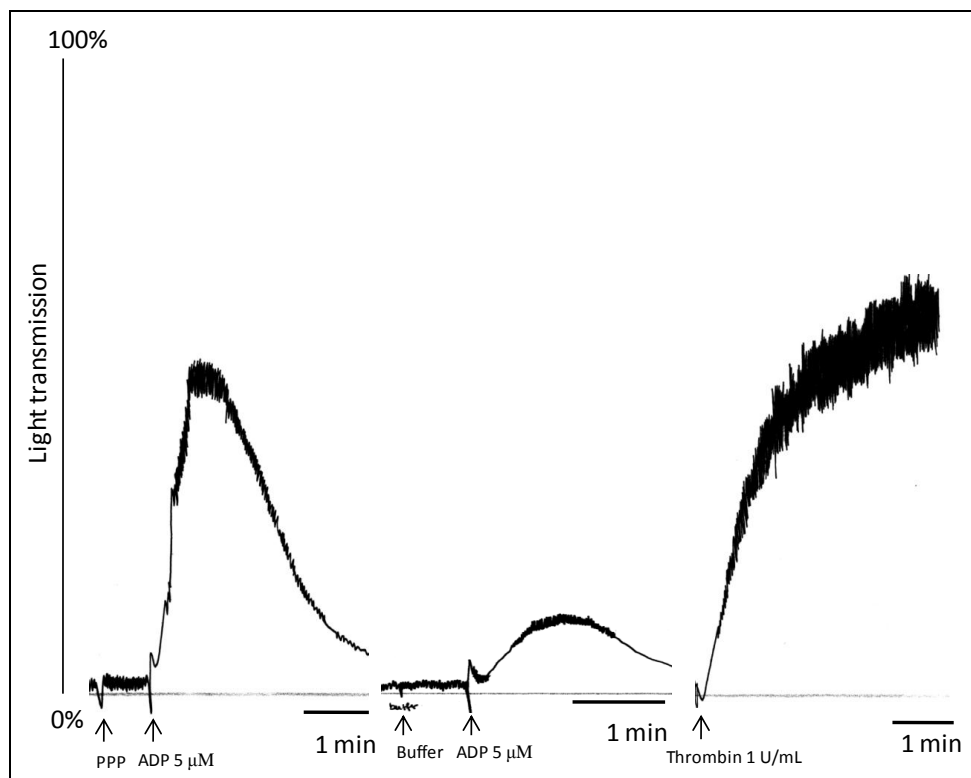


Figura 1: Traçados representativos de ensaio de agregação plaquetária realizados com uma suspensão de plaquetas (500000 plaquetas/ μ L). A agregação ao ADP (5 μ M) atingiu em torno de 40% da agregação máxima e foi completamente reversível após 3 a 4 minutos, enquanto que a agregação à trombina (1U/mL) alcançou cerca de 60% da agregação máxima e foi completamente irreversível. Ensaio representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (100% de agregação = transmissão de luz produzida pelo tampão sem plaquetas).

Figura 2

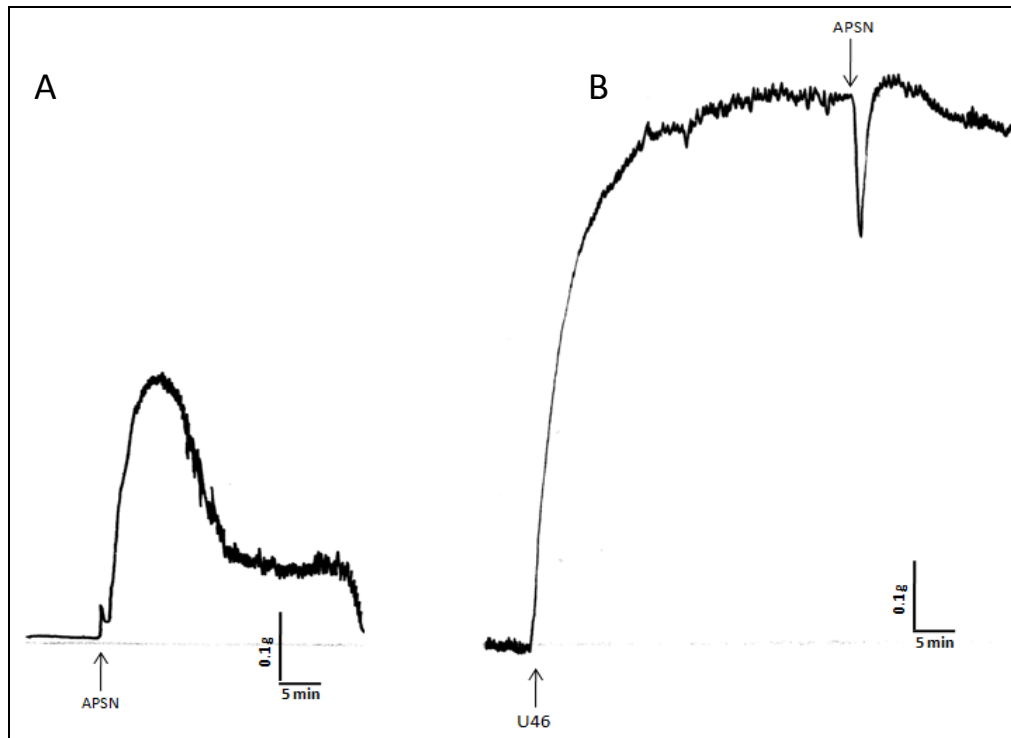


Figura 2: Efeito global do sobrenadante de plaquetas ativadas (APSN) (100000 plaquetas/ μ L, concentração final) sobre anéis aórticos intactos de camundongos em repouso (A) ou pré-contraídos com 30 nM de U46619 (B). Traçados de reatividade vascular representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

Figura 3

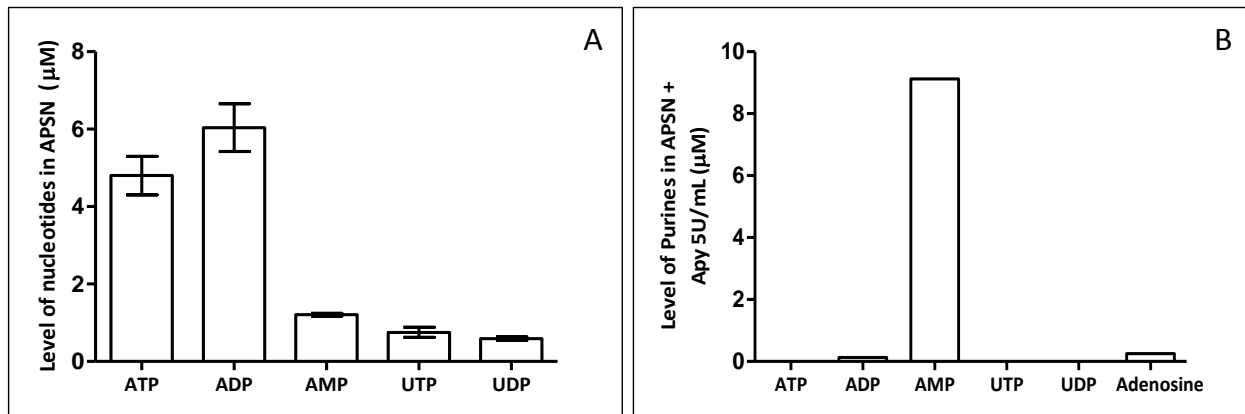


Figura 3: Níveis de purinas no sobrenadante de plaquetas ativadas (APSN). As concentrações de ATP e ADP (A) alcançam um concentração em torno de $1 \mu\text{M}$, considerando-se um fator de diluição igual a 5 ($n=3$ para preparações de plaquetas provenientes de diferentes doadores). A adição de apirase (5 U/ mL) antes da degranulação plaquetária aboliu o ATP e o ADP e favoreceu o acúmulo de AMP ($n=1$, representativo de pelo menos 3 experimentos independentes).

Figura 4

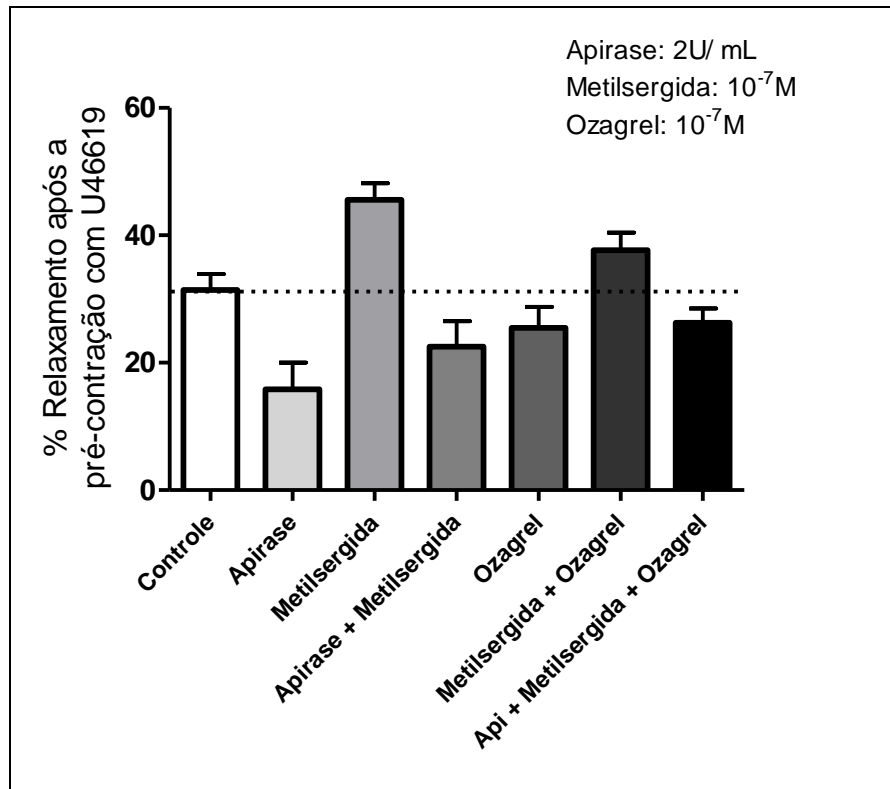


Figura 4: Relaxamento produzido pelo APSN em anéis aórticos intactos pré-contraídos com 30 nM de U46619. O efeito do APSN foi testado sob diferentes condições: controle, apirase (2 U/mL), metilsergida (10^{-7} M) e ozagrel (10^{-7} M) (n=3 a 8 para os diferentes grupos).

Referências

- [1] Zucker MB, Nachmias VT. Platelet activation. *Arteriosclerosis* 1985;5 (1):2-18.
- [2] Forstermann U, Mugge A, Bode SM, Frolich JC. Response of human coronary arteries to aggregating platelets: importance of endothelium-derived relaxing factor and prostanoids. *Circ Res* 1988;63 (2):306-12.
- [3] Kaul S, Heistad DD, Mugge A, Armstrong ML, Piegors DJ, Lopez JA. Vascular responses to platelet activation in normal and atherosclerotic primates in vivo. *Arterioscler Thromb* 1991;11 (6):1745-51.
- [4] Kaul S, Padgett RC, Waack BJ, Brooks RM, Heistad DD. Effect of atherosclerosis on responses of the perfused rabbit carotid artery to human platelets. *Arterioscler Thromb* 1992;12 (10):1206-13.
- [5] Vanhoutte PM, Houston DS. Platelets, endothelium, and vasospasm. *Circulation* 1985;72 (4):728-34.
- [6] Kaul S, Waack BJ, Padgett RC, Brooks RM, Heistad DD. Interaction of human platelets and leukocytes in modulation of vascular tone. *Am J Physiol* 1994;266 (5 Pt 2):H1706-14.
- [7] Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol* 1982;243 (3):R454-61.
- [8] Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 2008;4 (1):1-20.
- [9] Boarder MR, Hourani SM. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19 (3):99-107.
- [10] Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated canine coronary arteries. Role of serotonin, thromboxane A2, and adenine nucleotides. *J Clin Invest* 1986;78 (2):539-44.
- [11] De Mey JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol* 1981;316:347-55.
- [12] Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Adenine nucleotides, serotonin, and endothelium-dependent relaxations to platelets. *Am J Physiol* 1985;248 (3 Pt 2):H389-95.
- [13] Cazenave JP, Hemmendinger S, Beretz A, Sutter-Bay A, Launay J. [Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. Methodology]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1983;41 (3):167-79.

- [14] Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sevigny J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 2005;1 (2):193-204.
- [15] Guns PJ, Korda A, Crauwels HM, Van Assche T, Robaye B, Boeynaems JM, Bult H. Pharmacological characterization of nucleotide P2Y receptors on endothelial cells of the mouse aorta. *Br J Pharmacol* 2005;146 (2):288-95.
- [16] Bhagwat SS, Hamann PR, Still WC, Bunting S, Fitzpatrick FA. Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂. *Nature* 1985;315 (6019):511-3.
- [17] Kataoka H, Hamilton JR, McKemy DD, Camerer E, Zheng YW, Cheng A, Griffin C, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood* 2003;102 (9):3224-31.
- [18] Pravenec M, Kunes J, Zicha J, Kren V, Klir P. Platelet aggregation in spontaneous hypertension: genetic determination and correlation analysis. *J Hypertens* 1992;10 (12):1453-6.
- [19] Islim IF, Bareford D, Ebanks M, Beevers DG. The role of platelets in essential hypertension. *Blood Press* 1995;4 (4):199-214.
- [20] Guns PJ, Van Assche T, Fransen P, Robaye B, Boeynaems JM, Bult H. Endothelium-dependent relaxation evoked by ATP and UTP in the aorta of P2Y₂-deficient mice. *Br J Pharmacol* 2006;147 (5):569-74.
- [21] Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 2008;99 (3):466-72.

PARTE III

DISCUSSÃO

O conceito de sinalização purinérgica, o qual considera os nucleotídeos e nucleosídeos purínicos e pirimidínicos como mensageiros extracelulares, foi proposto há mais de 30 anos. Estas moléculas, assim como seus receptores específicos e as enzimas responsáveis pela sua degradação, são amplamente distribuídos em todos os sistemas animais, podendo mediar funções sinalizadoras agudas (de curta duração) ou crônicas (de longa duração). Em condições patológicas, a plasticidade na expressão dos receptores purinérgicos tem sido observada e drogas que atuam sobre o sistema de sinalização por nucleotídeos têm sido consideradas como possíveis agentes terapêuticos.

Inúmeros estudos têm relatado o envolvimento do sistema purinérgico em distintos contextos patofisiológicos (para detalhes, consultar Burnstock (2006c) e as referências contidas no artigo). Em particular, nosso grupo de pesquisa tem especial interesse em avaliar possíveis modulações nas atividades das enzimas responsáveis pela degradação extracelular dos nucleotídeos e tem publicado diferentes estudos, com destaque para aqueles em que as ectonucleotidases presentes em células relacionadas ao sistema cardiovascular estão particularmente alteradas. Mostramos que a hidrólise de nucleotídeos foi modificada em plaquetas de ratos submetidos a um modelo de endotoxemia por LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*) (Vuaden et al., 2009). Relatamos um aumento nas atividades de hidrólise de ATP, ADP e AMP em plaquetas de ratos submetidos à administração de angiotensina II, além de alterações no catabolismo das purinas em plaquetas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sugerindo uma interação entre os sistemas purinérgico e angiotensinérgico (Furstenau et al., 2007). Em trabalhos anteriores, demonstramos ainda que as atividades das ectonucleotidases de soro sanguíneo podem ser modificadas por diversos compostos (Bohmer et al., 2006, Torres et al., 2007) e em resposta a diferentes situações, como o estresse por

exemplo (Bohmer et al., 2003, Torres et al., 2002). Além disso, evidenciamos a modulação da atividade e da expressão das ectonucleotidases de células musculares lisas vasculares (VSMC) (Tamajusuku et al., 2006), de cardiomiócitos (Barreto-Chaves et al., 2006, Carneiro-Ramos et al., 2004) e de plaquetas (Bruno et al., 2005) em resposta às ações do hormônio tireoideano, que, entre outras ações, promove o aumento da pressão arterial. Finalmente, sugerimos também a modulação das atividades de hidrólise de nucleotídeos pelos hormônios ovarianos em soro e em plaquetas de ratos (Pochmann et al., 2005, Pochmann et al., 2004).

No presente trabalho, buscamos avaliar as implicações sobre a sinalização purinérgica em um contexto de hipertensão arterial induzida pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico (através da administração de L-NAME). A seguir, serão discutidos os principais resultados encontrados neste estudo.

1. Sinalização Purinérgica Cardiovascular na Hipertensão Arterial Induzida por L-NAME

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial e poligênica que envolve complexas interações entre mecanismos homeostáticos, os quais são determinados geneticamente e por fatores ambientais (Lerman et al., 2005). Esta patologia pode frequentemente coexistir com outras anormalidades, como aberrações na função plaquetária por exemplo, o que desempenha um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose (Duhamel et al., 2007). Portanto, o objetivo de uma terapia anti-hipertensiva eficiente consiste não somente em reduzir os níveis de pressão arterial, mas também em tratar seus fatores de risco associados.

A modulação da razão nucleotídeos/ nucleosídeos na circulação tem um impacto relevante sobre o controle da pressão arterial. O resultado líquido do balanço entre os fatores dilatadores e constritores direciona a modulação da pressão sanguínea pela sinalização purinérgica. Neste sentido, o ATP, o ADP e o UTP, atuando sobre os purinoceptores endoteliais, levam à produção de fatores vasodilatadores, enquanto que a ligação destas moléculas a receptores purinérgicos presentes nas VSMC, acarreta a formação de fatores constritores (Erlinge & Burnstock, 2008).

No primeiro capítulo desta Tese, verificamos um aumento significativo na pressão arterial sistólica de ratos tratados com L-NAME (30 mg/Kg/dia por 14 dias) (Capítulo I, Figura 1), exatamente como demonstrado previamente (Balbinott et al., 2005). Verificamos também um aumento no valor do índice de peso do ventrículo esquerdo (LVWI) (Capítulo I, Tabela 1), o qual parece indicar uma hipertrofia cardíaca devido ao aumento da massa muscular do miocárdio, consistente com dados já relatados de hipertrofia associada ao aumento da pressão arterial (Doggrell & Brown, 1998). As hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro e plaquetas de animais hipertensos foram diminuídas após o tratamento com L-NAME (Capítulo I, Figuras 2 e 3), o que poderia resultar em um aumento na agregação plaquetária pelo acúmulo de ADP e diminuição na produção de adenosina. Entretanto, apenas uma tendência ao aumento da agregação foi constatada nas plaquetas dos animais hipertensos (Capítulo I, Figura 4). Todos os parâmetros avaliados, isto é, a pressão arterial, as hidrólises de nucleotídeos e os índices cardíacos, retornaram aos valores de controle nos experimentos realizados 7 dias após a parada do tratamento com L-NAME (Capítulo I, Figura 1 e Tabela 1). Adicionalmente, verificamos que o L-NAME administrado *in vitro* não exerceu qualquer efeito direto sobre o metabolismo das purinas em soro e plaquetas (Capítulo I, Tabela 2), o que poderia sugerir que os resultados observados não se devem a um efeito próprio da droga.

Entretanto, estudos adicionais se fazem necessários para ratificar a contribuição do L-NAME *per se*, da condição hipertensiva ou de ambos para as respostas observadas. Assim, corresponde a um objetivo futuro, o desenvolvimento de um protocolo de indução de hipertensão arterial pelo L-NAME associado ao uso de uma droga anti-hipertensiva que não interaja com a via do óxido nítrico.

Sabe-se que o catabolismo das purinas pode apresentar-se descompensado em diversas situações patológicas, incluindo a hipertensão arterial. Um estudo com ratos diabéticos por estreptozotocina mostrou que os níveis de ATP estavam diminuídos, enquanto que os níveis de adenosina e hipoxantina estavam aumentados nos eritrócitos destes animais (Dudzinska & Hlynczak, 2004). Além disso, os níveis de hipoxantina e ácido úrico estiveram aumentados no soro de indivíduos obesos quando comparados ao grupo controle, o que poderia acarretar dano aos órgãos devido à formação de radicais livres (Saiki et al., 2001). Com relação à hipertensão, desde muito tempo o ácido úrico tem sido considerado como um fator causador do aumento da pressão arterial (Mahomed, 1879), e uma dieta pobre em purinas foi sugerida como uma maneira de prevenir a hipertensão e as doenças vasculares (Haig, 1889). Além disso, os níveis plasmáticos de hipoxantina mostraram-se diminuídos em pacientes com hipertensão essencial submetidos ao exercício (Kinugawa et al., 2001).

Embora as hidrólises dos nucleotídeos em soro e plaquetas de animais tratados com L-NAME estivessem diminuídas, surpreendentemente, os níveis séricos de ADP, AMP e hipoxantina também apresentaram-se reduzidos nestes animais (Capítulo I, Tabela 3). A diminuição nos níveis de purinas circulantes pode ser interpretada como mais um fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão, uma vez que estaria diminuída a produção de fatores dilatadores por estas moléculas. Por outro lado, o descompasso encontrado entre as atividades enzimáticas e os níveis de purinas circulantes, também pode ser visto como um

mecanismo compensatório para evitar a agregação plaquetária (pela remoção do ADP) e a aterosclerose que são amplamente relatadas em casos de hipertensão (Pravenec et al., 1992). Neste último contexto, a NTPDase1 teria um importante papel, uma vez que é a principal enzima presente na parede dos vasos sanguíneos (Sevigny et al., 2002) e um acréscimo na sua atividade, por exemplo, poderia remover o ADP circulante.

A NTPDase1 é a principal enzima responsável pela hidrólise dos nucleotídeos na superfície dos vasos sanguíneos (Kaczmarek et al., 1996, Sevigny et al., 1997) e o seu destacado papel na prevenção da trombose foi confirmado em animais deficientes para esta enzima (camundongos *Entpd1^{-/-}*), os quais exibiram distúrbios na hemostasia e na trombogênese (Enjyoji et al., 1999). Entretanto, a modulação positiva da expressão desta enzima tem sido relatada apenas em situações bastante específicas, como por exemplo no endotélio pós-hipóxia (Eltzschig et al., 2003), em linfócitos B e em plaquetas de humanos submetidos ao exercício vigoroso (Coppola et al., 2005), em diferentes áreas cerebrais pós lesão cortical (Nedeljkovic et al., 2006), em humanos com doença pancreática (Kunzli et al., 2007) e em células epiteliais da retina de humanos quando da estimulação dos receptores P2Y₁ (Lu et al., 2007).

A investigação sobre a possibilidade de modulação da expressão da NTPDase1 pelo óxido nítrico (NO) em células endoteliais (EC) e em células musculares lisas vasculares (VSMC) poderia contribuir para o esclarecimento da hipótese de que esta enzima tem sua expressão aumentada nos animais tratados com L-NAME. Um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa mostrou que o metabolismo *in vitro* de ATP, ADP e AMP foi diminuído pelo nitroprussiato de sódio, um doador de NO, em sinaptossoma de hipocampo de ratos (Kirchner et al., 2001). Os nucleotídeos extracelulares têm sido implicados na ativação da óxido nítrico endotelial (eNOS), levando à geração de NO e, conseqüentemente, à

vasodilatação (Burnstock, 2006b). A busca pelos mecanismos intracelulares envolvidos neste processo mostrou que a ativação dos receptores P2Y em EC pelos nucleotídeos leva ao aumento dos níveis de cálcio intracelular, à ativação da PKC δ e, finalmente, à fosforilação da eNOS no resíduo de serina-1177 (da Silva et al., 2009). Considerando o acima exposto e os dados obtidos no primeiro capítulo desta Tese, se a expressão da enzima NTPDase1 na superfície dos vasos estiver aumentada nos animais hipertensos, explicando o descompasso encontrado entre a hidrólise dos nucleotídeos em soro e plaquetas e os níveis de purinas circulantes, ao mesmo tempo em que deixa de promover uma vasodilatação local via produção de NO, também diminui as possibilidades de agregação plaquetária, o que é um fenômeno bastante perigoso em casos de hipertensão.

Um outro aspecto desta patologia sobre a sinalização purinérgica abordado neste estudo concerne ao dimorfismo sexual existente no aumento da pressão arterial. Como descrito no capítulo III desta Tese, diversos estudos têm relatado que a incidência e a severidade da hipertensão arterial são menores em mulheres do que em homens (Schenck-Gustafsson, 1996), sendo atribuído ao estrógeno um papel cardioprotetor (Hinojosa-Laborde et al., 1999). Alguns estudos descrevem que o sistema purinérgico também está sujeito às diferenças de gênero e às ações dos hormônios gonadais. Neste sentido, um estudo demonstrou um decréscimo nas hidrólises de ATP, ADP e AMP em sinaptossomas hipocâmpais de ratos machos durante a tarefa de esQUIVA inibitória, enquanto que nenhuma alteração nestes parâmetros foi observada em fêmeas (Rucker et al., 2004). O catabolismo de ATP, ADP e AMP foi significativamente diminuído em plaquetas de ratos fêmeas submetidas à remoção dos ovários, sendo que a terapia de reposição hormonal não foi capaz de reverter os resultados encontrados (Pochmann et al., 2004). Por outro lado, a ovariectomia causou um

aumento nas hidrólises dos mesmos substratos em soro de ratos fêmeas, as quais foram diminuídas pela terapia de reposição hormonal (Pochmann et al., 2004).

Ainda que de maneira preliminar, observamos que uma dose maior de L-NAME (50 mg/Kg/dia por 14 dias) foi necessária para induzir o aumento da pressão arterial em todas as fêmeas utilizadas no estudo, uma vez que cerca de 30% dos animais avaliados mostraram-se resistentes ao desenvolvimento da hipertensão quando tratados com 30 mg/Kg/dia de L-NAME pelo mesmo tempo (Capítulo III, Figura 1 e dados não mostrados). Apesar disso, o nível de hipertensão atingido foi o mesmo com ambas as doses administradas (Capítulo III, Figura 1).

Quando comparadas aos seus controles, as fêmeas não exibiram hipertrofia cardíaca associada ao aumento da pressão arterial. O L-NAME (em ambas as doses administradas) não alterou os níveis séricos de creatinina e as hidrólises dos nucleotídeos (avaliadas em soro sanguíneo e em sinaptossoma cardíaco) também não foram modificadas (Capítulo III, Figuras 2, 3 e 4). Portanto, de maneira geral, quando comparadas aos ratos machos tratados com L-NAME (dados apresentados no capítulo 1), embora tenham desenvolvido hipertensão arterial, as fêmeas parecem estar protegidas no que tange aos aspectos da sinalização purinérgica. Porém, faz-se necessária a continuidade deste projeto para a confirmação dos resultados obtidos até agora e para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos em um possível dimorfismo sexual relativo à sinalização purinérgica em uma situação de hipertensão arterial.

2. Sinalização Purinérgica Renal na Hipertensão Arterial Induzida por L-NAME

Os rins são importantes órgãos reguladores e excretadores, contribuindo para a manutenção da homeostasia de fluidos e eletrólitos, uma vez que adaptam a função renal às necessidades corporais (Vallon, 2008). A regulação da pressão arterial está diretamente sob influência renal, já que estes órgãos estão diretamente comprometidos com o controle do volume extracelular (Rodrigues et al., 2006). Além disso, suas funções são desempenhadas em conjunto com os sistemas cardiovascular, endócrino e sistema nervoso central (Berne et al., 2004).

Os rins apresentam-se constituídos por diferentes tipos celulares e o ATP pode ser liberado por praticamente todas as células renais, sendo encontrado no fluido tubular e na urina final (Schwiebert, 2001, Vekaria et al., 2006b). O ATP tem sido apontado como o principal regulador autócrino e parácrino da reatividade da microvasculatura pré-glomerular, através da constrição das arteríolas aferentes via receptores P2X e P2Y (Inscho, 2001a, Inscho et al., 1992). A adenosina, por sua vez, exerce uma resposta bifásica de vasodilatação e vasoconstrição através da ativação dos receptores A_{2A} e A_1 , respectivamente (Osswald et al., 1982). Os purinoceptores estão substancialmente presentes em diferentes regiões do néfron, do glomérulo e do sistema vascular renal, incluindo os subtipos envolvidos na regulação da secreção de renina, na filtração glomerular e no transporte de água, íons, nutrientes e toxinas (Bailey et al., 2004, Shirley et al., 2005, Unwin et al., 2003). Em conformidade com a expressão dos purinoceptores, as ectonucleotidases são também diferencialmente expressas ao longo do néfron de ratos e controlam a ativação dos receptores de nucleotídeos e nucleosídeos (Vekaria et al., 2006a).

No capítulo II do presente estudo, mostramos que há um aumento nas hidrólises de ATP, ADP, AMP e 5'TMP em membranas renais de ratos submetidos ao tratamento com L-NAME (30 mg/Kg/dia por 14 dias) (Capítulo II, Figura 1). O acréscimo nas atividades foi acompanhado por um aumento no número de transcritos das enzimas NTPDase2, NTPDase3 e NPP3 (Capítulo II, Figura 3). A regulação da atividade das ectonucleotidases pode ocorrer em diferentes níveis, envolvendo modificações transcricionais e/ ou pós-traducionais. Trabalhos prévios da literatura mostram que a atividade das enzimas que hidrolisam nucleotídeos pode ser alterada após a administração de drogas. Em 2007, um estudo mostrou alterações nas hidrólises de ATP, ADP, AMP e 5'TMP em linfócitos e em soro de ratos tratados com LPS, as quais foram acompanhadas por uma mudança nos níveis de transcrição destas enzimas (Vuaden et al., 2007). Um outro trabalho evidenciou que o etanol e o acetoaldeído causaram alterações na atividade e na expressão das NTPDases e da ecto-5'-nucleotidase em membranas cerebrais de peixe-zebra (Rico et al., 2008). Desta maneira, o aumento nas hidrólises de ATP, ADP e 5'TMP pode ser explicado pelo acréscimo encontrado na expressão das enzimas NTPDase2, NTPDase3 e NPP3 em membranas renais de ratos tratados com L-NAME.

Por outro lado, o aumento na hidrólise de AMP em animais hipertensos não foi acompanhado por qualquer alteração no número de transcritos da ecto-5'-nucleotidase. Conforme mencionado anteriormente, as ectonucleotidases podem sofrer diferentes tipos de regulação, incluindo modificações pós-traducionais. Neste sentido, utilizando a ferramenta NetPhosk (disponível em <http://www.cbs.dtu.dk>), verificamos que a sequência da ecto-5'-nucleotidase apresenta pelo menos dois potenciais sítios de fosforilação pela PKC nos resíduos de treonina 432 e 479. Portanto, é provável que a ecto-5'-nucleotidase

em membranas renais de ratos submetidos ao tratamento com L-NAME seja modulada pela PKC, aumentando sua atividade de hidrólise do AMP.

Conforme previamente encontrado para soro e plaquetas (Capítulo I), o L-NAME *in vitro* não causou qualquer efeito direto sobre as atividades das ectonucleotidases de membranas renais nas doses testadas. Além disso, os níveis séricos de creatinina não foram alterados pelo tratamento com L-NAME, indicando que a função renal está preservada no modelo de hipertensão arterial estudado. Os valores de pressão arterial e as atividades das ectonucleotidases retornaram aos níveis de controle, como verificado nos experimentos realizados 7 dias após o término da administração do inibidor da síntese de óxido nítrico (Capítulo II, Figura 2).

De modo geral, os resultados encontrados no capítulo II mostram um aumento global nas atividades das ectonucleotidases de animais hipertensos por L-NAME (30 mg/Kg/dia por 14 dias). Este aumento global aponta para o término da sinalização pelo ATP e para o início da sinalização pela adenosina. O significado biológico para estes dados poderia ser o de conferir um incremento nas respostas autoregulatórias do rim às variações na pressão arterial. Neste sentido, o ATP poderia contribuir para a manutenção da taxa de filtração glomerular, impedindo grandes variações no volume extracelular e garantindo o bom funcionamento dos órgãos, e a sua conversão à adenosina causaria a constrição das arteríolas aferentes, evitando que as alterações na pressão fossem transmitidas ao glomérulo.

3. Sinalização Purinérgica na Regulação do Tônus Vascular

O tônus vascular é o grau de contração sustentada do sistema vascular, o qual regula a resistência periférica e contribui para a carga contra a qual o coração deve bombear o sangue. Desta forma, o coração pode ser denominado como o órgão de ejeção, enquanto que o sistema vascular representa o órgão de recepção do sangue (Ganong, 1995).

O ATP e a adenosina estão bastante envolvidos nos mecanismos que delineiam o controle local do tônus vascular (Burnstock & Ralevic, 1994), a migração, a proliferação, a diferenciação e a morte celular durante a angiogênese, a arteriosclerose e a restenose subsequente à angioplastia (Burnstock, 2002a, Erlinge, 1998). De modo geral, o ATP liberado de nervos simpáticos como um co-transmissor leva à contração da musculatura lisa via receptores P2X; e o ATP liberado de nervos sensorio-motores durante a atividade do arco-reflexo causa a vasodilatação através de receptores P2Y. Além disso, o ADP, o ATP e o UTP que são liberados na circulação pelo rompimento celular, por alterações no fluxo sanguíneo ou em situações de hipóxia, por exemplo, podem ativar os receptores P2Y endoteliais, o que promove o vasorelaxamento através da produção de NO (Burnstock, 2002b). Por sua vez, o efeito geral da adenosina é a vasodilatação através dos receptores A₂, os quais são expressos em praticamente todo o sistema vascular de mamíferos (Ralevic & Burnstock, 2003).

A vasodilatação promovida pela ativação dos purinoceptores de EC envolve a formação dos três maiores fatores dilatadores: NO, prostaciclina e EDHF, dependendo da espécie e do território vascular considerado (Erlinge & Burnstock, 2008). Os receptores P2X₁ e P2X₄ foram recentemente apontados como mediadores do vasorelaxamento induzido pelo ATP em artérias de resistência (Harrington et al., 2007, Yamamoto et al., 2006), enquanto que os receptores P2Y₁ e P2Y₂ são os responsáveis pelo relaxamento induzido por ADP, ATP

e UTP na maioria dos territórios vasculares (Burnstock, 2006b). O capítulo IV desta Tese traz os resultados obtidos durante o período da realização do estágio no exterior, em que se buscou elucidar a contribuição da NTPDase1 e dos receptores purinérgicos endoteliais no vasorelaxamento.

Utilizando-se camundongos deficientes para a enzima NTPDase1 (*Entpd1*^{-/-}), verificamos a virtual ausência das hidrólises de ATP e ADP em seções de aorta e fígado destes animais (Capítulo IV, Anexo 1, Figura 1), corroborando dados previamente descritos na literatura de que a NTPDase1 é a enzima responsável pela degradação dos nucleotídeos na superfície dos vasos (Enjyoji et al., 1999). Adicionalmente, este primeiro resultado fortaleceu a utilização destes animais com um eficiente modelo experimental para avaliar a participação desta enzima em diferentes contextos patofisiológicos. Estudos publicados na literatura têm revelado uma importante função para a NTPDase1 como um agente antitrombogênico (por hidrolisar o ADP) (Enjyoji et al., 1999, Pinsky et al., 2002) e protetor da permeabilidade vascular (Eltzschig et al., 2003, Guckelberger et al., 2004), os quais estão relacionados com sua expressão endotelial. Entretanto, um estudo recém publicado mostrou que esta enzima é também a principal ectonucleotidase na superfície das VSMC e sua ausência aumenta a vasoconstrição dependente dos nucleotídeos (Kauffenstein et al., 2010).

No presente estudo, observamos também uma hipotensão pronunciada nos camundongos *Entpd1*^{-/-} após a injeção intravenosa de ATP e UTP (Capítulo IV, Anexo I, Figura 2). Sabe-se que os nucleotídeos são capazes de causar vasodilatação em diversos leitos vasculares e redução da pressão arterial em diferentes espécies quando administrados *in vivo*. Em camundongos, o ATP e o UTP levam a um decréscimo da pressão arterial sistêmica via AMPc (Shah & Kadowitz, 2002), enquanto que em humanos, o ATP, juntamente com a adenosina, tem sido utilizado na clínica para causar hipotensão durante cirurgias (Agteresch

et al., 1999). Portanto, a ausência da NTPDase1 provavelmente aumentou a disponibilidade dos nucleotídeos na circulação, exacerbando seu efeito vasodilatador e hipotensor.

Os experimentos de reatividade vascular *in vitro*, evidenciaram um aumento no relaxamento dos anéis de aorta de camungos *Entpd1^{-/-}* (Capítulo IV, Anexo I, Figura 3) em resposta ao ADP (agonista do receptor P2Y₁) e ao ATP (agonista do receptor P2Y₂). Quando os análogos não hidrolisáveis de ADP (ADPβS) e de ATP (ATPδS) foram adicionados ao banho orgânico, as respostas foram idênticas, demonstrando que os anéis aórticos oriundos de ambos os genótipos possuem a mesma capacidade de resposta aos estímulos. O fato de os anéis de aorta dos camundongos deficientes para a NTPDase1 apresentarem uma maior vasodilatação ao ADP e ao ATP, indica que esta enzima controla a ativação dos seus receptores específicos P2Y₁ e P2Y₂, os quais já foram apontados como os responsáveis pelo relaxamento em aorta de camundongos (Guns et al., 2005, Guns et al., 2006).

Sabe-se que o receptor P2Y₁ é desensibilizado (tem sua resposta diminuída) na presença do ADP, seu agonista natural (Baurand et al., 2000). Este fenômeno foi particularmente estudado em plaquetas, em que o receptor P2Y₁ parece ser o responsável pela baixa responsividade das plaquetas estocadas (Holme & Holmsen, 1975). Neste trabalho, demonstramos que o receptor P2Y₁ também sofre desensibilização na ausência da enzima NTPDase1 (Capítulo IV, Anexo 1, Figura 4). A prevenção da desensibilização pelas ectonucleotidases, e portanto da resposta desencadeada pelo receptor, já foi descrita em plaquetas. Em 2006, Cauwenberghs e colaboradores publicaram um trabalho mostrando que as plaquetas estocadas no seu plasma de origem têm a funcionalidade dos seus receptores preservada pelas atividades ectonucleotidases plasmáticas, o que é de particular interesse para os bancos de estoque de sangue e plaquetas (Cauwenberghs et al., 2006). No nosso estudo,

não observamos dessensibilização do receptor P2Y₂, o que sugere uma regulação diferencial da NTPDase1 em relação aos dois receptores.

As plaquetas desempenham um importante papel na manutenção da integridade vascular (Zucker & Nachmias, 1985). Considerando-se que, sob ativação, estes fragmentos citoplasmáticos são capazes de produzir e liberar substâncias que afetam o tônus vascular, incluindo nucleotídeos, um outro objetivo proposto durante o estágio no exterior foi o de avaliar a contribuição dos receptores P2Y endoteliais (P2Y_{1,2} e ₆) específicos e da NTPDase1 no vasorelaxamento. Esta avaliação representa uma outra abordagem sobre a participação da sinalização purinérgica na regulação do tônus vascular.

Embora o projeto ainda não esteja concluído, os resultados da padronização (Capítulo IV, Anexo II, Figuras 1 a 4) indicam que as plaquetas podem ser obtidas, lavadas e ativadas com êxito. Adicionalmente, as plaquetas podem ser concentradas e manter-se responsivas por um longo período de tempo de modo que, ao serem ativadas, liberam uma quantidade de nucleotídeos suficiente para a ativação dos receptores P2 endoteliais (na ordem de μM), como verificado em experimentos preliminares de reatividade vascular utilizando anéis aórticos de camundongos.

Antagonistas do receptor P2Y₁₂, ticlopidina e clopidogrel, já são largamente utilizados na clínica como agentes anti-trombóticos (Gachet, 2008). Além disso, o receptor P2Y₁ tem sido sugerido com um alvo potencial para o desenvolvimento de novos compostos antiplaquetários (Gachet, 2008). Portanto, a realização completa do projeto poderá impactar de maneira relevante na utilização de antagonistas dos receptores purinérgicos como agentes antiplaquetários, em termos da sua repercussão sobre o tônus vascular.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente Tese permitem concluir que:

1. A hipertensão arterial induzida por L-NAME (30 mg/Kg/dia por 14 dias) influencia a sinalização purinérgica, uma vez que as hidrólises de ATP, ADP e AMP são diminuídas em soro e plaquetas de ratos hipertensos pela administração do inibidor da síntese de óxido nítrico e este efeito desaparece com o término do tratamento e com o retorno dos níveis de pressão arterial aos valores normais. Além disso, as hidrólises de ATP, ADP, AMP e 5'TMP são aumentadas em membranas renais de ratos submetidos ao tratamento com L-NAME e este aumento é acompanhado pela modulação transcricional das enzimas NTPDase2, NTPDase3 e NPP3 e pelo potencial aumento na fosforilação da ecto-5'-nucleotidase;
2. Os resultados obtidos com fêmeas não seguem o mesmo padrão de resposta no que concerne às hidrólises de nucleotídeos observadas em machos;
3. A sinalização purinérgica participa da regulação do tônus vascular, uma vez que a NTPDase1 é capaz de regular o vasorelaxamento dependente dos nucleotídeos, controlando a disponibilidade dos agonistas, bem como modulando diferentemente a ativação dos receptores endoteliais P2Y₁ e P2Y₂;
4. A padronização da metodologia para a avaliação da participação dos receptores endoteliais específicos (P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₆), assim como da NTPDase1, no vasorelaxamento dependente do conteúdo liberado pelas plaquetas sob ativação representa uma nova abordagem na regulação purinérgica sobre o tônus vascular.

Considerando-se que a eficiência da terapia anti-hipertensiva consiste em diminuir os níveis de pressão sanguínea e também no tratamento dos fatores de risco associados à hipertensão, concluímos que a sinalização por nucleotídeos deve ser considerada na terapêutica desta patologia. Isto tem particular relevância quando se leva em conta que os componentes da sinalização purinérgica estão presentes em todos os sistemas biológicos animais e muitos deles já têm sido manipulados na clínica. Soma-se a isto, a importância atribuída a esta sinalização em patamar semelhante a de reguladores clássicos da patofisiologia cardiovascular, como os sistemas simpático e renina-angiotensina-aldosterona. A escassez de agonistas e antagonistas seletivos para os diferentes subtipos de receptores purinérgicos, assim como a falta de inibidores específicos para as ectonucleotidases, limita de maneira considerável a utilização de terapias purinérgicas na rotina clínica. Por outro lado, também consolida um campo fértil de investigação, o qual se mostra bastante promissor como uma nova abordagem no tratamento das doenças cardiovasculares.

PERSPECTIVAS

- Avaliar se a NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase podem ser moduladas pelo óxido nítrico em culturas primárias de células endoteliais e células musculares vasculares lisas;
- Determinar os níveis de adenosina por HPLC nos rins dos animais hipertensos pela administração de L-NAME (30 mg/Kg/dia por 14 dias);
- Analisar o perfil de hidrólise dos nucleotídeos em membranas renais de ratos fêmeas submetidas ao tratamento com L-NAME em duas diferentes doses (30 e 50 mg/Kg/dia por 14 dias);
- Avaliar o desenvolvimento da hipertensão arterial por L-NAME em resposta às flutuações hormonais em ratos fêmeas;
- Elucidar a participação do estrógeno na sinalização purinérgica em plaquetas, soro, membranas renais e sinaptossoma cardíaco de ratos fêmeas submetidas à hipertensão pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico através de cirurgia para remoção dos ovários (ovariectomia) e terapia de reposição hormonal;
- Determinar a contribuição dos receptores endoteliais P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₆ e da NTPDase1 no vasorelaxamento dependente da ativação plaquetária, utilizando o protocolo descrito no anexo II do capítulo IV desta Tese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbracchio, M.P., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M.T., King, B.F., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A. and Burnstock, G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci*, 24 (2): 52-55 (2003).

Agteresch, H.J., Dagnelie, P.C., van den Berg, J.W. and Wilson, J.H. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs*, 58 (2): 211-232 (1999).

Ahmad, S., Ahmad, A., Ghosh, M., Leslie, C.C. and White, C.W. Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress. *J Biol Chem*, 279 (16): 16317-16325 (2004).

Aloyo, V.J., McIlvain, H.B., Bhavsar, V.H. and Roberts, J. Characterization of norepinephrine accumulation by a crude synaptosomal-mitochondrial fraction isolated from rat heart. *Life Sci*, 48 (13): 1317-1324 (1991).

Andre, P., Delaney, S.M., LaRocca, T., Vincent, D., DeGuzman, F., Jurek, M., Koller, B., Phillips, D.R. and Conley, P.B. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest*, 112 (3): 398-406 (2003).

Bailey, M.A., Turner, C.M., Hus-Citharel, A., Marchetti, J., Imbert-Teboul, M., Milner, P., Burnstock, G. and Unwin, R.J. P2Y receptors present in the native and isolated rat glomerulus. *Nephron Physiol*, 96 (3): p79-90 (2004).

Balbinott, A.W., Irigoyen, M.C., Brasileiro-Santos Mdo, S., Zottis, B., de Lima, N.G., Passaglia, J. and Schaan, B.D. Dose-dependent autonomic dysfunction in chronic L-NAME-hypertensive diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 46 (5): 563-569 (2005).

Barreto-Chaves, M.L., Carneiro-Ramos, M.S., Cotomacci, G., Junior, M.B. and Sarkis, J.J. E-NTPDase 3 (ATP diphosphohydrolase) from cardiomyocytes, activity and expression are modulated by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol*, 251 (1-2): 49-55 (2006).

Baurand, A., Eckly, A., Bari, N., Leon, C., Hechler, B., Cazenave, J.P. and Gachet, C. Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thromb Haemost*, 84 (3): 484-491 (2000).

Belli, S.I., van Driel, I.R. and Goding, J.W. Identification and characterization of a soluble form of the plasma cell membrane glycoprotein PC-1 (5'-nucleotide phosphodiesterase). *Eur J Biochem*, 217 (1): 421-428 (1993).

Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen, B.M. and Stanton, B.A. Elementos da função renal. In: (ed). *Fisiologia*. Elsevier, Rio de Janeiro.

Bhagwat, S.S., Hamann, P.R., Still, W.C., Bunting, S. and Fitzpatrick, F.A. Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂. *Nature*, 315 (6019): 511-513 (1985).

Boarder, M.R. and Hourani, S.M. The regulation of vascular function by P₂ receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 19 (3): 99-107 (1998).

Boarder, M.R., Turner, J.T., Erb, L. and Weisman, G.A. Classification of P₂ purinoceptors. Not all G protein-coupled P₂ purinoceptors can be classed as P₂Y. *Trends Pharmacol Sci*, 15 (8): 280-281 (1994).

Bodin, P. and Burnstock, G. Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol*, 38 (6): 900-908 (2001).

Bogdanov, Y.D., Dale, L., King, B.F., Whittock, N. and Burnstock, G. Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos. *J Biol Chem*, 272 (19): 12583-12590 (1997).

Bohmer, A.E., Furstenau, C.R., Torres, I.L., Crema, L., Battastini, A.M., Dalmaz, C., Ferreira, M.B. and Sarkis, J.J. The effect of stress upon hydrolysis adenine nucleotides in blood serum of rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 75 (2): 467-471 (2003).

Bohmer, A.E., Pochmann, D. and Sarkis, J.J. In vitro effect of homocysteine on nucleotide hydrolysis by blood serum from adult rats. *Chem Biol Interact*, 160 (2): 159-164 (2006).

Bollen, M., Gijssbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W. and Stefan, C. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35 (6): 393-432 (2000).

Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N. and Dagnelie, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, 112 (2): 358-404 (2006).

Bradford, M.M. 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).

Brock, J.A. and Van Helden, D.F. Enhanced excitatory junction potentials in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch*, 430 (6): 901-908 (1995).

Bruno, A.N., Pochmann, D., Ricachenevsky, F.K., Bonan, C.D., Barreto-Chaves, M.L. and Freitas Sarkis, J.J. 5'-nucleotidase activity is altered by hypo- and hyperthyroidism in platelets from adult rats. *Platelets*, 16 (1): 25-30 (2005).

Bucheimer, R.E. and Linden, J. Purinergic regulation of epithelial transport. *J Physiol*, 555 (Pt 2): 311-321 (2004).

Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 24 (3): 509-581 (1972).

Burnstock, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22 (3): 364-373 (2002a).

Burnstock, G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin Med*, 2 (1): 45-53 (2002b).

Burnstock, G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1 S172-181 (2006a).

Burnstock, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev*, 58 (1): 58-86 (2006b).

Burnstock, G. Vessel tone and remodeling. *Nat Med*, 12 (1): 16-17 (2006c).

Burnstock, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*, 87 (2): 659-797 (2007).

Burnstock, G. Purinergic regulation of vascular tone and remodelling. *Auton Autacoid Pharmacol*, 29 (3): 63-72 (2009).

Burnstock, G. and Kennedy, C. A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent. *Circ Res*, 58 (3): 319-330 (1986).

Burnstock, G. and Knight, G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*, 240 31-304 (2004).

Burnstock, G. and Ralevic, V. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *Br J Plast Surg*, 47 (8): 527-543 (1994).

Burrell, H.E., Wlodarski, B., Foster, B.J., Buckley, K.A., Sharpe, G.R., Quayle, J.M., Simpson, A.W. and Gallagher, J.A. Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface. *J Biol Chem*, 280 (33): 29667-29676 (2005).

Carneiro-Ramos, M.S., da Silva, V.B., Coutinho, M.B., Jr., Battastini, A.M., Sarkis, J.J. and Barreto-Chaves, M.L. Thyroid hormone stimulates 5'-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem*, 265 (1-2): 195-201 (2004).

Castrop, H. Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)*, 189 (1): 3-14 (2007).

Cauwenberghs, S., Feijge, M.A., Hageman, G., Hoylaerts, M., Akkerman, J.W., Curvers, J. and Heemskerk, J.W. Plasma ectonucleotidases prevent desensitization of purinergic receptors in stored platelets: importance for platelet activity during thrombus formation. *Transfusion*, 46 (6): 1018-1028 (2006).

Cazenave, J.P., Hemmendinger, S., Beretz, A., Sutter-Bay, A. and Launay, J. [Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. Methodology]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 41 (3): 167-179 (1983).

Chan, C.M., Unwin, R.J. and Burnstock, G. Potential functional roles of extracellular ATP in kidney and urinary tract. *Exp Nephrol*, 6 (3): 200-207 (1998).

Chan, K.M., Delfert, D. and Junger, K.D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*, 157 (2): 375-380 (1986).

Chen, Y.F. Sexual dimorphism of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 5 (2): 181-185 (1996).

Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E. and Shaul, P.W. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest*, 103 (3): 401-406 (1999).

Chobanian, A.V., Bakris, G.L., Black, H.R., Cushman, W.C., Green, L.A., Izzo, J.L., Jr., Jones, D.W., Materson, B.J., Oparil, S., Wright, J.T., Jr. and Roccella, E.J. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*, 289 (19): 2560-2572 (2003).

Cohen, J.D. Overview of physiology, vascular biology, and mechanisms of hypertension. *J Manag Care Pharm*, 13 (5 Suppl): S6-8 (2007).

Communi, D., Janssens, R., Suarez-Huerta, N., Robaye, B. and Boeynaems, J.M. Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell Signal*, 12 (6): 351-360 (2000).

Coppola, A., Coppola, L., dalla Mora, L., Limongelli, F.M., Grassia, A., Mastrolorenzo, L., Gombos, G. and Lucivero, G. Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. *J Appl Physiol*, 98 (4): 1414-1419 (2005).

Cori, C.F. Some highlights of the early period of bioenergetics. *Mol Cell Biochem*, 5 (1-2): 47-53 (1974).

da Silva, C.G., Specht, A., Wegiel, B., Ferran, C. and Kaczmarek, E. Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circulation*, 119 (6): 871-879 (2009).

De Mey, J.G. and Vanhoutte, P.M. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol*, 316 347-355 (1981).

Demel, S.L. and Galligan, J.J. Impaired purinergic neurotransmission to mesenteric arteries in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*, 52 (2): 322-329 (2008).

Di Virgilio, F. and Solini, A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 135 (4): 831-842 (2002).

Ding, Y.A. Thrombogenic and lipid risk factors in hypertension and coronary artery disease. *Jpn Circ J*, 60 (2): 75-84 (1996).

Doggrell, S.A. and Brown, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*, 39 (1): 89-105 (1998).

Drummond, M. and Barros, M. Social Inequalities in Adult Mortality in São Paulo city. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2 (1/2): 34 - 49 (1999).

Drury, A.N. and Szent-Gyorgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, 68 (3): 213-237 (1929).

Duan, R.D., Bergman, T., Xu, N., Wu, J., Cheng, Y., Duan, J., Nelander, S., Palmberg, C. and Nilsson, A. Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family. *J Biol Chem*, 278 (40): 38528-38536 (2003).

Dudzinska, W. and Hlynczak, A.J. Purine nucleotides and their metabolites in erythrocytes of streptozotocin diabetic rats. *Diabetes Metab*, 30 (6): 557-567 (2004).

Duhamel, T.A., Xu, Y.J., Arneja, A.S. and Dhalla, N.S. Targeting platelets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets*, 11 (12): 1523-1533 (2007).

Eaker, E.D., Chesebro, J.H., Sacks, F.M., Wenger, N.K., Whisnant, J.P. and Winston, M. Cardiovascular disease in women. *Circulation*, 88 (4 Pt 1): 1999-2009 (1993).

Eltzschig, H.K., Ibla, J.C., Furuta, G.T., Leonard, M.O., Jacobson, K.A., Enjyoji, K., Robson, S.C. and Colgan, S.P. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med*, 198 (5): 783-796 (2003).

Enjyoji, K., Sevigny, J., Lin, Y., Frenette, P.S., Christie, P.D., Esch, J.S., 2nd, Imai, M., Edelberg, J.M., Rayburn, H., Lech, M., Beeler, D.L., Csizmadia, E., Wagner, D.D., Robson, S.C. and Rosenberg, R.D. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med*, 5 (9): 1010-1017 (1999).

Erlinge, D. Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol*, 31 (1): 1-8 (1998).

Erlinge, D. and Burnstock, G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal*, 4 (1): 1-20 (2008).

Evans, R.J., Lewis, C., Virginio, C., Lundstrom, K., Buell, G., Surprenant, A. and North, R.A. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol*, 497 (Pt 2) 413-422 (1996).

Fontella, F.U., Bruno, A.N., Balk, R.S., Rucker, B., Crema, L.M., Correa, M.D., Battastini, A.M., Sarkis, J.J., Alexandre Netto, C. and Dalmaz, C. Repeated stress effects on nociception

and on ectonucleotidase activities in spinal cord synaptosomes of female rats. *Physiol Behav*, 85 (2): 213-219 (2005).

Forstermann, U., Mugge, A., Bode, S.M. and Frolich, J.C. Response of human coronary arteries to aggregating platelets: importance of endothelium-derived relaxing factor and prostanoids. *Circ Res*, 63 (2): 306-312 (1988).

Furchgott, R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res*, 53 (5): 557-573 (1983).

Furstenau, C.R., Trentin Dda, S., Barreto-Chaves, M.L. and Sarkis, J.J. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets*, 17 (2): 84-91 (2006).

Furstenau, C.R., Trentin Dda, S., Gossenheimer, A.N., Ramos, D.B., Casali, E.A., Barreto-Chaves, M.L. and Sarkis, J.J. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood Cells Mol Dis*, 41 (2): 223-229 (2008).

Furstenau, C.R., Trentin, D.S., Barreto-Chaves, M.L. and Sarkis, J.J. The effects of angiotensin II and genetic hypertension upon extracellular nucleotide hydrolysis by rat platelet ectoenzymes. *Thromb Res*, 120 (6): 877-884 (2007).

Gachet, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46 277-300 (2006).

Gachet, C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*, 99 (3): 466-472 (2008).

Ganten, U., Schroder, G., Witt, M., Zimmermann, F., Ganten, D. and Stock, G. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens*, 7 (9): 721-726 (1989).

Gerasimovskaya, E.V., Ahmad, S., White, C.W., Jones, P.L., Carpenter, T.C. and Stenmark, K.R. Extracellular ATP is an autocrine/paracrine regulator of hypoxia-induced adventitial fibroblast growth. Signaling through extracellular signal-regulated kinase-1/2 and the Egr-1 transcription factor. *J Biol Chem*, 277 (47): 44638-44650 (2002).

Gitterman, D.P. and Evans, R.J. Nerve evoked P2X receptor contractions of rat mesenteric arteries; dependence on vessel size and lack of role of L-type calcium channels and calcium induced calcium release. *Br J Pharmacol*, 132 (6): 1201-1208 (2001).

Goding, J.W., Grobbs, B. and Slegers, H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta*, 1638 (1): 1-19 (2003).

Gonzalez-Alonso, J., Olsen, D.B. and Saltin, B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. *Circ Res*, 91 (11): 1046-1055 (2002).

Gordon, J.L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*, 233 (2): 309-319 (1986).

Guan, Z., Osmond, D.A. and Inscho, E.W. Purinoceptors in the kidney. *Exp Biol Med* (Maywood), 232 (6): 715-726 (2007).

Guckelberger, O., Sun, X.F., Sevigny, J., Imai, M., Kaczmarek, E., Enjyoji, K., Kruskal, J.B. and Robson, S.C. Beneficial effects of CD39/ecto-nucleoside triphosphate

diphosphohydrolase-1 in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost*, 91 (3): 576-586 (2004).

Guns, P.J., Korda, A., Crauwels, H.M., Van Assche, T., Robaye, B., Boeynaems, J.M. and Bult, H. Pharmacological characterization of nucleotide P2Y receptors on endothelial cells of the mouse aorta. *Br J Pharmacol*, 146 (2): 288-295 (2005).

Guns, P.J., Van Assche, T., Franssen, P., Robaye, B., Boeynaems, J.M. and Bult, H. Endothelium-dependent relaxation evoked by ATP and UTP in the aorta of P2Y2-deficient mice. *Br J Pharmacol*, 147 (5): 569-574 (2006).

Gus, I., Harzheim, E., Zaslavsky, C., Medina, C., Gus, M. Prevalência, reconhecimento e controle da hipertensão arterial sistêmica no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq Bras Cardiol*, 83 (5): 424-428 (2004).

Guyton, A.C., Cowley, A.W., Jr., Young, D.B., Coleman, T.G., Hall, J.E. and DeClue, J.W. Integration and control of circulatory function. *Int Rev Physiol*, 9 341-385 (1976).

Haig, A. On uric acid and arterial tension. *BMJ*, 1 288 - 291 (1889).

Handa, M. and Guidotti, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun*, 218 (3): 916-923 (1996).

Harrington, L.S., Evans, R.J., Wray, J., Norling, L., Swales, K.E., Vial, C., Ali, F., Carrier, M.J. and Mitchell, J.A. Purinergic 2X1 receptors mediate endothelial dependent vasodilation to ATP. *Mol Pharmacol*, 72 (5): 1132-1136 (2007).

Hashimoto, M., Hossain, S., Tanabe, Y. and Shido, O. Effects of aging on the relation of adenylyl purine release with plasma membrane fluidity of arterial endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73 (6): 475-483 (2005).

Hinojosa-Laborde, C., Chapa, I., Lange, D. and Haywood, J.R. Gender differences in sympathetic nervous system regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26 (2): 122-126 (1999).

Hoebertz, A., Arnett, T.R. and Burnstock, G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci*, 24 (6): 290-297 (2003).

Holme, S. and Holmsen, H. ADP-induced refractory state of platelets in vitro. I. Methodological studies on aggregation in platelet rich plasma. *Scand J Haematol*, 15 (2): 96-103 (1975).

Hosoda, N., Hoshino, S.I., Kanda, Y. and Katada, T. Inhibition of phosphodiesterase/pyrophosphatase activity of PC-1 by its association with glycosaminoglycans. *Eur J Biochem*, 265 (2): 763-770 (1999).

Houston, D.S., Shepherd, J.T. and Vanhoutte, P.M. Adenine nucleotides, serotonin, and endothelium-dependent relaxations to platelets. *Am J Physiol*, 248 (3 Pt 2): H389-395 (1985).

Houston, D.S., Shepherd, J.T. and Vanhoutte, P.M. Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated canine coronary arteries. Role of serotonin, thromboxane A₂, and adenine nucleotides. *J Clin Invest*, 78 (2): 539-544 (1986).

Hunsucker, S.A., Mitchell, B.S. and Spychala, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther*, 107 (1): 1-30 (2005).

Inscho, E.W. P2 receptors in regulation of renal microvascular function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280 (6): F927-944 (2001a).

Inscho, E.W. Renal microvascular effects of P2 receptor stimulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28 (4): 332-339 (2001b).

Inscho, E.W., Cook, A.K., Imig, J.D., Vial, C. and Evans, R.J. Renal autoregulation in P2X1 knockout mice. *Acta Physiol Scand*, 181 (4): 445-453 (2004).

Inscho, E.W., Ohishi, K. and Navar, L.G. Effects of ATP on pre- and postglomerular juxtamedullary microvasculature. *Am J Physiol*, 263 (5 Pt 2): F886-893 (1992).

Islim, I.F., Bareford, D., Ebanks, M. and Beevers, D.G. The role of platelets in essential hypertension. *Blood Press*, 4 (4): 199-214 (1995).

Jacobson, K.A. and Gao, Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 5 (3): 247-264 (2006).

Jankowski, V., Tolle, M., Vanholder, R., Schonfelder, G., van der Giet, M., Henning, L., Schluter, H., Paul, M., Zidek, W. and Jankowski, J. Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium- derived vasoconstrictive factor. *Nat Med*, 11 (2): 223-227 (2005).

Jansen, S., Stefan, C., Creemers, J.W., Waelkens, E., Van Eynde, A., Stalmans, W. and Bollen, M. Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. *J Cell Sci*, 118 (Pt 14): 3081-3089 (2005).

Kaczmarek, E., Koziak, K., Sevigny, J., Siegel, J.B., Anrather, J., Beaudoin, A.R., Bach, F.H. and Robson, S.C. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem*, 271 (51): 33116-33122 (1996).

Kahonen, M., Tolvanen, J.P., Sallinen, K., Wu, X. and Porsti, I. Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *Am J Physiol*, 275 (1 Pt 2): H15-22 (1998).

Kataoka, H., Hamilton, J.R., McKemy, D.D., Camerer, E., Zheng, Y.W., Cheng, A., Griffin, C. and Coughlin, S.R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood*, 102 (9): 3224-3231 (2003).

Kauffmanstein, G., Drouin, A., Thorin-Trescases, N., Bachelard, H., Robaye, B., D'Orleans-Juste, P., Marceau, F., Thorin, E. and Sevigny, J. NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. *Cardiovasc Res*, 85 (1): 204-213 (2010).

Kaul, S., Heistad, D.D., Mugge, A., Armstrong, M.L., Piegors, D.J. and Lopez, J.A. Vascular responses to platelet activation in normal and atherosclerotic primates in vivo. *Arterioscler Thromb*, 11 (6): 1745-1751 (1991).

Kaul, S., Padgett, R.C., Waack, B.J., Brooks, R.M. and Heistad, D.D. Effect of atherosclerosis on responses of the perfused rabbit carotid artery to human platelets. *Arterioscler Thromb*, 12 (10): 1206-1213 (1992).

Kaul, S., Waack, B.J., Padgett, R.C., Brooks, R.M. and Heistad, D.D. Interaction of human platelets and leukocytes in modulation of vascular tone. *Am J Physiol*, 266 (5 Pt 2): H1706-1714 (1994).

Kawagushi, H., Sano, H. and Kitabatake, A. Increased mRNA expression of renin-angiotensin system in hypertrophied rat heart. In: Sharma (ed). *Adaptation Biology and Medicine*. Narosa Publishing House, New Delhi.

Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K. and He, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, 365 (9455): 217-223 (2005).

Kinugawa, T., Ogino, K., Osaki, S., Kato, M., Endo, A., Hamada, T., Honami, Y., Igawa, O., Hisatome, I. and Shigemasa, C. Altered purine nucleotide degradation during exercise in patients with essential hypertension. *Metabolism*, 50 (6): 646-650 (2001).

Kirchner, S.M., Bonan, C.D., Battastini, A.M. and Sarkis, J.J. Effect of nitric oxide donors on extracellular ATP, ADP, and AMP catabolism in rat hippocampal synaptosomes. *Brain Res Bull*, 55 (4): 469-473 (2001).

Koszalka, P., Ozuyaman, B., Huo, Y., Zerneck, A., Fogel, U., Braun, N., Buchheiser, A., Decking, U.K., Smith, M.L., Sevigny, J., Gear, A., Weber, A.A., Molojavyi, A., Ding, Z., Weber, C., Ley, K., Zimmermann, H., Godecke, A. and Schrader, J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res*, 95 (8): 814-821 (2004).

Krieger, E., Franchini, K. and Krieger, J. Fisiopatogenia da Hipertensão Arterial. *Medicina*, Riberão Preto, 29 181 - 192 (1996).

Kukulski, F., Levesque, S.A., Lavoie, E.G., Lecka, J., Bigonnesse, F., Knowles, A.F., Robson, S.C., Kirley, T.L. and Sevigny, J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal*, 1 (2): 193-204 (2005).

Kunzli, B.M., Berberat, P.O., Giese, T., Csizmadia, E., Kaczmarek, E., Baker, C., Halaceli, I., Buchler, M.W., Friess, H. and Robson, S.C. Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292 (1): G223-230 (2007).

Laliberte, J.F. and Beaudoin, A.R. Sequential hydrolysis of the gamma- and beta-phosphate groups of ATP by the ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. *Biochim Biophys Acta*, 742 (1): 9-15 (1983).

Lazarowski, E.R., Boucher, R.C. and Harden, T.K. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem*, 275 (40): 31061-31068 (2000).

Lazarowski, E.R., Boucher, R.C. and Harden, T.K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol*, 64 (4): 785-795 (2003).

Lerman, L.O., Chade, A.R., Sica, V. and Napoli, C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med*, 146 (3): 160-173 (2005).

Lerner, D.J. and Kannel, W.B. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J*, 111 (2): 383-390 (1986).

Lessa, I. Epidemiologia Insuficiência Cardíaca e da Hipertensão Arterial Sistêmica no Brasil. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 8 383 -392 (2001).

Lévesque, S. Caractérisation Biochimique des Nucléosides Triphosphates Diphosphohydrolases (NTPDases) et Fonction de la NTPDase1 chez le Macrophage Murin. Département de Microbiologie-Immunologie, Université Laval. Supervisor: Dr. J. Sévigny. 2010, 230 pp.

Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R. and Collins, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, 360 (9349): 1903-1913 (2002).

Lowenstein, C.J. and Michel, T. What's in a name? eNOS and anaphylactic shock. *J Clin Invest*, 116 (8): 2075-2078 (2006).

Lu, W., Reigada, D., Sevigny, J. and Mitchell, C.H. Stimulation of the P2Y1 receptor up-regulates nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase-1 in human retinal pigment epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 323 (1): 157-164 (2007).

Lunkes, G.I., Lunkes, D., Stefanello, F., Morsch, A., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M. and Schetinger, M.R. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res*, 109 (4): 189-194 (2003).

Maffrand, J.P., Bernat, A., Delebasse, D., Defreyn, G., Cazenave, J.P. and Gordon, J.L. ADP plays a key role in thrombogenesis in rats. *Thromb Haemost*, 59 (2): 225-230 (1988).

Mahomed, F. On chronic Bright's disease, and its essential symptoms. *Lancet*, I 399 - 401 (1879).

Malmjsjo, M., Adner, M., Harden, T.K., Pendergast, W., Edvinsson, L. and Erlinge, D. The stable pyrimidines UDPbetaS and UTPgammaS discriminate between the P2 receptors that mediate vascular contraction and relaxation of the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, 131 (1): 51-56 (2000).

Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Islam, N., Pinsky, D.J., Sesti, C. and Levi, R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost*, 1 (12): 2497-2509 (2003).

Marcus, A.J., Safier, L.B., Hajjar, K.A., Ullman, H.L., Islam, N., Broekman, M.J. and Eiroa, A.M. Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells. *J Clin Invest*, 88 (5): 1690-1696 (1991).

McIntyre, M., Hamilton, C.A., Rees, D.D., Reid, J.L. and Dominiczak, A.F. Sex differences in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. *Hypertension*, 30 (6): 1517-1524 (1997).

Meerson, N.R., Delautier, D., Durand-Schneider, A.M., Moreau, A., Schilsky, M.L., Sternlieb, I., Feldmann, G. and Maurice, M. Identification of B10, an alkaline phosphodiesterase of the apical plasma membrane of hepatocytes and biliary cells, in rat serum: increased levels following bile duct ligation and during the development of cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 27 (2): 563-568 (1998).

Meyers, K.M., Holmsen, H. and Seachord, C.L. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol*, 243 (3): R454-461 (1982).

Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43 (2): 109-142 (1991).

Moriwaki, Y., Yamamoto, T. and Higashino, K. Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol*, 14 (4): 1321-1340 (1999).

Motte, S., Communi, D., Piroton, S. and Boeynaems, J.M. Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 27 (1): 1-7 (1995).

Munkonda, M.N., Kauffenstein, G., Kukulski, F., Levesque, S.A., Legendre, C., Pelletier, J., Lavoie, E.G., Lecka, J. and Sevigny, J. Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists. *Biochem Pharmacol*, 74 (10): 1524-1534 (2007).

Navar, L.G., Inscho, E.W., Majid, S.A., Imig, J.D., Harrison-Bernard, L.M. and Mitchell, K.D. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev*, 76 (2): 425-536 (1996).

Nedeljkovic, N., Bjelobaba, I., Subasic, S., Lavrnja, I., Pekovic, S., Stojkov, D., Vjestica, A., Rakic, L. and Stojiljkovic, M. Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats. *Cell Biol Int*, 30 (6): 541-546 (2006).

Neter, J.E., Stam, B.E., Kok, F.J., Grobbee, D.E. and Geleijnse, J.M. Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension*, 42 (5): 878-884 (2003).

Noguchi, K., Ishii, S. and Shimizu, T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem*, 278 (28): 25600-25606 (2003).

North, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82 (4): 1013-1067 (2002).

Ogut, O. and Brozovich, F.V. The potential role of MLC phosphatase and MAPK signalling in the pathogenesis of vascular dysfunction in heart failure. *J Cell Mol Med*, 12 (6A): 2158-2164 (2008).

Olsson, R.A. and Pearson, J.D. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev*, 70 (3): 761-845 (1990).

Oses, J.P., Cardoso, C.M., Germano, R.A., Kirst, I.B., Rucker, B., Furstenau, C.R., Wink, M.R., Bonan, C.D., Battastini, A.M. and Sarkis, J.J. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci*, 74 (26): 3275-3284 (2004).

Osswald, H., Hermes, H.H. and Nabakowski, G. Role of adenosine in signal transmission of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int Suppl*, 12 S136-142 (1982).

Osswald, H., Spielman, W.S. and Knox, F.G. Mechanism of adenosine-mediated decreases in glomerular filtration rate in dogs. *Circ Res*, 43 (3): 465-469 (1978).

Paffenbarger, R.S., Jr., Jung, D.L., Leung, R.W. and Hyde, R.T. Physical activity and hypertension: an epidemiological view. *Ann Med*, 23 (3): 319-327 (1991).

Pinsky, D.J., Broekman, M.J., Peschon, J.J., Stocking, K.L., Fujita, T., Ramasamy, R., Connolly, E.S., Jr., Huang, J., Kiss, S., Zhang, Y., Choudhri, T.F., McTaggart, R.A., Liao, H., Drosopoulos, J.H., Price, V.L., Marcus, A.J. and Maliszewski, C.R. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest*, 109 (8): 1031-1040 (2002).

Plesner, L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol*, 158 141-214 (1995).

Pochmann, D., Bohmer, A.E., Nejar Bruno, A. and Sarkis, J.J. Ecto-hydrolysis of adenine nucleotides in rat blood platelets are altered by ovariectomy. *Platelets*, 16 (6): 334-339 (2005).

Pochmann, D., Rucker, B., Battastini, A.M. and Sarkis, J.J. Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Thromb Res*, 114 (4): 275-281 (2004).

Pravenec, M., Kunes, J., Zicha, J., Kren, V. and Klir, P. Platelet aggregation in spontaneous hypertension: genetic determination and correlation analysis. *J Hypertens*, 10 (12): 1453-1456 (1992).

Ralevic, V. Roles of purines and pyrimidines in endothelium. In: M. P. Abbracchio and M. Williams (ed). *Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 151/II. Purinergic and Pyrimidinergic Signalling II - Cardiovascular, Respiratory, Immune, Metabolic and Gastrointestinal Tract Functions*. Springer, Berlin. 101 - 120.

Ralevic, V. and Burnstock, G. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation*, 84 (1): 1-14 (1991).

Ralevic, V. and Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50 (3): 413-492 (1998).

Ralevic, V. and Burnstock, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect*, 16 (3): 133-140 (2003).

Reckelhoff, J.F. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, 37 (5): 1199-1208 (2001).

Reckelhoff, J.F., Zhang, H. and Granger, J.P. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 31 (1 Pt 2): 435-439 (1998).

Resta, R., Yamashita, Y. and Thompson, L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev*, 161 95-109 (1998).

Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Senger, M.R., de Bem Arizi, M., Dias, R.D., Souto, A.A., Bogo, M.R. and Bonan, C.D. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Neurochem Int*, 52 (1-2): 290-296 (2008).

Roberts, V.H., Webster, R.P., Brockman, D.E., Pitzer, B.A. and Myatt, L. Post-Translational Modifications of the P2X(4) purinergic receptor subtype in the human placenta are altered in preeclampsia. *Placenta*, 28 (4): 270-277 (2007).

Robson, S.C., Sevigny, J. and Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*, 2 (2): 409-430 (2006).

Rodrigues, C., D'Avila, R., Fernandes, F. and Almeida, F. Rim e Hipertensão Arterial. In: Elsevier (ed). *Hipertensão*. Rio de Janeiro. 86 - 93.

Roman, R.M. and Fitz, J.G. Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function. *Gastroenterology*, 116 (4): 964-979 (1999).

Romero, J.C. and Strick, D.M. Nitric oxide and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2 (1): 114-121 (1993).

Rongen, G.A., Floras, J.S., Lenders, J.W., Thien, T. and Smits, P. Cardiovascular pharmacology of purines. *Clin Sci (Lond)*, 92 (1): 13-24 (1997).

Rucker, B., Almeida, M.E., Libermann, T.A., Zerbini, L.F., Wink, M.R. and Sarkis, J.J. Biochemical characterization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP, E.C. 3.1.4.1) from rat heart left ventricle. *Mol Cell Biochem*, 306 (1-2): 247-254 (2007).

Rucker, B., Almeida, M.E., Libermann, T.A., Zerbini, L.F., Wink, M.R. and Sarkis, J.J. E-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings. *Life Sci*, 82 (9-10): 477-486 (2008).

Rucker, B., Pereira, G.S., Furstenau, C.R., Izquierdo, I., Bonan, C.D. and Sarkis, J.J. Inhibitory avoidance task reveals differences in ectonucleotidase activities between male and female rats. *Neurochem Res*, 29 (12): 2231-2237 (2004).

Saiki, S., Sato, T., Kohzuki, M., Kamimoto, M. and Yosida, T. Changes in serum hypoxanthine levels by exercise in obese subjects. *Metabolism*, 50 (6): 627-630 (2001).

Sainz, J., Osuna, A., Wangensteen, R., de Dios Luna, J., Rodriguez-Gomez, I., Duarte, J., Moreno, J.M. and Vargas, F. Role of sex, gonadectomy and sex hormones in the development of nitric oxide inhibition-induced hypertension. *Exp Physiol*, 89 (2): 155-162 (2004).

Sakagami, H., Aoki, J., Natori, Y., Nishikawa, K., Kakehi, Y. and Arai, H. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *J Biol Chem*, 280 (24): 23084-23093 (2005).

Sakura, H., Nagashima, S., Nakashima, A. and Maeda, M. Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thromb Res*, 91 (2): 83-89 (1998).

Salmi, M. and Jalkanen, S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol*, 5 (10): 760-771 (2005).

Schenck-Gustafsson, K. Risk factors for cardiovascular disease in women: assessment and management. *Eur Heart J*, 17 Suppl D 2-8 (1996).

Schulte am Esch, J., 2nd, Sevigny, J., Kaczmarek, E., Siegel, J.B., Imai, M., Koziak, K., Beaudoin, A.R. and Robson, S.C. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. *Biochemistry*, 38 (8): 2248-2258 (1999).

Schwiebert, E.M. ATP release mechanisms, ATP receptors and purinergic signalling along the nephron. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28 (4): 340-350 (2001).

Schwiebert, E.M. and Zsembery, A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1615 (1-2): 7-32 (2003).

Sevigny, J., Levesque, F.P., Grondin, G. and Beaudoin, A.R. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochim Biophys Acta*, 1334 (1): 73-88 (1997).

Sevigny, J., Sundberg, C., Braun, N., Guckelberger, O., Csizmadia, E., Qawi, I., Imai, M., Zimmermann, H. and Robson, S.C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood*, 99 (8): 2801-2809 (2002).

Shah, M.K. and Kadowitz, P.J. Cyclic adenosine monophosphate-dependent vascular responses to purinergic agonists adenosine triphosphate and uridine triphosphate in the anesthetized mouse. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39 (1): 142-149 (2002).

Shapiro, L. and Sugden, P. Left ventricular hypertrophy. In: D. Julian, A. Camm and K. Fox (ed). *Diseases of the heart*. Saunders, London.

Shirley, D.G., Bailey, M.A. and Unwin, R.J. In vivo stimulation of apical P2 receptors in collecting ducts: evidence for inhibition of sodium reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288 (6): F1243-1248 (2005).

Silbernagl, S. and Despopoulos, A. Sistema Cardiovascular. In: (ed). *Fisiologia Texto e Atlas*. Artmed, Porto Alegre. 186 - 221.

Sorensen, C.E. and Novak, I. Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J Biol Chem*, 276 (35): 32925-32932 (2001).

Sprague, R.S., Stephenson, A.H. and Ellsworth, M.L. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. *Trends Endocrinol Metab*, 18 (9): 350-355 (2007).

Spychala, J., Zimmermann, A.G. and Mitchell, B.S. Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter. Role of the camp response element site in mediating repression by the upstream regulatory region. *J Biol Chem*, 274 (32): 22705-22712 (1999).

Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., Manson, J.E., Rosner, B., Speizer, F.E. and Hennekens, C.H. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med*, 325 (11): 756-762 (1991).

Stefan, C., Jansen, S. and Bollen, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci*, 30 (10): 542-550 (2005).

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

Stranges, S., Wu, T., Dorn, J.M., Freudenheim, J.L., Muti, P., Farinaro, E., Russell, M., Nochajski, T.H. and Trevisan, M. Relationship of alcohol drinking pattern to risk of hypertension: a population-based study. *Hypertension*, 44 (6): 813-819 (2004).

Strijdom, H., Chamane, N. and Lochner, A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr*, 20 (5): 303-310 (2009).

Surks, H.K. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circ Res*, 101 (11): 1078-1080 (2007).

Takahashi, N. and Smithies, O. Human genetics, animal models and computer simulations for studying hypertension. *Trends Genet*, 20 (3): 136-145 (2004).

Tamajusuku, A.S., Carrillo-Sepulveda, M.A., Braganhol, E., Wink, M.R., Sarkis, J.J., Barreto-Chaves, M.L. and Battastini, A.M. Activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 are increased by thyroid hormones in vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem*, 289 (1-2): 65-72 (2006).

Thomas, U., Parati, G. Acute stress and long-lasting blood pressure elevation: a possible cause of established hypertension? *J Hypertens*, 23 (2): 261-263 (2005).

Thompson, L.F., Eltzschig, H.K., Ibla, J.C., Van De Wiele, C.J., Resta, R., Morote-Garcia, J.C. and Colgan, S.P. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med*, 200 (11): 1395-1405 (2004).

Torres, I.L., Buffon, A., Dantas, G., Furstenu, C.R., Bohmer, A.E., Battastini, A.M., Sarkis, J.J., Dalmaz, C. and Ferreira, M.B. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 74 (1): 181-186 (2002).

Torres, I.L., Furstenau, C.R., Rossi, G., Dallegrave, E., Dallegrave, G., Stenzel, B., Dantas, G., Battastini, A.M., Sarkis, J.J. and Ferreira, M.B. Methylprednisolone administration alters adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Eur J Pharmacol*, 560 (2-3): 212-215 (2007).

Traut, T.W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem*, 140 (1): 1-22 (1994).

Turner, C.M., Vonend, O., Chan, C., Burnstock, G. and Unwin, R.J. The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study. *Cells Tissues Organs*, 175 (2): 105-117 (2003).

Unwin, R.J., Bailey, M.A. and Burnstock, G. Purinergic signaling along the renal tubule: the current state of play. *News Physiol Sci*, 18 237-241 (2003).

Vallon, V. Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News Physiol Sci*, 18 169-174 (2003).

Vallon, V. P2 receptors in the regulation of renal transport mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294 (1): F10-27 (2008).

Vanhoutte, P.M., Boulanger, C.M., Vidal, M. and Mombouli, J.V. Endothelium-derived mediators and the renin-angiotensin system. In: J. I. S. Robertson and M. G. Nicholls (ed). *The ReninAngiotensin System*. Gower Medical Publishing, London. 29.21 - 29.15.

Vanhoutte, P.M. and Houston, D.S. Platelets, endothelium, and vasospasm. *Circulation*, 72 (4): 728-734 (1985).

Vasan, R.S., Larson, M.G., Leip, E.P., Kannel, W.B. and Levy, D. Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet*, 358 (9294): 1682-1686 (2001).

Vassort, G. Adenosine 5'-triphosphate: a P₂-purinergic agonist in the myocardium. *Physiol Rev*, 81 (2): 767-806 (2001).

Vekaria, R.M., Shirley, D.G., Seigny, J. and Unwin, R.J. Immunolocalization of ectonucleotidases along the rat nephron. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290 (2): F550-560 (2006a).

Vekaria, R.M., Unwin, R.J. and Shirley, D.G. Intraluminal ATP concentrations in rat renal tubules. *J Am Soc Nephrol*, 17 (7): 1841-1847 (2006b).

Vitzthum, H., Weiss, B., Bachleitner, W., Kramer, B.K. and Kurtz, A. Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney Int*, 65 (4): 1180-1190 (2004).

Vollmayer, P., Clair, T., Goding, J.W., Sano, K., Servos, J. and Zimmermann, H. Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur J Biochem*, 270 (14): 2971-2978 (2003).

von Kugelgen, I., Haussinger, D. and Starke, K. Evidence for a vasoconstriction-mediating receptor for UTP, distinct from the P₂ purinoceptor, in rabbit ear artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 336 (5): 556-560 (1987).

Vuaden, F.C., de Paula Cognato, G., Bonorino, C., Bogo, M.R., de Freitas Sarkis, J.J. and Bonan, C.D. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. *Life Sci*, 80 (19): 1784-1791 (2007).

Vuaden, F.C., Furstenau, C.R., Savio, L.E., Sarkis, J.J. and Bonan, C.D. Endotoxemia alters nucleotide hydrolysis in platelets of rats. *Platelets*, 20 (2): 83-89 (2009).

Wang, L., Karlsson, L., Moses, S., Hultgardh-Nilsson, A., Andersson, M., Borna, C., Gudbjartsson, T., Jern, S. and Erlinge, D. P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 40 (6): 841-853 (2002).

Wang, T.F. and Guidotti, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res*, 790 (1-2): 318-322 (1998).

Wangenstein, R., Fernandez, O., Sainz, J., Quesada, A., Vargas, F. and Osuna, A. Contribution of endothelium-derived relaxing factors to P2Y-purinoceptor-induced vasodilation in the isolated rat kidney. *Gen Pharmacol*, 35 (3): 129-133 (2000).

Webb, T.E., Henderson, D., King, B.F., Wang, S., Simon, J., Bateson, A.N., Burnstock, G. and Barnard, E.A. A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y3) activated preferentially by nucleoside diphosphates. *Mol Pharmacol*, 50 (2): 258-265 (1996).

Weiner, C.P., Lizasoain, I., Baylis, S.A., Knowles, R.G., Charles, I.G. and Moncada, S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (11): 5212-5216 (1994).

White, N. and Burnstock, G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 27 (4): 211-217 (2006).

Whitworth, J.A. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens*, 21 (11): 1983-1992 (2003).

Wu, J., Cheng, Y., Palmberg, C., Bergman, T., Nilsson, A. and Duan, R.D. Cloning of alkaline sphingomyelinase from rat intestinal mucosa and adjusting of the hypothetical protein XP_221184 in GenBank. *Biochim Biophys Acta*, 1687 (1-3): 94-102 (2005).

Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Kobayashi, M., Kawamura, K., Masuda, H., Kamiya, A. and Ando, J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X₄-deficient mice. *Nat Med*, 12 (1): 133-137 (2006).

Yang, D., Gluais, P., Zhang, J.N., Vanhoutte, P.M. and Feletou, M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine, ATP and the calcium ionophore A 23187 in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Fundam Clin Pharmacol*, 18 (3): 321-326 (2004).

Yang, S., Cheek, D.J., Westfall, D.P. and Buxton, I.L. Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. *Circ Res*, 74 (3): 401-407 (1994).

Yegutkin, G., Bodin, P. and Burnstock, G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 129 (5): 921-926 (2000).

Yegutkin, G.G. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochemistry (Mosc)*, 62 (6): 619-622 (1997).

Yegutkin, G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*, 1783 (5): 673-694 (2008).

Yegutkin, G.G., Samburski, S.S. and Jalkanen, S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J*, 17 (10): 1328-1330 (2003).

Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takawa, Y. and Shimizu, T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature*, 387 (6633): 620-624 (1997).

Zanfolin, M., Faro, R., Araujo, E.G., Guaraldo, A.M., Antunes, E. and De Nucci, G. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 47 (3): 391-395 (2006).

Zatz, R. and Baylis, C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 32 (6): 958-964 (1998).

Zimmermann, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*, 285 (Pt 2) 345-365 (1992).

Zimmermann, H. Extracellular purine metabolism. *Drug and Development Research*, 39 337 - 352 (1996a).

Zimmermann, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 49 (6): 589-618 (1996b).

Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362 (4-5): 299-309 (2000).

Zimmermann, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug and Development Research*, 52 44 - 56 (2001).

Zucker, M.B. and Nachmias, V.T. Platelet activation. *Arteriosclerosis*, 5 (1): 2-18 (1985).