



Universidade Federal de Pelotas

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção

Dissertação de Mestrado

**Avaliação da atividade das enzimas NTPDase, 5' nucleotidase,
adenosina deaminase e parâmetros de estresse oxidativo em portadores de
Síndrome de Down**

Maurício Machado Ferreira

Pelotas, 2014

Maurício Machado Ferreira

Avaliação da atividade de ectonucleotidases em plaquetas e parâmetros de estresse oxidativo em portadores de Síndrome de Down

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Profa. Dra. Roselia M. Spanevello

Coorientadora: Profa. Dra. Elizandra Braganhol

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira - CRB 10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F383a Ferreira, Mauricio Machado

Avaliação da atividade das enzimas NTPDase, 5' nucleotidase, adenosina deaminase e parâmetros de estresse oxidativo em portadores de Síndrome de Down / Mauricio Machado Ferreira. – 73f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Área de concentração: Bioquímica. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2014. – Orientador Roselia Maria Spanevello; co-orientador Elizandra Braganhol.

Banca Examinadora:



Roselia Maria Spanevello - UFPel (orientadora)



Gabriele Cordenonzi Ghisleni - UCPEL



Giana de Paula Cognato - UFPel

Dedico este trabalho aos meus amigos,
por estarem sempre ao meu lado,
à minha família, por todo o suporte que me deram
e a minha namorada, pelo alento que eu precisei.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, pela ajuda incondicional que me deram durante estes dois anos de caminhada, sem este pilar eu nunca poderia ter chego tão longe.

À todos meus amigos pela companhia e por compreender o tempo que eu dediquei a este trabalho.

À minha namorada, Mariana, que aguentou bravamente as minhas crises, sempre estando disponível para me ajudar.

À minha orientadora Roselia e a minha coorientadora Elizandra, que sempre me aconselharam e não deixaram eu desistir. Obrigado pelas experiências compartilhadas. Vocês são um exemplo de profissional em que irei me espelhar.

À todos os alunos de iniciação científica que trabalharam neste trabalho, sem o empenho de vocês o desenvolvimendo este trabalho seria impossível.

Aos meus colegas do PPGBBio Rodrigo e Elise, pelo tempo que passamos juntos, pela companhia no laboratório e pelo conhecimento que trocamos na elaboração da dissertação.

E, acima de tudo, agradeço a todos as pessoas com Síndrome de Down, que colaboraram com o trabalho e aos seus pais e responsáveis, que autorizaram a participação com a esperança de estarem contribuindo para um melhor entendimento dessa síndrome.

*“Estou aqui de passagem
A vida é uma mala pronta pra viagem
Minha cabeça é minha bagagem
E a estrada é uma velha amiga
Com quem você pode contar”.*
(Beto & Gross, 2005).

Resumo

FERREIRA, Maurício Machado. **Avaliação da atividade das enzimas NTPDase, 5' nucleotidase, adenosina deaminase e parâmetros de estresse oxidativo em portadores de Síndrome de Down**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Alterações nas funções plaquetárias e em parâmetros de estresse oxidativo possuem um importante papel na patogênese da Síndrome de Down (SD). As enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina deaminase (ADA) representam um importante alvo terapêutico uma vez que elas podem alterar os níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina modulando assim várias funções das plaquetas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade de ectonucleotidases e parâmetros de estresse oxidativo em amostras de portadores de SD e de indivíduos saudáveis. A população consistiu de 28 portadores de SD e 28 indivíduos saudáveis como grupo controle. Amostras de sangue (10ml) foram obtidas de cada indivíduo e usadas para a separação de plaquetas e obtenção do soro. Os resultados demonstraram que a atividade da NTPDase foi aumentada quando o ATP foi usado como substrato em plaquetas de portadores de SD quando comparado ao grupo controle ($P<0.05$); entretanto não foram observadas alterações na hidrólise do substrato ADP. Uma diminuição na atividade da 5'-nucleotidase e um aumento na atividade da ADA também foram observadas em plaquetas de portadores de SD quando comparado ao grupo de indivíduos saudáveis ($P<0.05$). Em relação ao estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e o conteúdo total de tióis foi reduzido em soro e a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase foi encontrada aumentada no sangue total de indivíduos com SD em comparação aos controles ($P<0.05$). Estes achados sugerem que as alterações nas ectonucleotidases e nos parâmetros de estresse oxidativo podem contribuir para as disfunções clínicas associadas com a SD.

Palavras Chaves: Síndrome de Down, plaquetas, NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosina deaminase, estresse oxidativo

Abstract

FERREIRA, Maurício Machado. **Evaluation of the activity of enzymes NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase and oxidative stress parameters in patients with Down syndrome.** 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Alterations in the platelets and oxidative stress play a role in the pathogenesis of DS. The NTPDase, 5'- nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) represent an important therapeutic target since they interfere in the extracellular nucleotide pool altering several platelet functions. We evaluated the ectonucleotidase activities and oxidative stress parameters in samples of DS individuals and healthy subjects. The population consisted of 28 subjects with DS and 28 healthy subjects. Ten milliliters of blood was obtained from each subject and used for platelet and serum preparation. The NTPDase activity using ATP as substrate was increased in platelets of DS patients in relation to the control group ($P<0.05$); however, no alterations were observed in the ADP hydrolysis. A decrease in the 5'- nucleotidase activity and an increase in the ADA activity was observed in platelets of DS subjects when compared to healthy individuals ($P<0.05$). Lipid peroxidation and total thiol content was decreased in serum of DS individuals. Furthermore, superoxide dismutase and catalase activities were increased in whole blood of this group ($P<0.05$). These findings suggest that alterations in the ectonucleotidase activities in platelets as well as changes in the oxidative stress parameters may contribute to the clinical features of DS.

Key words: Down syndrome, platelets, NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase, oxidative stress

Lista de Figuras

Figura 1: Mecanismos envolvidos na ativação e agregação plaquetária	24
Figura 2: Vias de liberação de nucleotídeos de adenina para o meio extracelular ...	26
Figura 3: Cascata metabólica de nucleotídeos de adenina	29
Figura 4: Mecanismo enzimático antioxidante.....	35
Figura 5: Superexpressão de certos genes do cromossomo 21, como o SOD1 na SD pode levar ao aumento no estresse oxidativo	36

Lista de Tabelas

Tabela 1: Prevalência de alterações fenotípicas ligadas à Síndrome de Down 19

Tabela 2: Defeitos Cardíacos Congênitos.....20

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADA - Adenosina deaminase

ADP - Difosfato de adenosina

AMP - Monofosfato de adenosina

ATP - Trifosfato de adenosina

CAT - Catalase

CFTR - Regulador de Condutância Transmembrana da Fibrose Cística

CID - Classificação Internacional de Doenças

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FVW - Fator Von Willebrand

NTPDase - Ecto-Nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

P2X₁ - Receptor de trifosfato de adenosina

P2Y₁ - Receptor de difosfato de adenosina

P2Y₁₂ - Receptor purinérgico difosfato de adenosina

SD - Síndrome de Down

SOD - Superóxido Dismutase

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos	16
Objetivo geral	16
Objetivos específicos.....	16
3. Revisão de literatura	17
Síndrome de Down.....	17
Síndrome de Down e alterações cardiovasculares.....	20
Plaquetas	22
Síndrome de Down e alterações plaquetárias	24
Sistema Purinérgico	25
Nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e receptores purinérgicos.....	25
Ectoenzimas.....	28
NTPDases	29
Ecto-5'-Nucleotidase	30
Adenosina Deaminase (ADA).....	32
Estresse oxidativo	33
Radicais Livres e defesas antioxidantes.....	33
Estresse oxidativo e Síndrome de Down	35
4. Manuscrito.....	38
5. Conclusões.....	63
Referências	64

1. Introdução

A Síndrome de Down (SD) é causada pela existência de uma cópia extra total ou parcial do cromossomo 21 e é associada a um fenótipo com várias desordens sistêmicas incluindo alterações cardiovasculares, envelhecimento precoce e disfunções imunológicas (WISEMAN et al., 2009). Dentre estas, os defeitos cardíacos congênitos constituem um fator importante para a saúde desses pacientes, pois são a principal causa de morte neonatal e o principal fator de diminuição da expectativa de vida neste grupo de pessoas (FORMIGARI et al., 2004).

Muitos estudos tem demonstrado alterações relacionadas ao número e a função das plaquetas (BRUWIER & CHANTRAIN, 2012). Tem sido relatado que plaquetas de portadores de SD possuem alterações na membrana (ZUBENKO & HOWLAND, 1988); deficiências nas enzimas mitocondriais (PRINCE et al., 1994); diminuição no conteúdo de cálcio intracelular (MCCOY & SNEDDON, 1984; BEGNI et al., 2003) e alterações na atividade de enzimas ATPases (MC COY & ENNS 1974). O significado clínico dessas alterações nas plaquetas para a SD ainda não é bem esclarecido, porém elas podem estar associadas com a incidência de trombose venosa cerebral descrita nesses indivíduos (TARLACI & SAGDUYU, 2001; RUIZ et al., 2011).

As plaquetas possuem um papel crucial nos mecanismos tromborregulatórios (GATEANO, 2011). Quando há injúria vascular as plaquetas são ativadas para dar início a cascata de coagulação que vai ser responsável pela hemostase (NI & FREEDMAN, 2001). É bem estabelecido na literatura que os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina como o trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) e adenosina exercem vários efeitos nas plaquetas. Após a ativação primária, as plaquetas mobilizam grânulos secretórios internos que liberam no meio extracelular uma alta concentração de ADP que pode se ligar aos receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ de outras plaquetas ativando-as e propagando o efeito de coagulação local (GRESELE et al, 2008). O ATP quando em altas concentrações é um inibidor competitivo dos efeitos mediados pelo ADP, enquanto em baixas concentrações pode se ligar ao receptor P2X₁ (um canal cátion-seletivo para Ca⁺⁺) e permitir um influxo de cálcio, mudando a forma da plaqueta (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997; KUNAPULI et al., 2003). Por outro lado a adenosina possui efeitos antiagregantes, além de ser uma molécula que possui também ação vasodilatadora (ANFOSSI et al., 2002; JOHNSTON-COX & KATYA, 2011).

O controle dos níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos da adenina, bem como da sinalização purinérgica por eles induzida é realizada por enzimas ancoradas na membrana da plaqueta (ZIMMERMANN et al., 2007). Dentre essas enzimas pode-se destacar as NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase) as quais são responsáveis por hidrolisar ATP e ADP até monofosfato de adenosina (AMP). O AMP é convertido a adenosina pela ação da 5'-nucleotidase, enquanto que a enzima adenosina deaminase (ADA) converte a adenosina à inosina (YEGUTKIN, 2008). Muitos estudos têm demonstrado que a

atividade e expressão de ectonucleotidases em plaquetas estão alteradas em muitas situações patológicas (SPANEVERELLO et al., 2010; BAGATINI et al., 2008; ZANINI et al., 2012). Sendo assim, essas enzimas podem ser consideradas importantes alvos terapêuticos uma vez que interferem com o nível de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, interferindo assim com a sinalização por eles induzida (MATHIEU, 2012). No entanto, o papel dessas enzimas em plaquetas de indivíduos com SD ainda não foi estudado.

Além disso, vários estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo possui um papel nas complicações associadas com a SD (LOTT et al., 2011). A alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é responsável por várias ações deletérias, tais como aumento nos níveis da peroxidação lipídica das membranas, aumento na carbonilação de proteínas e danos ao DNA (DONNE et al., 2003). No entanto, a susceptibilidade das células ao dano oxidativo depende do estado da sua defesa antioxidante, a qual é formada por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; SIES, 1997). A defesa antioxidante enzimática é representada principalmente pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), enquanto as defesas antioxidantes não enzimáticas incluem as vitaminas C, E e os compostos orgânicos contendo grupos sulfidrilas (SH) que são denominados de tióis (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Estudos avaliando parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com SD demonstraram níveis elevados da peroxidação lipídica, carbonilação protéica (CASADO et al., 2007; MUCHOVA et al., 2007; ZITNANOVA et al., 2009) e danos ao DNA (ZANA et al., 2006), além de uma diminuição nos níveis de glutathione reduzida

(MUCHOVA et al., 2007). Um aumento na atividade da SOD1, cujo gene se encontra no cromossomo 21, com consequente aumento de da produção de H_2O_2 parece ser um dos fatores associados ao aumento do estresse oxidativo encontrado nesses pacientes. Entretanto, embora inúmeros estudos demonstrem uma associação entre o EROs e o fenótipo de SD, muitos desses dados são controversos e o papel do estresse oxidativo nesta anomalia ainda não está bem estabelecido.

Sendo assim, este trabalho teve o objetivo de avaliar o papel das ectonucleotidases em plaquetas de portadores de SD. Uma vez que o estresse oxidativo contribui para alterações nas funções das plaquetas bem como altera a atividade de ectoenzimas, nesse estudo também foram avaliados alguns marcadores de perfil oxidativo destes pacientes com a finalidade de elucidar mecanismos envolvidos nas alterações plaquetárias descritas nessa alteração genética.

2. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a atividade de ectonucleotidases em plaquetas e marcadores de estresse oxidativo em sangue periférico e soro de portadores de SD e indivíduos saudáveis como grupo controle.

Objetivos específicos

- Determinar a atividade da enzima NTPDase em plaquetas de portadores de SD e indivíduos controles.
- Avaliar a atividade da enzima 5'- nucleotidase em plaquetas de portadores com SD e indivíduos controles.
- Analisar a atividade da enzima adenosina deaminase em plaquetas de portadores de SD e indivíduos controles.
- Determinar os níveis de peroxidação lipídica e o conteúdo total de grupamentos sulfidrilas em soro de portadores de SD e indivíduos controles.
- Analisar a atividade da enzima catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em sangue de portadores de SD e indivíduos controles.

3. Revisão de literatura

Síndrome de Down

A Síndrome de Down (SD) é uma condição genética determinada pela trissomia do cromossomo 21 sendo a alteração cromossômica mais comum em seres humanos e a principal causa de deficiência intelectual na população (BUSCIGLIO et al., 2013). No Brasil a incidência de SD varia entre 1 para 600 até 1 para 800 nascidos vivos, independente da etnia, gênero ou classe social (GUSMÃO et al, 2003).

Essa síndrome foi identificada por John Langdon Down ao estudar um subgrupo grupo de pessoas com retardo mental chamado por ele de mongóis (devido a semelhança com o povo asiático) que compartilhavam características semelhantes. Este conjunto de sinais e sintomas posteriormente foi confirmado como uma síndrome cromossômica que recebeu o seu nome como homenagem (WEIJERMAN & PETER, 2010)

Não existe uma causa única para esta aneuploidia, mas há vários estudos que tentam traçar os fatores de risco, sendo o principal deles associado a idade materna. O envelhecimento natural dos ovócitos aumenta as chances de que, durante a divisão celular, uma célula acabe com três cópias do cromossomo 21.

Outros fatores geralmente estão associados com a exposição materna à genotóxicos (como o fumo) ou alterações hormonais (como anticoncepcionais ou ciclos menstruais irregulares) (GOSH et al., 2011).

A SD tem várias características dismórficas, defeitos congênitos e desordens orgânicas e, dentre essas, os defeitos cardíacos são as mais importantes para a saúde destes pacientes, pois são a principal causa de morte perinatal e o principal fator de diminuição da expectativa de vida desse grupo de pessoas (FORMIGARI et al., 2004).

Em relação ao fenótipo os portadores de SD possuem características peculiares que os tornam parecidos entre si (CORRETER, 2005). Em estudos com 800 indivíduos com SD foram encontradas características fenotípicas como hipotonia, pescoço curto, baixa implantação das orelhas, língua protusa e mãos pequenas com prega simiesca. Outras características fenotípicas encontradas na SD são listadas na tabela 1.

Quanto as características genotípicas podemos distinguir três genótipos diferentes. A SD pode ocorrer através de uma trissomia simples onde ocorre a presença de um cromossomo 21 extra, sendo esta a forma mais comum (97%). Pode ocorrer através de translocação robertsoniana (2%) onde uma parte do cromossomo 21 é anexada a um braço do cromossomo 14, e o mosaico que é a forma mais rara (cerca de 1%) onde um mesmo indivíduo possui células normais e trissômicas em proporções variadas (BITTLES et al., 2006).

Tabela 1: Prevalência de alterações fenotípicas ligadas à Síndrome de Down

Característica	Incidência	Característica	Incidência
Crescimento Lento	100,0%	Microdontia	60,0%
Retardo Mental	99,8%	Nariz em cela	60,0%
Impressões Digitais Atípicas	90,0%	Clinodactilia	52,0%
Separação dos Músculos Abdominais	80,0%	Hérnia umbilical	51,0%
Ligamentos Flexíveis	80,0%	Pescoço curto	50,0%
Hipotonia	80,0%	Mãos curtas	50,0%
Braquicefalia	75,0%	Doenças cardíacas congênitas	45,0%
Genitália Pequena	75,0%	Prega simiesca	45,0%
Prega na Pálpebra	75,0%	Macroglossia	43,0%
Extremidades curtas	70,0%	Prega epicântica	42,0%
Palato Oval	69,0%	Estrabismo	40,0%
Orelhas arredondadas e de baixa implantação	60,0%	Pontos de Brushfield	35,0%

Fonte: CORRETGER, 2005

Na Classificação Internacional de Doenças (CID-10) a SD recebe o código Q – 90 por estar classificada no capítulo Q00 - Q99 das malformações, deformidades e anomalias cromossômicas. Dentro deste capítulo se encontra no grupo Q 90 - Q99 das anomalias cromossômicas e na categoria Q90 da SD. Na categoria Q90 existem os seguintes subgrupos: Q 90.0 - Síndrome de Down, trissomia do 21, por não disjunção meiótica, Q 90.1 - Síndrome de Down, trissomia do 21, mosaicismo por não disjunção mitótica, Q 90. 2 - Síndrome de Down, trissomia 21, translocação e Q 90. 9 - Síndrome de Down, não específica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Síndrome de Down e alterações cardiovasculares

Assim como a síndrome da deleção do 22q11, a síndrome de Noonan, a Síndrome de Turner e a Síndrome de Williams a SD possui um padrão fixo de defeitos cardíacos congênitos, com alta incidência de defeitos no septo e baixa incidência de defeitos como coarctação da aorta (estreitamento desta artéria) e transposição de grandes vasos (quando a aorta e a artéria pulmonar são invertidas no coração). Em dois estudos de cirurgias cardíacas congênitas em pessoas com SD foram encontradas as seguintes prevalências, segundo a tabela 2 (FRID et al 1999; FREEMAN et al, 2008):

Tabela 2: Defeitos Cardíacos Congênitos		
Autores	Frid et al (1999)	Freeman et al (2008)
Número de Pacientes	219	1469
Porcentagem de Defeitos Cardíacos		
Congênitos	48%	44%
Tipo de Defeitos		
Defeitos no Septo Atrioventricular	47%	39%
- Defeito Completo	41%	21%
- Defeitos Parcial	6%	10%
Defeitos no Septo ventricular	33%	43%
Defeitos no Septo Atrial tipo 2	NA	42%
Defeitos no Septo Atrial (Isolado)	8%	8%
Persistência do canal arterial	8%	N/A
Persistência do canal arterial	2%	N/A
Coarctação da Aorta	1%	1%
Tetralogia de Fallot	2%	4%
Outros	8%	3%

Fontes: FRID et al, 1999; FREEMAN et al, 2008.

A Academia Americana de Pediatria recomenda um screening cardíaco em todas as crianças nascidas com SD, pois cerca de 45% desses pacientes apresentam defeitos cardíacos congênitos (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001). A expectativa de vida média, que na década de 40 era de 12 anos, passou atualmente para 60 anos (BITTLES et al., 2006), além disso a mortalidade neonatal e a mortalidade infantil é maior em crianças com SD, principalmente pela presença de defeitos cardíacos (VAN TROTSBURG et al., 2005)

Cirurgias cardíacas corretivas possuem um bom desempenho nestes casos, principalmente quando aplicadas cedo, pois evitam danos pulmonares permanentes (DUFFELS et al., 2009). Estudos recentes mostram que portadores de SD submetidos a cirurgias cardíacas para correção precoce de defeitos atrio-ventriculares possuem uma menor mortalidade e melhor qualidade de vida (FORMIGARI et al., 2004; SAFFIRIO et al., 2008).

Apesar de ter mais chances de doenças cardíacas, os indivíduos com SD possuem um risco muito baixo para a aterosclerose, servindo, inclusive, como modelos livres de aterogênese em algumas pesquisas (MELVILLE et al., 2005). Mesmo o portador de SD tendo um estilo de vida sedentária, má alimentação, e maiores prevalências de obesidade e dislipidemias, apresenta baixos índices de problemas coronarianos e aterogênese, principalmente comparado com outros grupos de doentes mentais (os quais possuem chances maiores de ter problemas coronarianos comparados com pessoas sem problemas mentais) (VAN DEN AKKER & VAN DER MEIJDEN, 2006).

Para explicar esta situação existem várias propostas que envolvem fatores ambientais como baixos índices de fumantes com SD e baixa prevalência de hipertensão, entretanto as hipóteses mais bem aceitas envolvem fatores genéticos, como a superexpressão de fatores de proteção (POGRIBINA et al., 2001).

A principal teoria sobre a baixa aterogênese em indivíduos com SD propõe a superexpressão do gene que produz a enzima cistationina-beta-sintase (presente no cromossomo 21) e que catalisa a conversão de homocisteína (fator pro-aterosclerótico) para cisteína (antioxidante), pode proteger contra danos oxidativos e a formação da placa aterogênica (FALLON et al., 2001).

Plaquetas

Plaquetas são pequenos discos ovais circulantes de aproximadamente 2 μm derivados de fragmentos celulares anucleados provenientes de megacariócitos da medula óssea. A função fisiológica primária das plaquetas é a formação do coágulo sanguíneo para estancar hemorragias em danos vasculares. O coágulo se forma a partir da adesão das plaquetas ao colágeno exposto pelo dano. A agregação ocorre por mediadores como o ADP, tromboxano A₂. A trombina produzida pelas plaquetas catalisa a produção de fibrina, formando uma rede firme que impede o extravasamento de sangue do vaso (SEMPLE et al., 2011) (Figura 1).

As plaquetas podem ser ativadas por espécies reativas de oxigênio (EROs), redução da produção de óxido nítrico, redução da produção de prostaciclina e baixa expressão da enzima NTPDase-1 no endotélio. A ligação da proteína de adesão celular P-Selectina das plaquetas com receptores endoteliais e com macrófagos é

importante no processo, pois estimula a liberação de grânulos plaquetários com fatores pró-inflamatórios e pró-agregantes (HUO, 2004).

A membrana das plaquetas é lisa com invaginações que delimitam a entrada de uma complexa rede de sistema de canalículos abertos que, além de aumentar a sua superfície de membrana, permitem a rápida liberação de mediadores químicos para o meio extracelular. O formato das plaquetas pode ser modificado rapidamente quando estas são ativadas, nesses casos o citoesqueleto altamente especializado rapidamente transforma o disco oval em uma esfera espinhosa. A ativação permite o influxo de cálcio que promove a formação de pseudópodes (ITALIANO JR., 2008).

Além dos canalículos, as plaquetas também apresentam o sistema tubular denso que é, na verdade, o retículo endoplasmático liso e quatro estruturas secretórias. Além dos lisossomos, a plaqueta apresenta α -grânulos, grânulos densos e corpos multivesiculares. Nos α -grânulos podemos encontrar fatores da coagulação (como a P-Seletina), quimiocinas, proteínas adesivas (como o Fator de von Willebrand, FVW), fatores mitogênicos e reguladores da angiogênese. Já nos grânulos densos podemos encontrar substâncias que ativam a plaqueta, como serotonina, catecolaminas, adenosina 5'- difosfato (ADP) e adenosina 5' trifosfato (ATP) (Figura 1). Nos corpos multivesiculares são encontradas proteínas secretórias, como o FVW e P-Seletina, sugerindo que são as organelas precursoras dos α -Granulos (GRESELE et al., 2008; NISPEN et al., 2010).

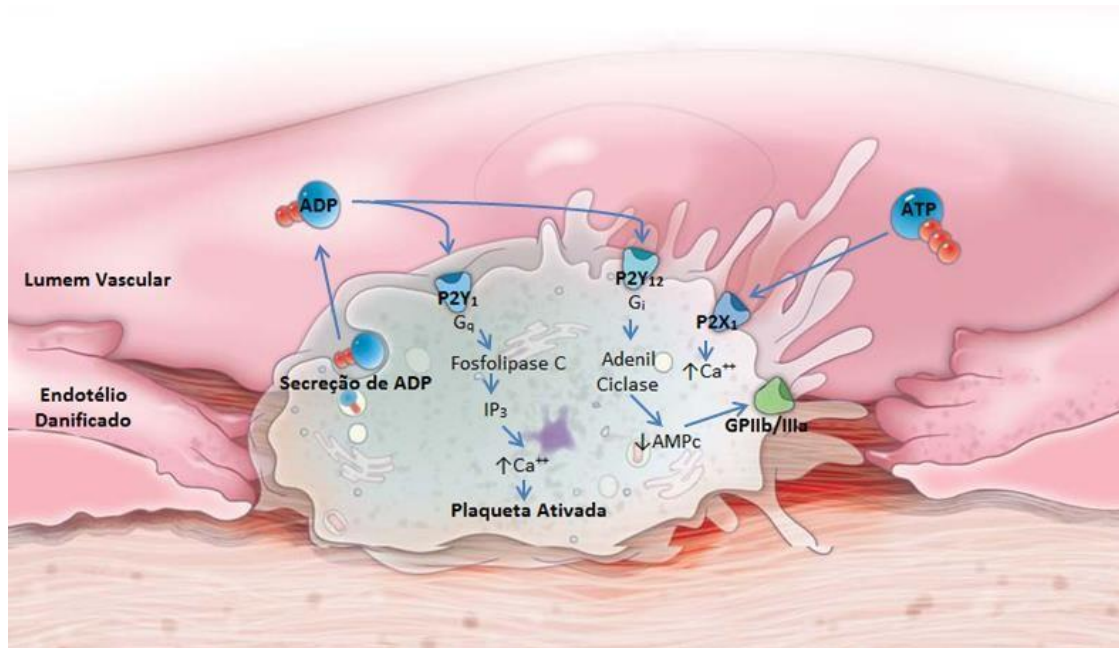


Figura 1: Mecanismos envolvidos na ativação e agregação plaquetária. Adaptado de ELTZSCHIG et al. (2012).

Síndrome de Down e alterações plaquetárias

Em indivíduos com SD pode-se destacar várias alterações nas plaquetas, como trombocitopenia em 66% dos recém-nascidos, doença mieloproliferativa transitória (com presença de plaquetas gigantes e megacariócitos) em até 10% de crianças até 2 meses (BRUWIER & CHANTRAIN, 2012), alterações relacionadas a fluidez da membrana plasmática (ZUBENKO AND HOWLAND, 1988); baixa recaptção de glutamato e baixos níveis de cálcio (MCCOY AND SNEDDON, 1984; BEGNI et al., 2003); defeitos em enzimas mitocondriais como citocromo oxidase e isocitrato desidrogenase (PRINCE et al., 1994). O significado clínico dessas alterações nas plaquetas para a SD ainda não é bem esclarecido, porém elas podem estar associadas com a incidência de trombose venosa cerebral descrita nesses indivíduos nos últimos anos (TARLACI & SAGDUYU, 2001; RUIZ et al., 2011).

Sistema Purinérgico

Os nucleotídeos de adenina ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina possuem várias funções intracelulares e extracelulares. O ATP intracelular geralmente é associado com processos que requerem energia, tais como transporte ativo, motilidade celular e biossíntese, já o ATP extracelular é uma importante molécula sinalizadora, como proposto na neurotransmissão por Burnstock pela primeira vez em 1972 (BURNSTOCK, 1972; YEGUTKIN, 2008).

Muitas outras funções fisiológicas foram atribuídas para os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, tais como contratilidade do músculo liso, interações com a microglia, efeitos no miocárdio, efeitos no fígado e gastrointestinais, controle do fluxo sanguíneo, formação da placa aterosclerótica e ativação e agregação das plaquetas (YEGUTKIN, 2008).

Após a descoberta da ação dos nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) e nucleosídeos (Adenosina), da descoberta de seus respectivos receptores (Receptores P1 para Adenosina e Receptores P2 para os seus nucleotídeos) e da descoberta de um sistema de enzimas (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, ou NTPDase; ecto-5'-nucleotidase e adenosina deaminase, ou ADA), que metabolizam os nucleotídeos e nucleosídeos, foi possível estabelecer um sistema fisiológico, que atualmente é conhecido como sistema purinérgico (ROBSON, 2006).

Nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e receptores purinérgicos

Os nucleotídeos de adenina ATP, ADP e seu correspondente nucleosídeo adenosina são moléculas capazes de influenciar as funções plaquetárias,

vasomotoras e cardíacas (ATKINSON et al., 2006). Nas plaquetas o ADP é agonista da agregação, participando do recrutamento e propagação da coagulação em locais de dano vascular (REMIJIN et al., 2002), já o ATP em altas concentrações é inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997). A adenosina pode atuar a nível endotelial como um vasodilatador e nas plaquetas como um inibidor da agregação (ANFOSSI et al., 2002).

Há algumas maneiras propostas as quais estas moléculas alcançam o meio extracelular, tais como danos na membrana plasmática, canais de liberação (como o s canais panexina), transportadores de nucleotídeos (tais como os cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR), exocitose vesicular (como a liberação dos grânulos densos das plaquetas) (YEGUTKIN, 2008) (Figura 2).

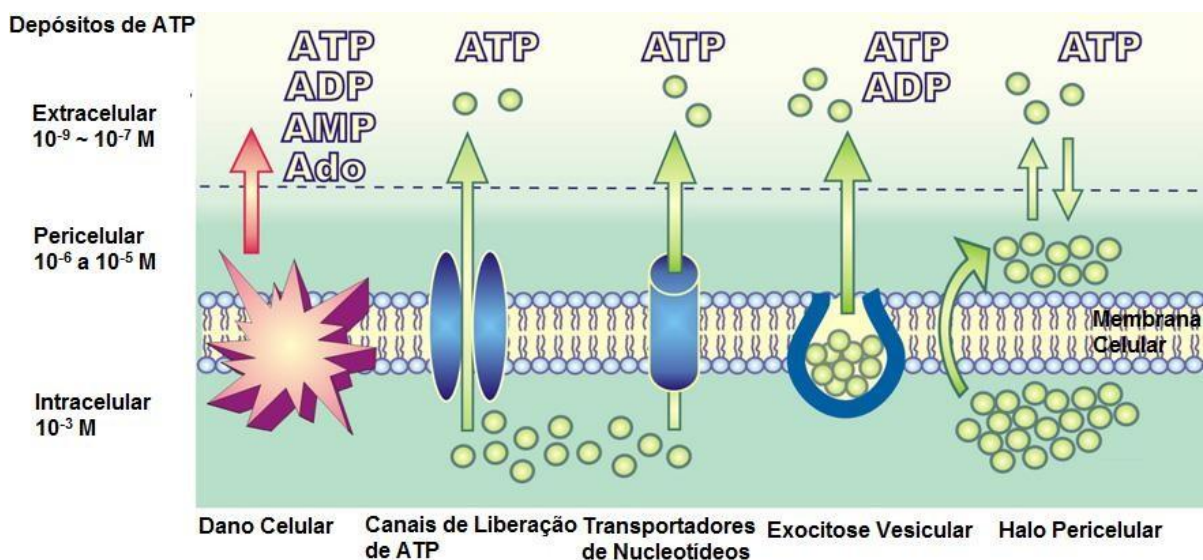


Figura 2: Vias de liberação de nucleotídeos de adenina para o meio extracelular, Adaptado de YEGUTKIN, 2008.

Em plaquetas encontramos receptores do tipo A_{2a} e A_{2b} , o primeiro é encontrado em maiores quantidades e possui uma afinidade maior pela adenosina, enquanto o segundo tipo tem a produção induzida via danos oxidativos, danos vasculares e altos níveis de Fator de Necrose Tumoral α . Quando ativados pela adenosina, aumentam os níveis de cAMP que, por sua vez, diminui a mobilização interna e externa de Ca^{++} levando a um efeito antiagregatório (JOHNSTON-COX & KATYA, 2011).

Os receptores do tipo P2 ligam ATP e ADP e são subdivididos em P2X e P2Y. Os receptores do tipo P2X são ligados a canais iônicos e são conhecidos 7 subtipos ($P2X_{1-7}$) e os receptores do tipo P2Y são ligados a proteína G e são conhecidos 8 subtipos ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, e $P2Y_{14}$) (BURNSTOK, 2009).

Dos receptores do tipo P2X, somente receptores do subtipo $P2X_1$ foram descritos até agora em plaquetas. Estes receptores são canais cátion-seletivos com uma alta sensibilidade para o cátion Ca^{++} e baixa seletividade entre Na^+ e K^+ . quando são ativados pelo ATP geram um influxo transiente de cálcio que é suficiente apenas para a mudança de forma da plaqueta, mas não desencadeia a ativação. Possui uma dessensibilização muito rápida, na ordem de milisegundos (BURNSTOK, 2007).

Foram descritos em plaquetas dois subtipos de receptores do tipo P2Y, o receptor $P2Y_1$ e o receptor $P2Y_{12}$. Estes receptores possuem uma maior afinidade para o ADP em relação ao ATP. O receptor $P2Y_1$ ativa a Fosfolipase C via proteína Gq e produzindo Inositol Trifosfato (IP_3) que leva a uma rápida mobilização de cálcio citosólico, modificando a forma da plaqueta (BURNSTOK, 2007; KUNAPULI et al.,

2003). Já o receptor do subtipo $P2Y_{12}$ age via proteína G, onde a subunidade $G_{\alpha i}$ age inibindo a Adenilato Ciclase e diminuindo os níveis intracelulares de cAMP e a subunidade $G_{\beta\gamma}$ age aumentando a secreção de grânulos densos e aumentando a produção de Tromboxano A₂, que leva a agregação plaquetária (BURNSTOK, 2007; KUNAPULI et al., 2003).

A inibição seletiva do receptor $P2Y_{12}$ é utilizada na prática clínica como antiagregante plaquetário para a prevenção de trombose venosa e arterial, prevenção de acidentes vasculares cerebrais isquêmicos e infarto do miocárdio. Os medicamentos mais utilizados são Clopidogrel e Ticlopidina. Quando tratados, os pacientes apresentam um maior tempo de sangramento, inibição da agregação plaquetária e uma maior resistência a trombose induzida por ADP, ratos nocaute para o receptor $P2Y_{12}$ exibem um fenótipo semelhante aos tratados com estes fármacos (BURNSTOK, 2008).

Ectoenzimas

O processo de sinalização induzida pelos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina são regulados por um sistema multienzimático encontrado na membrana das plaquetas, o qual inclui as enzimas Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (NTPDase), a ecto-5'-nucleotidase e a Adenosina Deaminase (ADA). A NTPDase hidrolisa ATP e ADP a AMP, a 5'-nucleotidase hidrolisa o AMP até adenosina. A adenosina gerada é degradada pela ação da ADA a inosina (YEGUTKIN, 2008).

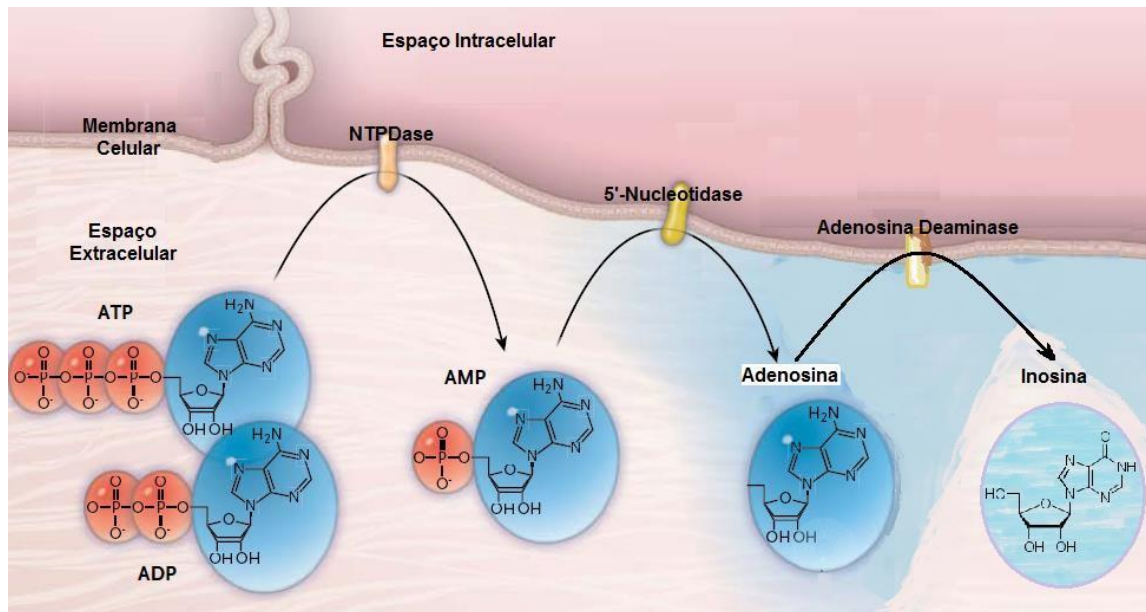


Figura 3: Cascata metabólica de nucleotídeos de adenina, adaptado de ELTZSCHIG et al., 2012.

NTPDases

As NTPDases são uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de moléculas de ATP e ADP a AMP. Oito enzimas diferentes foram identificadas, sendo as NTPDases 1,2,3 e 8 ectoenzimas com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular, as NTPDases 5 e 6 são intracelulares e podem ser secretadas via expressão heteróloga e as NTPDases 4 e 7 são enzimas intracelulares presentes no lúmen de organelas. Estas enzimas também diferem entre si pela afinidade entre os nucleotídeos tri e di fosfatados (ROBSON et al., 2006).

Existem sequências de aminoácidos que apresentam alto grau de similaridade entre essas enzimas e são conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACR1 até ACR5). São cinco sequências que possuem extrema importância para a função catalítica dessas enzimas e são conservadas entre várias espécies (OKUHATA et al., 2013).

A NTPDase 1 foi a primeira enzima a ser identificada dentro da família das NTPDases. Inicialmente esta enzima foi identificada como um marcador de ativação de linfócitos B (DWYER et al., 2007), entretanto atualmente sabe-se que ela é expressa também em outros tipos celulares incluindo as células neuronais (WANG & GUIDOTTI, 1998) e plaquetas (PILLA et al., 2006). A NTPDase 1 é uma enzima que fica ancorada na membrana plasmática através de duas regiões transmembranas próximas aos grupamentos amino e carboxi terminal. Para a sua atividade catalítica são necessários íons Ca^{2+} e Mg^{2+} sendo que esta enzima pode hidrolisar igualmente tanto o ATP quanto ADP levando a formação de AMP (ROBSON et al., 2006).

No sistema vascular, as NTPDases presentes na membrana das células do endotélio e das plaquetas regulam os mecanismos de agregação. A NTPDase1, por ter uma atividade catalítica semelhante entre ATP e ADP (moléculas pró-agregantes), atua como uma enzima limitadora da agregação plaquetária, pois remove os igualmente agonistas do meio. Já a NTPDase 2 hidrolisa ATP com uma afinidade muito maior do que ADP, o que leva ao acúmulo desta molécula que, por ser agonista dos receptores P2Y1 e P2Y12, leva a ativação e agregação das plaquetas (SÉVIGNY et al, 2002).

Ecto-5'-Nucleotidase

A enzima 5'-nucleotidase é responsável pela hidrólise de AMP em adenosina. Até o momento, sete 5'-nucleotidases foram identificadas em humanos, cinco destas localizadas no citosol, uma mitocondrial e uma ectoenzima. A Ecto-5'-Nucleotidase pode ser encontrada em hepatócitos, fibroblastos, células endoteliais, linfócitos e células gliais (COLGAN et al., 2006). No sistema circulatório é expressada

principalmente no endotélio dos grandes vasos, como na aorta, nas carótidas e nas artérias coronárias, enquanto nos eritrócitos e nas plaquetas é exibida uma baixa atividade enzimática (YEGUTKIN, 2008).

Estruturalmente, a ecto-5'-nucleotidase é uma glicoproteína de 61 kDa ancorada a membranas plasmáticas via GPI (glicosilfosfatidi-inositol) na extremidade C-terminal. O homodímero ligado por pontes dissulfeto é essencial para a ação enzimática. Como substrato, pode utilizar uma variedade de 5'-monofosfatos, mas a maior afinidade é para o AMP, com o Km na ordem de micromolares. A enzima é dependente de Mg^{+2} e pode ser inibida por cátions metálicos divalentes Pb^{+2} e Hg^{+2} . Quelantes de metais podem inibir a sua atividade por conta dos vários sítios potenciais para ligar Zn^{+2} que é exibido pela ecto-5'-nucleotidase e que são essenciais para a ação catalítica (ZIMMERMANN, 1992, KAWASHIMA et al, 2000).

Em relação a agregação plaquetária, a ecto-5'-nucleotidase é uma enzima que possui um papel importante nos mecanismos de agregação plaquetária pois é a principal enzima envolvida na formação de adenosina, uma molécula com ações antiagregantes e vasodiladoras (YEGUTKIN, 2008).

Alterações da atividade desta enzima em plaquetas já foram observadas em várias situações patológicas, tais como esclerose múltipla (SPANEVERELLO et al., 2010); infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et al., 2008) e câncer (ZANINI et al., 2012) entretanto o papel dessa enzima em plaquetas de portadores de SD ainda não é conhecido.

Adenosina Deaminase (ADA)

A ADA é responsável por catalisar a deaminação irreversível de adenosina para inosina, que pode ser transformada em hipoxantina e sequencialmente em ácido úrico (pela enzima hipoxantina oxidase) para ser excretado ou a inosina pode ser reaproveitada para a síntese de mononucleotídeos. É uma enzima que pode ser encontrada tanto no citosol, quanto na superfície celular, incluindo a superfície de células hematopoiéticas (CRISTALLI et al., 2001).

Em células linfóides, a ADA pode ser encontrada associada em complexos maiores com CD26/dipeptidil peptidase IV ou via mecanismos de ancoragem interagindo com os receptores de adenosina A₁ ou A_{2b} (YEGUTKIN, 2008).

Pacientes que apresentam deficiência desta enzima apresentam uma imunodeficiência combinada que culmina com linfopenia, anormalidades pulmonares e neurológicas. O acúmulo de adenosina e desoxiadenosina causam alterações em linfócitos levando ao surgimento de várias infecções oportunistas (ALDRICH et al., 2000). Sendo assim, a ADA é uma enzima bem importante nos processos de diferenciação e proliferação de linfócitos, e vem sendo utilizada pra monitorar várias patologias relacionadas ao sistema imune (POURSHARIFI et al., 2009).

O complexo ADA/CD26/Dipeptidil peptidase IV parece possuir mais funções do que simplesmente deaminação da adenosina. Há evidências que a interação resulta em sinais co-estimulatórios nos linfócitos T. Esta co-estimulação é bloqueada pelo vírus HIV, o que pode evidenciar um papel da ADA na patofisiologia da AIDS (FRANCO et al, 1998).

A presença de atividade da ADA acima de 40 U/L em líquido pleural pode ser utilizada como auxiliar no diagnóstico em casos de pneumonia (35,5% dos casos),

tuberculose (94,3% dos casos) e, em menor extensão, tumores (6,7% dos casos). Para os casos de tuberculose, a maioria das atividades vem da expressão de ADA2 por linfócitos (PORCEL, 2010).

A importância da ADA na fisiologia das plaquetas consiste principalmente no fato que esta enzima é a principal responsável por regular os níveis extracelulares de adenosina no meio. Sendo assim, alterações em sua atividade podem favorecer um ambiente pró-trombótico por degradar a adenosina, que tem efeito anti-agregante e vasodilatador (CRISTALLI et al., 2001; FONTANA et al., 2003).

Estresse oxidativo

Radicais Livres e defesas antioxidantes

Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados na última camada de valência. Exemplos de radicais livres são o próprio oxigênio molecular (O_2), o radical hidroxila ($OH\cdot$), o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical peróxido nítrico ($ONOO\cdot$), o radical alcoxi ($RO\cdot$) e o óxido nítrico (NO). Existem, também, compostos igualmente reativos quanto os radicais livres, que não possuem elétrons desemparelhados na última camada e, portanto, não podem ser chamados de radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) e incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosonium (NO^+), ânion nitroxila (NO^-) e o peróxido nitrito ($ONOO^-$) (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2007).

Para se protegerem contra oxidação, os organismos dispõem de mecanismos não enzimáticos (antioxidantes) e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas

com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o tocoferol (vitamina E), beta caroteno, selênio, cobre, zinco, ácido ascórbico entre outros diminuem a ação tóxica das EROs produzidas intra e extracelularmente (LOTT, 2012).

Dentre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas constituem uma importante linha de defesa do organismo de neutralização das EROs agindo de uma forma altamente cooperativa e com elevada sincronia (NORDBERG & ARNER, 2001).

Apesar das defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROs, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente. Um organismo em homeostasia mantém o equilíbrio entre espécies oxidantes e defesas antioxidantes. Quando há uma grande geração de espécies oxidantes e/ou uma baixa produção de defesas antioxidantes ocorre o estresse oxidativo, onde esse aumento das EROs pode levar a danos em proteínas, lipídios e ao DNA (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é uma importante defesa antioxidante enzimática uma vez que é responsável pela transformação de dois radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em uma molécula de H_2O_2 e uma molécula de hidrogênio molecular. Há três isoformas presentes em humanos, a CuZnSOD (SOD1), presente no citoplasma, a MnSOD (SOD2) presente nas mitocôndrias e a CuZnSOD extracelular (SOD3), que é secretada (ANTONYUK, 2009). Atuando de forma cooperativa e sincronizada com a SOD a enzima catalase (CAT) atua decompondo o H_2O_2 em água e O_2 (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2007). Juntas essas enzimas

constituem uma importante linha de defesa do organismo para a neutralização das EROs (Figura 4) (NORDBERG & ARNER, 2001).

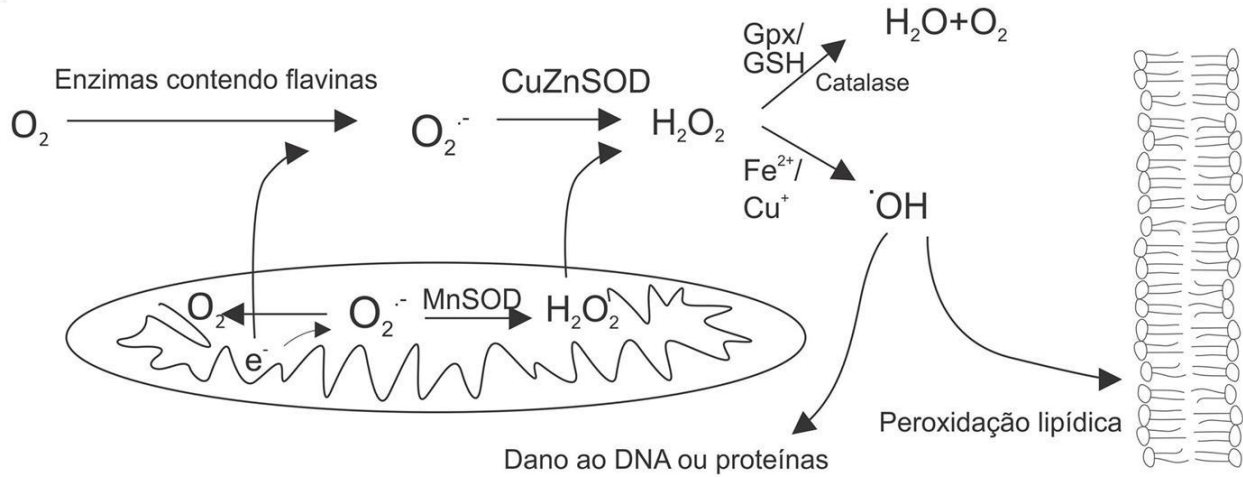


Figura 4: Mecanismo enzimático antioxidante (Adaptado de NORDBERG & ARNER, 2001).

Os portadores da SD tem uma maior tendência ao estresse oxidativo. Este achado pode parecer contraditório, pois indivíduos com SD possuem 3 cópias do gene que produz a enzima antioxidante CuZnSOD, ou SOD1, (Figura 5), e entretanto a alta atividade da enzima pode levar a um acúmulo de H_2O_2 que, se não acompanhado do aumento da catalase ou outras enzimas que degradam o H_2O_2 (como a glutathiona peroxidase), fica evidente o dano à órgãos que carecem de defesas antioxidantes contra esta espécie reativa (LOTT et al., 2012).

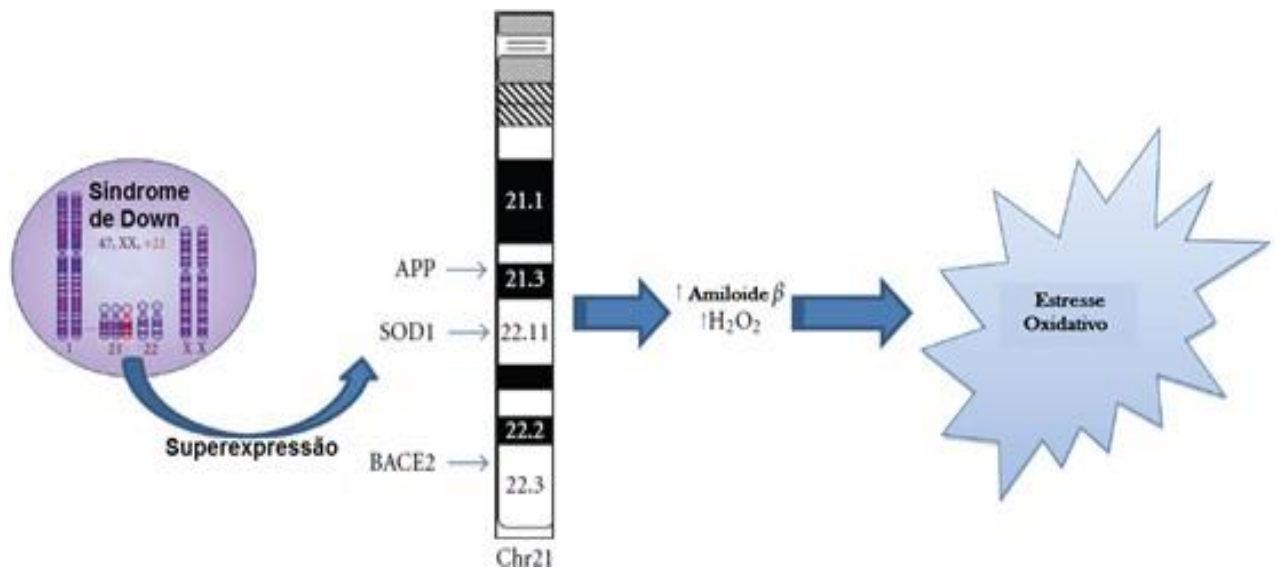


Figura 5: Superexpressão de certos genes do cromossomo 21, como o SOD1 na SD pode levar ao aumento no estresse oxidativo (Adaptado de BUTTERFIELD & PERLUIGI, 2012).

Sendo assim, vários estudos tem demonstrado que parâmetros de estresse oxidativo estão alterados em portadores da trissomia do 21. Níveis elevados de peroxidação lipídica e carbonilação proteica têm sido encontrados elevados em indivíduos jovens, mas estas alterações se tornam estatisticamente insignificantes à medida que a idade avança (MEHAR et al., 2012).

Além disso, outro dado importante é o fato de nas hemácias, os níveis de meta-hemoglobina (hemoglobina em que o átomo central de Fe^{+2} está na forma oxidada de Fe^{+3}) podem ser 3 vezes maiores em indivíduos com SD do que em indivíduos normais, indicando assim a presença de estresse oxidativo. Nessa situação para garantir o transporte normal de oxigênio, a enzima meta-hemoglobina redutase encontra-se compensatoriamente aumentada (AGUILAR-DA-SILVA et al., 2003).

Em análises *post-mortem* em cérebros de pessoas com Down foram encontrados indícios de dano oxidativo elevado, tais como grandes quantidades de

espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, altos níveis de carbonilas livres em proteínas e peptídios A β oxidados, o que vem a ser importante para neuropatologia da síndrome, envelhecimento prematuro e o desenvolvimento de demência tardia semelhante ao Alzheimer (BUTTERFIELD & PERLUIGI, 2012, 2011; LOTT, 2012).

Cabe ressaltar que além do gene da SOD1, o cromossomo 21 possui o gene da proteína precursora amilóide (APP) e o gene da enzima clivadora do sítio beta da

APP (β -Site APP Cleaving, BACE2), ambas relacionadas com a demência tipo Alzheimer que pessoas com SD podem desenvolver, levando assim a disfunção sináptica, neuroinflamação e estresse oxidativo (BUTTERFIELD & PERLUIGI, 2012).

Embora parâmetros de estresse oxidativo tenham sido investigados na SD, o papel dessas alterações ainda é controverso. Sendo assim, torna-se relevante avaliar os mecanismos moleculares envolvidos não somente na questão relacionada ao estresse oxidativo como também nas respostas plaquetárias e finalmente, na relação entre ambos.

4. Manuscrito

Evaluation of oxidative stress parameters and the ectonucleotidases activities in platelets from Down Syndrome individuals

Maurício Ferreira¹, Rodrigo Rodrigues¹, Elise Motta¹, Bruna Mattos¹, Gabriela Debom¹,
Fabiano Soares¹, Caroline Martins², Francieli Moro Stefanello¹, Tatiane Morgana da Silva¹,
Diéssica Dalenogare¹, Vera Morsch², Elizandra Braganhol¹, Roselia Spanevello¹

¹ Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding author:

Roselia Maria Spanevello

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário- Capão do Leão 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

E-mail addresses: rspanevello@gmail.com

Phone: +55-53- 39217233

Abstract

Alterations in the platelets and oxidative stress play a role in the pathogenesis of DS. The NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) represent an important therapeutic target since they interfere in the extracellular nucleotide pool altering several platelet functions. We evaluated the ectonucleotidase activities and oxidative stress parameters in samples of DS individuals and healthy subjects. The population consisted of 28 subjects with DS and 28 healthy subjects. Ten milliliters of blood was obtained from each subject and used for platelet and serum preparation. The NTPDase activity using ATP as substrate was increased in platelets of DS patients in relation to the control group ($P<0.05$); however, no alterations were observed in the ADP hydrolysis. A decrease in the 5'-nucleotidase activity and an increase in the ADA activity was observed in platelets of DS subjects when compared to healthy individuals ($P<0.05$). Lipid peroxidation and total thiol content was decreased in serum of DS individuals. Furthermore, superoxide dismutase and catalase activities were increased in whole blood of this group ($P<0.05$). These findings suggest that alterations in the ectonucleotidase activities in platelets as well as changes in the oxidative stress parameters may contribute to the clinical features of DS.

Key words: Down syndrome, platelets, NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase, oxidative stress

1. Introduction

Down syndrome (DS), the most common genetic disorder, is caused by the triplication of chromosome 21 or part of it [1]. DS occurs in approximately 1 out of 700 live births and is associated with several systemic dysfunctions that include mental retardation and early-onset Alzheimer's disease [2], obesity [3], immune disorders [4] and congenital heart defects [5].

Data from literature have demonstrated hematologic abnormalities in DS subjects, which include alterations in the platelets, such as changes in their size and in their number [6,7,8]. Moreover, an increase in the platelet membrane fluidity [9], deficiencies in the mitochondrial enzymes [10], a decrease in the glutamate uptake and calcium content [11,12], and a decrease in the ATPase activity [13] were also described in platelets of DS individuals. The clinical significance of these platelet alterations is not yet well understood but it may be associated with the cerebral venous thrombosis incidence in DS subjects [14,15].

Platelets constitute the first line of defense when normal vessels are injured thus they have a critical role in hemostasis and thrombosis mechanisms [16]. Platelet adhesion, aggregation and further platelet recruitment culminate in hemostatic plug formation at the site of vascular injury [17,18]. It is well established that adenine nucleotides and nucleosides such as ATP, ADP and adenosine modulate the platelet aggregation [19]. ADP is a well known agonist involved in the recruitment and aggregation of platelets at sites of vascular injury by activating purinergic receptors

on the platelet membrane [20]. Furthermore, adenosine is a potent inhibitor of platelet aggregation and acting as a cardioprotector molecule [21,22].

The effects of ATP, ADP and adenosine in the platelet function are modulated by ectoenzymes such as NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) present in the platelet membrane [23]. These enzymes constitute an organized enzymatic chain that begins with the action of E-NTPDase, which catalyzes the hydrolysis of ATP and ADP to AMP [23]. The AMP is subsequently hydrolyzed by 5'-nucleotidase to adenosine, which is degraded by ADA to inosine [24,25]. Together, these enzymes represent an important therapeutic target since they interfere in the extracellular pool nucleotides and nucleosides [26]. In fact, a growing number of evidences have indicated that the activity and expression of ectonucleotidases in platelets is deregulated in several human diseases [27,28,29].

It has been also demonstrated that reactive oxidant species (ROS) can alter the platelet function [30] and that ectonucleotidase activities are altered in platelets in pathologies associated with oxidative stress [27,28,29]. In this line, there are studies reporting that oxidative stress plays a key role in the pathogenesis of DS. The oxidative stress in DS may result in the over expression of enzyme Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) encoded by genes on chromosome 21 [31] and with abnormalities of mitochondrial functions [32]. Although oxidative stress parameters have been investigated in a number of studies, the role of these alterations remained controversial in DS.

In this line, the aim of this study was to evaluate the ectonucleotidase activities in platelets and markers of oxidative stress in blood samples of DS and healthy subjects.

2. Materials and Methods

Subjects

The study was performed in 28 individuals with DS and 28 healthy controls matched by age and sex from Pelotas, RS, Brazil. The size sample was based in previous studies from our laboratory [33]. The general characteristics of the participants are shown in Table I. Each participant or a legal guardian signed an informed consent to participate in this study and the Human Ethics Committee from the Federal University of Pelotas approved the study protocol.

Sample collection and preparation

Teen milliliters of blood was obtained from each individual with DS and used for sample preparation. The same procedure was carried out for the control group. Whole blood was centrifuged at 1000 $\times g$ for 10 min and serum was removed by aspiration, aliquoted, and frozen at -80°C until biochemical determinations.

Platelet-Rich Plasma (PRP) was prepared by the method of Pilla et al. [34]. Total blood was collected with sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 160 $\times g$ for 10 min. PRP was centrifuged at 1400 $\times g$ for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0. Platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activities.

NTPDase and 5'-Nucleotidase assays

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μL , as described by Pilla et al. [34]. For AMP hydrolysis, the medium reaction was used as previously described except that 5 mM CaCl_2 was replaced by 10 mM MgCl_2 .

Twenty microliters of the enzyme preparation (8-12 μg of protein) was added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1 mM, and AMP at a final concentration of 2 mM. The incubation time was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 μL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [35] using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Control samples were carried out to correct for non-enzymatic hydrolysis of nucleotides by adding platelets after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Adenosine deaminase determination

Adenosine deaminase (ADA) from platelets was determined according to Guisti and Galanti [36]. Briefly, 50 μL of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, incubated at 37°C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. Results were expressed in units per mg of protein (U/mg of protein). One unit (1 U) of ADA is

defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS in serum at 532 nm according to a modified method of Ohkawa et al. [37]. Results were expressed as nmol TBARS/mg of protein.

Total sulfhydryl content

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery [38], which is based on the reduction of DTNB by thiols and in turn it becomes oxidized (disulfide) generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, homogenates were added to PBS buffer pH 7.4 containing EDTA. The reaction was started by the addition of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Results were reported as nmol TNB/mg protein.

Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD) activities in whole blood

The determination of CAT activity was carried out in accordance with the modified method by Nelson and Kiesow [39]. This assay involves changes in the absorbance at 240 nm, for 2 min, due to CAT dependent decomposition of hydrogen peroxide. The CAT activity was calculated using the molar extinction coefficient (0.0436 cm²/μmol) and results were expressed as pmol/mg of protein.

SOD activity measurement is based on the inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin as described by Mc Cord and Fridovich [40]. A unit of SOD is

defined as the amount of enzyme that inhibits by 50 % the speed of oxidation of adrenalin. The oxidation of adrenalin leads to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, and the activity is expressed in U/mg of protein.

Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [41] using serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the Student's t-test for independent samples. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all analyses used. All data were expressed as mean $\pm$ SEM.

3. Results

The results obtained showed alterations in the ectonucleotidase activities and oxidative stress parameters in samples from DS subjects. As can be observed in Figure 1A, the ATP hydrolysis was significantly increased (28%) in platelets from DS individuals when compared to the control group ($P < 0.05$). On the other hand, no alterations were observed in the NTPDase activity in platelets when ADP was used as substrate (Figure 1B).

Figure 2 shows the results obtained for 5'-nucleotidase activity using AMP as substrate. Our data demonstrated that the 5'- nucleotidase activity was decreased (25%) in platelets of DS subjects in relation to the control group (Figure 2, $P < 0.05$). In

contrast, ADA activity was increased (70%) in platelets from DS subjects when compared to the healthy subjects (Figure 3).

The oxidative stress parameters are shown in Figure 4. TBARS levels and total thiol content were significantly decreased in serum of DS individuals, 47% and 16% respectively (Figure 4 A and B, $P<0.05$). On the other hand, SOD and CAT activities were increased in whole blood in this group when compared to the control group, 42% and 31% respectively (Figure 4 C and D, $P<0.05$).

4. Discussion

Several studies have reported abnormalities in the number and function of platelets in DS [6,7,8]. However, the mechanisms involved in these alterations and the clinical significance for pathogenesis of the DS are not yet well understood. In this context, the aim of this study was to elucidate the role of ectonucleotidases in platelets from DS subjects associated with oxidative stress parameters.

Platelet adhesion and subsequent aggregation at the site of vascular injury are important mechanisms required to stop bleeding [17,18]. It is well established that dense granule secretion and in particular the release of the ATP and ADP from the platelets is crucial for platelet aggregation and formation of stable aggregates [20]. Concerning this, alterations in the secretion or metabolism of nucleotides may cause dysfunctions in the platelet adhesion and aggregation and increase bleeding risk or thrombosis [42,43].

The main finding of our study is that adenine nucleotide hydrolysis is significantly modified in platelets from DS individuals (Figure 1, 2, 3, 4). We observed an increase in the NTPDase activity in relation to ATP hydrolysis, while no alterations

were observed in the ADP hydrolysis. In addition, we have also observed an inhibition in the 5'-nucleotidase and an increase in the ADA activity in platelets from trisomy 21 individuals. The NTPDase 5'-nucleotidase and ADA have shown pronounced effects on the extracellular pool of adenine nucleotides and nucleosides [25,26]. The coordinated action of these enzymes tends rapidly to inactivate the ATP/ADP/AMP released with a respective generation of adenosine, representing the main effector system in the control of the thrombotic process in the vascular system [24,26]. In this scenario, our results show that the increase in the ATP hydrolysis by NTPDase in platelets from DS subjects may result in augmented platelet activation and aggregation, since ADP may accumulate in the extracellular milieu. In addition, alterations in the 5'-nucleotidase and ADA may be contributed by a decrease in the adenosine levels, a molecule that has a number of cardiovascular protective effects such as inhibition of platelet aggregation. Taken together, this unbalance of ratio nucleotides/nucleosides in the platelet may be associated with incidence of cerebral venous thrombosis observed in DS [14,15].

Another important aspect to be discussed is that abnormalities of the cardiovascular system are common in DS individuals [44]. Heart defects are the most important to the health problem of these individuals and constitute the main cause of near birth death and the important factor of decreased life expectancy of that group of people [44]. Contrasting with this scenario, even with a sedentary lifestyle, poor diet, and higher prevalence of obesity and dyslipidemia, individuals with DS have lower levels of coronary heart disease and atherogenesis [3,45]. A possible explanation for this effect is the fact that individuals with DS have an overexpression of the gene that produces the enzyme cystathionine-beta-synthase (present on

chromosome 21) and then catalyzes the conversion of homocysteine (pro-atherosclerotic factor) to cysteine (antioxidant), which can protect against oxidative damage and formation of atherogenic plaque [44,46].

In the present study, we also evaluated some oxidative stress parameters in samples of DS. Our results demonstrated a decrease in the levels of lipid peroxidation in serum of trisomy 21 subjects. Levels of lipid peroxidation and protein carbonylation have been found elevated in young individuals, but these changes become statistically insignificant with the age advance [47,48].

Studies have shown a higher percentage of monounsaturated fatty acids in children with DS increasing the predisposition to oxidative damage. In addition, adults and children with DS also have a high concentration of uric acid in the serum. This antioxidant is capable of reducing the peroxy radical, which may lead to reduced levels of lipid peroxidation [49,50]. Another important aspect is that in our study DS adults performed physical exercise. Ordonez and Rodriguez [51] showed that exercise collaborates to reduce the levels of lipid peroxidation in this group of individuals.

Our results also showed an increase in SOD and CAT activities. These results are consistent with several studies in the literature [48,52]. SOD is an antioxidant enzyme encoded on 21 chromosome that catalyses the dismutation of superoxide radical to hydrogen peroxide, which is further neutralized by the CAT enzyme [50]. The excess of the enzyme Cu/Zn SOD (SOD1) activity has been considered as the main responsible for the increase of the oxidative stress in DS [53]. Since the ratio of SOD1 and CAT is altered in DS, hydrogen peroxide may accumulate leading to cell damage [53]. However, in our study an increase in the

CAT activity could be a compensatory mechanism to prevent damage caused by oxidative stress.

On the other hand, we demonstrated that in serum of DS adults a decrease in the sulfhydryl content occurs. Other studies have also demonstrated a decrease in the glutathione (GSH) in children and adolescents with DS [48,54,55]. GSH levels are usually depleted in the body since GSH removed the hydrogen peroxide via glutathione peroxidase [50]. In this context, we can suggest that sulfhydryl content, which is low in DS, may be associated with a high production of peroxide by SOD.

In conclusion, our results showed alterations in the ectonucleotidase activities in platelets of DS adults. These findings support the hypothesis that enzymatic alterations may contribute to dysfunctions in coagulation parameters in this genetic disorder. It is well established that ROS may alter the platelet function [30,56] and that ectonucleotidase activities is altered in platelets in pathologies associated with oxidative stress [27,28,29]. In this line, it is plausible to suggest that the alterations in the ectonucleotidases may be associated with free radicals produced in DS. Further studies are necessary to confirm this hypothesis in terms of possible therapeutic target for DS subjects.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support. We also thank the foundation L'Oréal, UNESCO and Academia Brasileira de Ciências for the program "For Women in Science" which also contributed to financial support for this study development.

References

- [1] Busciglio J, Capone G, O'Byran J, Gardinier K. Down Syndrome: gene, model system and progress towards phamacotherapies and clinical trials for cognitive deficits. *Cytogenet Genome Res* 2013; 141: 260-271.

- [2] Weskler M, Szabo P, Relkin N, Reidenberg M, Wesksler B, Coppus A. Alzheimer's disease and Down's syndrome: treating two paths to dementia. *Autoimmun Rev* 2013; 12: 670-673.

- [3] Murray J, Ryan Krause P. Obesity in children with Down Syndrome: blackground and recommendations for management. *Pediatric Nurses* 2010; 36: 314-319.

- [4] Verstegen R, Kusters M, Gemen E, Vries E. Down syndrome B-lymphocyte subpopulations, intrinsic defect or decreased T-lymphocyte help. *Pediatric Res* 2010; 67: 563-569.

- [5] Faria P, Nicolau J, Melek M, Oliveira N, Bermudez B. Association between congenital heart defects and severe infections in children with Down Syndrome. *Rev Port Cardiol* 2014; 6: 1- 4.

- [6] More R, Amir N, Meyer S, Kopolovic J, Yarom R. Platelets abnormalities in Down's syndrome. *Clin Genet* 1982; 22: 128-136.

- [7] Webb D, Roberts J, Vyas P. Haematology of Down syndrome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2007; 92: 503-507.

- [8] Bruwier A, Chantrain C. Hematological disorders and leukemia in children with Down syndrome. *Eur J Pediatr* 2012; 171: 1301-1317.
- [9]. Zubenko G, Howlan R. Markedly increased platelet membrane fluidity in Down Syndrome with a (14q, 21q) translocation. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1988; 1: 218-219.
- [10] Prince J, Bave U, Annerém G, Orelund L. Mitochondrial enzyme deficiencies in Down's syndrome. *J Neural Transm* 1994; 8: 171-181.
- [11] McCoy E, Sneddon J. Decreased Calcium content and Ca^{2+} uptake in Down's syndrome blood platelets. *Pediatr Res* 1984; 9: 914-916.
- [12] Begni B, Brighina L, Fumagalli L, Andreoni S, Castelli E, Francesconi C, DellBo R, Ferrarese C. Altered glutamate uptake in peripheral tissues from down syndrome patients. *Neurosci Lett* 2003; 5: 73-76.
- [13] McCoy E, Segal D, Bayer S, Strynadka K. Decreased ATPase and increased content of platelets in Down's syndrome – relation to decreased serotonin content. *N Engl J Med* 1974; 291: 950-953.
- [14] Tarlaci S, Sagduyu A. Central venous thrombosis in Down's syndrome. *Clin Neurol Neurosurgery* 2001; 103: 242-244.
- [15] Ruiz J, Fajardo-Picó E, Aguilar García J, Ruiz-Guerrero C, Miranda Matilla R, Irrbarrem-Marin M. Discussion and review of the literature following the case of a

young man with Down's Syndrome and cerebral venous thrombosis. *Rev Med Int Sindr Down* 2011; 15: 37-40.

[16] Gaetano G. Historical Overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. *Haematologica* 2001; 86: 349-356.

[17] Marcus A, Safier L. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993; 7: 516-522.

[18] Ni H, Freedmann J. Platelets and hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfusion Apher Sci* 2003; 28: 257-264.

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

[20] Fontana P, Duppont A, Gandrille S, Bachellot-Loza C, Reny J, Aiach M, Gauchem P. Adenosine diphosphate induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003; 108: 989-995.

[21] Anfossi G, Russo I, Massuco P, Mattiello L, Cavalot F, Balbo A, Trovati M. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. *Thromb Res* 2002; 105: 71-78.

- [22] Iyú D, Glenn J, White A, Fox S, Heptinstall S. Adenosine derived from ADP can contribute to inhibition of platelet aggregation in the presence of P2Y₁₂ antagonist. *Atheroscler Thromb Vas Biol* 2011; 31: 416-422.
- [23] Zimmermann H, Mishra S, Shukla V, Langer D, Gampe K, Grimm I, Delic J, Braun N. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *Ana R Acad Farma* 2007; 73: 537-566.
- [24] Robson S, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; 2: 409-430.
- [25] Yegutkin G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 673-694.
- [26] Mathieu P. Pharmacology of ectonucleotidases: relevance for the treatment of cardiovascular disorders. *Eur J Pharmacol* 2012; 696: 1-4.
- [27] Bagatini M, Martins C, Gasparetto D, Spanevello R, Becker L, Rosa C, Battisti V, Bellé L, Gonçalves J, Schetinger M, Santos R, Oliveira L, Morsch V (2011) Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clin Chim Acta* 412: 159-164.
- [28] Spanevello R, Mazzanti C, Bagatini M, Correa M, Schmatz R, Stefanello N, Thomé G, Morsch V, Becker L, Bellé L, Oliveira L, Schetinger M. Activities of the

enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol* 2010; 257: 24-30.

[29] Zanini D, Schmatz R, Pimentel VC, Gutierrez JM, Maldonado PA, Thomé GR, Cardoso AM, Stefanello N, Oliveira L, Chiesa J, Leal DB, Morsch VM, Schetinger MR. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomed Pharmacother* 2012; 66: 40-50.

[30] Dayal S, Wilson K, Motto D, Miller F, Chauhan A, Lentz S. Hydrogen Peroxide promotes aging related platelet hyperaction and thrombosis. *Circulation* 2013; 127: 1308-1316.

[31] Gulesserian T, Seidl R, Hardmeier R, Nigel C, Gert L. Superoxide dismutase SOD1, encoded on chromosome 21, but not SOD 2 is over expressed in brains of patients with Down Syndrome. *J Invest Med* 2001; 49: 41-46.

[32] Pagano G, Castello G. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Down Syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2012; 724: 291-299.

[33] Rodrigues R, Debon G, Soares F, Machado C, Pureza J, Peres W, Garcias G, Duarte M, Schetinger M, Stefanello F, Braganhol E, Spanevello R. Alterations of ectonucleotidases and acetylcholinesterase in lymphocytes of Down Syndrome subjects: relation with inflammatory parameters. *Clin Chim Acta* 2014; 433: 105-110.

- [34] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJF. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase E.C. 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996; 7: 225-230.
- [35] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} - ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157: 375-378.
- [36] Giusti G, Gakis C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 1971; 12: 417-425.
- [37] Ohkawa H, Chishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue of thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- [38] Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosc Lett* 2001; 302: 141-145.
- [39] Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 -C (with molar extinction coefficients of H_2O_2 solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972; 49: 474-478.
- [40] Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.

- [41] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- [42] Israel S, McNicol A, Robertson C, Gerrard M. Platelet storage pool deficiency: diagnosis in patients with prolonged bleeding times and normal platelet aggregation. *Brit J Hematol* 1990; 75: 198 -121.
- [43] Enjyoji K, Sévigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD. Target disruption of cd39/ATP diophosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 1999; 5: 1010-1017.
- [44] Vis JC, Duffles M, Winter M, Cobben J, Hauism S, Muldi B. Down Syndrome a cardiovascular perspective. *J Intel Dis Res* 2009; 53:419-425.
- [45] Melville CA, Cooper S, Mc Grother C, Thorp C, Collacott R. Obesity in adult with Down Syndrome – a case control study. *J Intel Dis Res* 2005; 49: 125-133.
- [46] Licastro L, Marochi A, Penca S, Porcellini E, Lio D, Dogliotti G, Corsi M. Does Down Syndrome support the homocysteine theory of atherogenesis? Experience in elderly subjects with trysomy 21. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 43: 381-387.
- [47] Jovanovic S, Clements D, MacLeod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down Syndrome. *Free Radical Biology and Medicine* 1988; 25: 1044-1048.

- [48] Garlet TR, Parisotto EB, Medeiros GS. Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Life Sci* 2013; 93: 558-563.
- [49] Campos C, Guzmán R, López-fernández E. Urinary uric acid and antioxidant capacity in children and adults with Down syndrome. *Clin Biochem* 2010; 43: 228-33.
- [50] Halliwell B, Gutteridge J M C. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford: Clarendon Press; 2006
- [51] Ordonez FJ, Rodriguez MR. Regular exercise attenuated lipid peroxidation in adolescents with Down's syndrome *Clin Biochem* 2006; 40: 141-142.
- [52] Strydom A, Dickinson MJ, Shende S. Oxidative stress and cognitive ability in adults with Down syndrome. *Prog Neuro-psychoph Biol Psych* 2009; 33: 76-80.
- [53] Sinha S. Anti-oxidant gene expression imbalance, aging and Down syndrome. *Life Sci* 2005; 76: 1407-1426.
- [54] Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I. Homocysteine Metabolism in Children with Down Syndrome: In Vitro Modulation. *Am J Human Genet* 2001; 69: 88-95.
- [55] Sulthana S, Kumar S, Sridhar M, Bhat B, Rao K. Levels of non enzymatic antioxidants in Down Syndrome. *Ind J Pediatr* 2012; 79: 1473-1476.
- [56] Violi F, Pignatelli P. Platelet NOX a novel target for anti-thrombotic treatment. *Thromb Haemost* 2014; 111: 1-7.

Legends of Figures

Figure 1: NTPDase activity using ATP (A) and ADP (B) as substrate in platelets from Down syndrome and control subjects. Bars represent means $\pm$ SEM. NTPDase activity is expressed in nmol of Pi/min/mg of protein. * Represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$, $n = 28$).

Figure 2: 5'-nucleotidase activity using AMP as substrate in platelets from Down syndrome and control subjects. Bars represent means $\pm$ SEM. 5'-nucleotidase activity is expressed in nmol of Pi/min/mg of protein. * Represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$, $n = 28$).

Figure 3: Adenosine deaminase (ADA) activity using adenosine as substrate in platelets from Down syndrome and control subjects. Bars represent means $\pm$ SEM. ADA activity is expressed in U/L. * Represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$, $n = 28$).

Figure 4: Oxidative stress parameters in serum and whole blood of DS patients and control subjects. (A) Lipid peroxidation (B) Sulfhydryl content (C) Superoxide dismutase and (D) Catalase activity. Bars represent means $\pm$ SEM. * Represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$, $n = 25$).

Table I - Characteristics of Down Syndrome (DS) and control individuals. Variables such as age are presented as mean $\pm$ SEM.

Characteristics of the sample population		
	Control	DS
Number	28	28
Women	15	12
Men	13	16
Women age	24.12 $\pm$ 5.54	26.20 $\pm$ 5.76
Men age	23.67 $\pm$ 3.98	28.88 $\pm$ 6.94

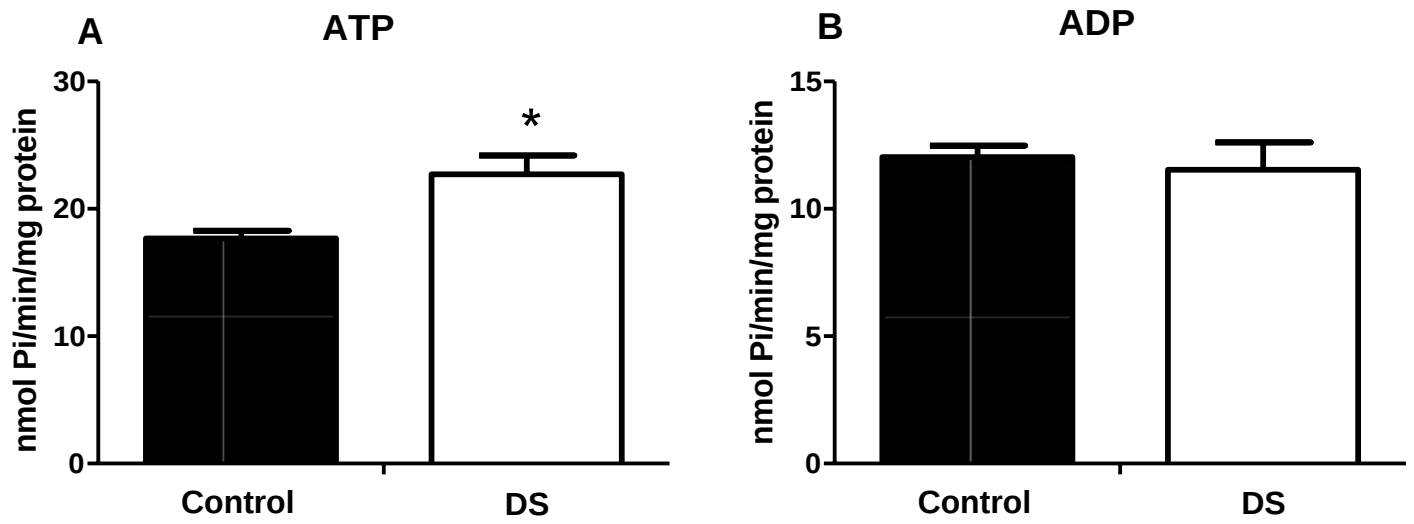


Figure 1

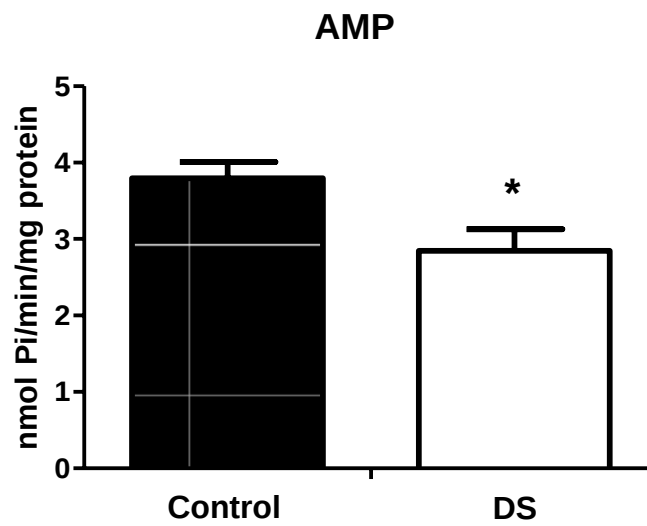


Figure 2

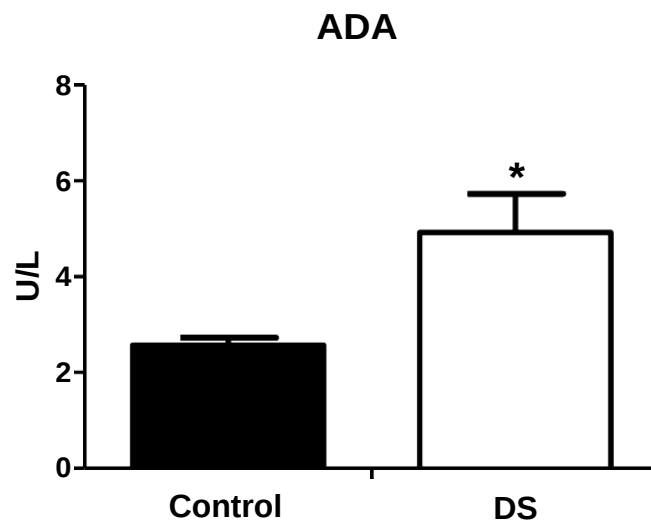


Figure 3

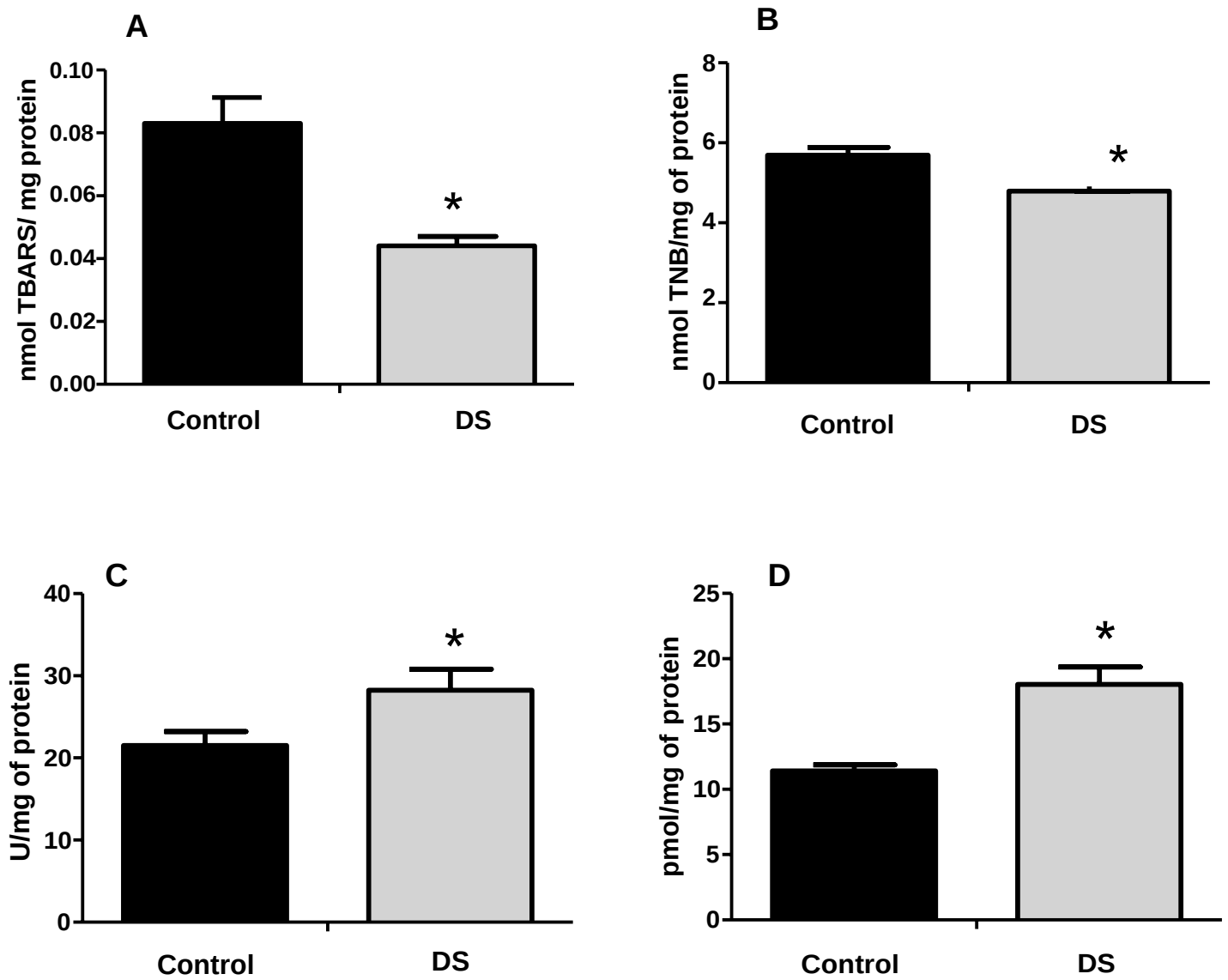


Figure 4

5. Conclusões

O presente trabalho demonstrou alterações na atividade das ectonucleotidases em plaquetas de portadores de SD. O aumento da hidrólise do ATP pode contribuir para aumentar os níveis de ADP, o principal agonista de agregação plaquetária. Por outro lado a inibição da 5'-nucleotidase e o aumento da ADA podem levar a diminuição dos níveis de adenosina, uma molécula com ações antiagregantes. Essas alterações nas plaquetas podem estar associadas com a incidência de trombose venosa cerebral descrita para a SD.

As alterações no sistema antioxidante mostram uma elevação na atividade da enzima SOD, que pode ser explicado pelo fato dos indivíduos possuírem três cópias do gene. A elevação da enzima CAT e a diminuição do conteúdo total de tióis se justifica como uma compensação para a maior produção de peróxido de hidrogênio pela enzima SOD, ambos achados bem descritos em varias fontes na literatura.

Por fim, os baixos níveis de peroxidação lipídica mostram que o sistema antioxidante destes indivíduos adultos está funcional, com o excesso de peróxidos produzidos pela SOD compensado por outras defesas antioxidantes como a CAT e a glutathiona peroxidase.

Referências

AGUILAR-DA-SILVA, R; MORAES G; MORAES, T. Implications of the oxidative stress on the erythrocyte metabolism of Down Syndrome individuals. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** v. 25 p. 231, 2003.

ALDRICH, M. B.; BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R. E.. The Importance of Adenosine Deaminase for Lymphocyte Development and Function. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 272, p. 311-315, 2000.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS Health supervision for children with Down syndrome. **Pediatrics** v. 107, p. 442-449, 2001.

ANFOSSI, G.; RUSSO, I.; MASSUCCO, P.; MATTIELLO, L.; CAVALOT, F.; BALBO, A.; TROVATI, M. Adenosine increases human platelets levels of cGMP through nitric oxide possible role in its antiaggregating effect. **Thrombosis Research** v. 105, p. 71-780, 2002.

ANTONYUK, S. V.; STRANGE, R. W.; MARKLUND, S. L.; HASNAIN, S. S. The Structure of Human Extracellular Copper-Zinc Superoxide Dismutase at 1.7 Å Resolution: Insights into Heparin and Collagen Binding. **Journal of Molecular Biology** v. 388, p. 310-326, 2009

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S.. Ecto-nucleotidases on the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules and Diseases** v. 36, p. 217-222, 2006.

BAGATINI, M.; MARTINS, C.; BATTISTI, V.; SPANEVELLO, R.; GASPARETTO, D.; ROSA, C.; GONÇALVES, J.; SCHETINGER, M.; SANTOS, R.; MORSCH, V. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry** v. 41, p. 1181-1185, 2008.

BEGNI, B.; BRIGHINA, L.; FUMAGALLI, L.. Altered glutamate uptake in peripheral tissues from Down Syndrome patients. **Neuroscience Letters** v. 343, p. 73-76, 2003.

BITTLES, A. H; BOWER C; HUSSAIN R; The four ages of Down syndrome. **European Journal of Public Health** v. 17, p. 221-225, 2006.

BRUWIER, A.; CHANTRAIN , C. F.. Hematological disorders and leukemia in children with Down syndrome. **European Journal of Pediatrics** v. 171 p. 1301-1307. 2012.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiology Review** v. 87, p. 659-797, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: past, present and future. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 42, p. 3-8, 2009.

BURNSTOCK, G.. Purinergic nerves. **Pharmacology Reviews** v. 24, p. 509-81, 1972.

BUSCIGLIO, J.; CAPONE, G.; O'BYRAN, J.; GARDINIER, K. Down Syndrome: gene, model system and progress towards phamacotherapies and clinical trials for cognitive deficits. **Cytogenetic Genome Research** v. 141, p. 260-271, 2013.

BUTTERFIELD, A; PERLUIGI, M. The identification of protein biomarker for oxidative stress in Down Syndrome. **Expert Reviews of Proteomics** v. 8, p. 427-431, 2011.

CASADO, A.; LOPEZ-FERNANDEZ, E.; RUIZ, R. Lipid peroxidation in Down syndrome caused by regular trisomy 21, trisomy 21 robertsonian and mosaic trisomy 21. **Clinical Chemical Laboratory Medicine** v. 45, p. 59-62. 2007.

COLGAN, S. P.; ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T.; THOMPSON, L. F.. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalization** v. 2, p. 351, 360, 2006.

CRISTALLI, G.; COSTANZ, I. S.; LAMBERTUCCI, C.; LUPIDI, G.; VITTORI, S.; VOLPINI, R.; CAMAIONI, E.. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. **Medicinal Research Reviews** v. 21, p. 105 – 128, 2001.

CORRETGER J. M; Síndrome de Down: Aspectos médicos actuales. **Ed. Masson, para la Fundación Catalana del Síndrome de Down** p. 24-32, 2005.

DONNE J.; ROSSI R.; GUISTARINI, D; MILZANI A.; COLOMBO, R.. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta** v. 329, p. 23-39, 2003.

DUFFELS M. G.; VIS J. C.; VAN LOON R. E.. Down patients with Eisenmenger syndrome: is bosentan treatment an option? **International Journal of Cardiology** v. 134, p. 378-83, 2009.

DWYER, K. DEAGLIO, S. GAO, W. FRIEDMAN, D. STROM, T. ROBSON, S.. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergeric Signalization** v. 3, p. 171-180, 2007.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M., V.; ROBSON, S. C.. Purinergic Signaling during Inflammation. **Mechanisms of Disease - New England Journal of Medicine** v. 24, p. 367, 2012.

FALLON, U. B.; BEN-SHLOMO, Y; ELWOOD, P.; Homocysteine and coronary heart disease in the Caerphilly cohort: a 10 year follow up. **Hearth** v. 85, p. 153-158, 2001.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira** v. 43, p. 61-68, 1997.

FONTANA, P.; DUPPONT, A.; GANDRILLE, S.; BACHELLOT-LOZA, C.; RENY, J.; AIACH, M.; GAUCHEM, P. Adenosine diphosphate induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. **Circulation** v. 108, p. 989-995, 2003.

FORMIGARI, R; DI DONNATO, R. M; GARGIULIO, G.. Better Surgical Prognosis for Patients With Complete Atrioventricular Septal Defect and Down's Syndrome. **The Society of Thoracic Surgeons** v. 78, p. 666-672, 2004.

FRANCO, R.; VALENZUELA, A.; LIUIS, C.; BLANCO, J.; Enzymatic na-d extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes **Immunological Reviews** v. 61, p. 27 – 29, 1998.

FREEMAN S. B; BEAN L. H; ALLEN E. G; Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. **Genetics in Medicine** v. 10, p. 173-180, 2008.

FRID, C.; DROTT, P.; LUNDELL, B.; RASMUSSEN.. Mortality in Down's syndrome in relation to congenital malformations. **Journal of Intellectual Disability Research** v. 43, p. 234-241, 1999.

GAETANO G. Historical Overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. **The Journal of Hematology** v. 86, p. 349-356, 2001.

GOSH, S.; HONG, S.; FEINGOLD, E., Epidemiology of Down Syndrome: New Insight Into the Multidimensional Interactions Among Genetic and Environmental Risk Factors in the Oocyte. **American Journal of Epidemiology** v. 74, p. 1009-1016, 2011.

GRESELE, P.; FUSTER.; LÓPEZ J. A.. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders - a clinical handbook. **Cambridge University Press**. 2008.

GUSMÃO, F. A. F; TAVARES, E. J. M. TAVARES; MOREIRA, L. M. A. Maternal age and Down syndrome in Northeast Brazil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro** v. 19, p. 973-978, 2003.

GUTTERIDGE, J; HALLIWELL, B. Free Radicals in Biology and Medicine, 4a Edição, **Editora Oxford University Press**, 2007.

HUO, Y.; YUQING; LEY, K. F.. Role of Platelets in the Development of Atherosclerosis. **Trends in Cardiovascular Medicine** v. 14, p. 18-22, 2004.

ITALIANO Jr., J. E. The structure and production of blood platelets. **Platelets in hematologic and cardiovascular disorders**. Cambridge University Press, p.1-20, 2008.

JOHNSTON-COX, H. A.; KATYA, R. Adenosine and blood platelets **Purinergic Signalization** v. 7, p. 357-365, 2011

KAWASHIMA, Y; NAGASAWA, T; NINOMIYA, H; Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood** v.15, p. 2157 - 2162, 2002.

KUNAPULI, S. P.; DORSAM, R. T.; KIM, S.; QUINTON, T. M.. Platelet purinergic receptors. **Current Opinion in Pharmacology** v. 3, p. 175-180, 2003.

LOTT, I.; DORAN, E.; NGUYEN, V.; TOURNAY, V.; HEAD, E.; GILLEN, D.. Down syndrome and dementia: A randomized controlled trial of antioxidant supplementation. **American Journal of Medical Genetics** v. 155, p. 1939-1948, 2011.

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

MCCOY, E. E.; ENNS, L.. Sodium Transport, Ouabain Binding, and (Na⁺/K⁺)-ATPase Activity in Down's Syndrome Platelets. **Pediatric Research** v. 12, p. 685-689, 1978.

MCCOY, E. E.; SNEDDON, J. M.. Decreased calcium content and Ca²⁺ uptake in Down's syndrome blood platelets. **Pediatric Research** v. 18 p. 914-916. 1984.

MEHAR, S; NANDHA, K; SRIDHAR, M; Oxidative stress in children with Down syndrome. **Current Pediatric Research** v. 16, p. 111, 2012.

MELVILLE, C. A.; COOPER, S. A.; MCGROTHER, C.W.; Obesity in adults with Down syndrome: a case-control study. **Journal of Intellectual Disability Research** v. 49, p. 125 – 133, 2005.

MUCHOVA, J.; GARAIOVA, I.; SUSTROVA, M.; LIPTOKOVA, A.; BLAZIEK, P.; KWASNICKO, P.; DURACKOVA, Z. The redox state of glutathione in erythrocytes of individuals with Down syndrome. **Bratislava Medical Journal** v. 108, p. 70-74, 2007.

NI, H.; FREEDMAN, J.. PLATELETS in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. **Transfusion and Apheresis Science** v. 28, p. 257-264, 2003.

NISPEN, V. N. T. P.; HAAS, F.; GEERTS, W.; The platelet interior revisited: electron tomography reveals a tubular α -granule subtypes. **Blood** v. 116, p. 1147-1156, 2010.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S.; Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology Medicine** v. 31, p. 1287 – 312, 2001.

OKUHATA, R.; OTSUKA, Y.; TSUCHIYA, T.; KANZAWA, N.; Mutagenesis of apyrase conserved region 1 alters the nucleotide substrate specificity. **Plant Signaling Behavior** v. 8, 2013.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATTASTINI, A. M. O.; DIAS, R. D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E.C. 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets** v. 7, p. 225-230, 1996.

POGRIBNA, M.; MELNYK, S.; POGRIBNY, I.. Homocysteine Metabolism in Children with Down Syndrome: In Vitro Modulation. **American Journal of Human Genetics** v. 69, p. 88-95, 2001.

POURSHARIFI, P.; SAGHIRI, R.; EBRAHIMI-RAD, M.; NAZEM, H.; POURPAK, Z.; MOIN, M.; SHAMS, S.; Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 and ADA2 activities. **Clinical Biochemistry** v. 42, p. 1438 - 1443. 2009.

PRINCE, J; JIA, S; BÅVE, U.. Mitochondrial enzyme deficiencies in Down's syndrome. **Journal of neural transmission / Parkinson's disease and dementia section** v. 8, p 171-181, 1994.

REMIJIN, J.; WU, Y.; JENINGA, E.; IJSSELDIJK, M.; WILLIGEN, G.; GROOT, P.; SIXMA, J.; NURDEN, A.; NURDEN, P.. Role of ADP receptor P2Y₁₂ in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology** v. 22, p. 686-691, 2002.

ROBSON, S.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **PurinergicSignalling** v. 2, p. 409-430, 2006.

RUIZ, J. G.; FAJARDO-PICÓ, E.; AGUILAR-GARCÍA, J.. Discussion and review of the literature following the case of a young man with Down's syndrome and cerebral venous thrombosis. **Revista Médica Internacional sobre el Síndrome de Down** v. 15, p. 37-40, 2011.

SAFFIRIO, C; MARINO, B; FORMIGARI, R.. Better surgical prognosis for patients with Down syndrome. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery** v. 135, p. 230, 2008.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO, J. E.; FREEDMAN, J.. Platelets and the immune continuum. **Nature reviews** v. 11, p. 264-274, 2011.

SEVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N.; GUCKELBERGER, O.; CSIZMADIA, E.; QAWI, I.; IMAI, M.; ZIMMERMANN, H.; ROBSON, S. C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) **Blood** v. 99, p. 2801-2809, 2002.

SIES, H.. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology** v. 82, p. 391-295, 1997.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D.. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1355, 131-140, 1997.

SPANEVERELLO, R.M.; MAZZANTI, C.M.; BAGATINI, M.; CORREA, M.; SCHAMATZ, R.; STEFANELLO, N.; THOME, G. Activities of the enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from multiples sclerosis patients. **Journal of Neurology** v. 257, p. 24-30, 2010.

TARLACI, S.; SAGDUYU, A.. Cerebral venous thrombosis in Down's syndrome. **Clinical Neurology and Neurosurgery** v. 103, p. 242-244, 2001.

VAN DEN AKKER, M; MAASKANT, M. A; VAN DER MEIJDEN, R. J. M. Cardiac diseases in people with intellectual disability. **Journal of Intellectual Disability Research** v. 50, p. 515-522, 2006.

VAN TROTSENBURG, A. S.; VULSMA, T.; VAN ROZENBURG-MARRES. The effect of thyroxine treatment started in the neonatal period on development and growth of twoyear-old Down syndrome children: a randomized clinical trial. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 90, p. 3304-3311, 2005.

WANG, T.; GUIDOTTI, G.. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. **Brain Research** v. 790, p. 318-322, 1998.

WEIJERMAN, M. E; PETER, W. J.. The care of children with Down syndrome. **European Journal of Pediatrics** v. 169, p. 1445-1452, 2010.

WISEMAN, F.K.; ALFORD, K.A.; TYBULEWICZ, V.L.J.; FISHER, E.M.C.. Down syndrome-recent progress and future prospects. **Human Molecular Genetics** v. 18, p. 75-83, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, International Classification of Diseases (ICD). <http://www.who.int/classifications/icd/en/> Acessado em 18 de Outubro de 2012.

YEGUTKIN, G.. Nucleotide and nucleoside - converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1783, p. 673 – 694, 2008.

ZANA, M.; SZECSENYI, A.; CZIBULA, A.; BJELIK, A.; JUHASZ, A.; RIMANÓCZY, A.; SZABÓ, K.; VETRO, A.; SZUCS, P.; VARKONYI, A.; PAKASKI, M.; BODA, K.; RASHO, I.; JANKA, Z.; KALMAN, J. Age dependent oxidative stress induced DNA damage in Down's lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 345, p. 726-733, 2006

ZANINI, D.; SCHMATZ, R.; PELINSON, L. P.; PIMENTEL, V. C.; DA COSTA, P.; Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 374, p. 137-148, 2012.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **Biochemistry Journal**. v. 285, p. 345-365, 1992.

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

ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S.; SHUKLA, V.; LANGER, D.; GAMPE, K.; GRIMM, I.; DELIC, J.; BRAUN, N.. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**. v. 73, p. 537-566, 2007.

ZITNANOVÁ, I.; KORYTAR, P.; SABOTOVÁ, H.; HOROKOVA, L.; SUSTROVA, M.; PUESCHEL, S.; DURACKOVÁ, Z.. Markers of oxidative stress in children with Down Syndrome. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**. v. 44, p. 306-310, 2009.

ZUBENKO, G. S.; HOWLAND R.. Markedly increased platelet membrane fluidity in Down syndrome with a (14q, 21q) translocation. **Journal of Geriatry Psychiatry Neurology** v. 1, p. 218-219. 1988.