

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

**Administração intravenosa de apirase reduz
trombose arterial aguda em um modelo
experimental de lesão endotelial por cateter balão
*in vivo.***

Andry Fiterman Costa

Orientador:

Paulo Dornelles Picon

**Dissertação apresentada à Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
para a obtenção do Título de Mestre**

Outubro, 2002

**À Cláudia,
Minha colega,
Amiga, e
Amada esposa**

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Paulo Dornelles Picon, meu orientador e amigo, pela sua postura de vida, um exemplo a ser seguido, pela sua coerência em atitudes acadêmicas e profissionais, pelo seu constante estímulo ao crescimento. Muita honra tê-lo tido como orientador.

À Professora Dra. Ana Maria Battastini, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biociências da UFRGS, que tive o privilégio de conhecer e ter como co-orientadora, pelo seu constante estímulo e alto astral, pela sua paciência, pela sua grande contribuição técnica e científica.

Ao Professor Dr. João José Sarkis, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biociências da UFRGS, cujas idéias, apoio e sugestões foram fundamentais para a execução dos experimentos.

Às Dras. Ana Maria Kettlun e Maria Antonieta Valenzuela, do Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, pela elaboração da apirase, o que permitiu a realização de meu trabalho.

Ao Professor Dr. Jorge Pinto Ribeiro, Chefe do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que me acolheu em seu Serviço no transcorrer de meu Mestrado.

Aos Professores Dra. Nadine Clausell e Dr. Waldomiro Carlos Manfroi, Coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Medicina-Cardiologia da UFRGS durante o período da elaboração de meu Projeto, pelo estímulo e exemplo.

Ao Professor Dr. Flávio Dani Fuchs, que desde minha graduação foi um exemplo de Professor e Pesquisador, que certamente muito me influenciou para ingressar na pesquisa.

Ao meu pequeno e seletivo grupo de “aprendizes” de pesquisador que viabilizaram a realização de meu trabalho, sendo incansáveis nos feriados e férias que dispensaram comigo e com nossos coelhos. A estes amigos que fiz, meu especial muito obrigado: Paula Picon, Patrícia Gamermann, Marcos Mosmann.

À minha família, que é a “culpada” pela base que me ofereceu e que permitiu que todo o resto se solidificasse.

Aos amigos, que compreenderam muitas das ausências e estimularam constantemente.

Sumário

I – O Artigo em Inglês - “Intravenous apyrase administration reduces arterial thrombosis in a rabbit model of endothelial denudation <i>in vivo</i> ”	1
Abstract	2
Introduction	3
Material and Methods	5
Animals	5
Thrombosis triggering protocol	5
Apyrase administration	6
Death, aortic macroscopy and videoplanimetry	6
Determination of ADPase activity	7
Statistics	7
Results	8
Pilot Study	8
Measurement os serum ADPase activity	8
Rate of artherial trhombosis	9
Thrombus area measurement by planimetry	9
Discussion	9
The Evolution of the Model	9
The apyrase	11
Reference	16
Figure 1	20
Figure 2	21
Figure 3	22
II – O Artigo em Português - “Administração intravenosa de apirase reduz trombose arterial aguda em um modelo experimental de lesão endotelial por cateter balão <i>in vivo</i> ”	23
Resumo	24
Introdução	25
Material e Métodos	27
Animais	27
Protocolo indutor de trombose	28
Administração de apirase	28
Protocolo de morte, macroscopia e videoplanimetria	29
Determinação da atividade ADPásica	29
Análise estatística	30
Resultados	30
Estudo piloto	30
Aferição da Atividade apirásica	31
Taxa de trombose arterial	31
Aferição da área de trombose pela planimetria	32
Discussão	32
A evolução do modelo	32
A apirase	34
Referências	39
Figura 1	44
Figura 2	45
Figura 3	46

Intravenous apyrase administration reduces arterial thrombosis in a rabbit model of endothelial denudation *in vivo*

Running Head: apyrase administration on arterial thrombosis

Andry F Costa¹; Patrícia Gamermann³, Paula X Picon³, Marcos P Mosmann³, Ana Maria Kettlun², Maria Antonieta Valenzuela², João J F Sarkis³, Ana Maria O Battastini³ and Paulo D Picon^{4*}

1. Programa de pós-graduação em Cardiologia, Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, RS, Brasil.

2. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

3. Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

4. Serviço de Medicina Interna, Programa de Pós-Graduação em Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, RS, Brasil

*Corresponding author: Dr. P.D. Picon

Serviço de Medicina Interna

Rua Ramiro Barcelos 2350, 3º andar, sala 306

Bairro Rio Branco

90035003 Porto Alegre, RS – Brasil

Telephone: (51) 33168752 Fax: 33168751

E-mail: ppicon@hcpa.ufrgs.br

Abstract

The role of adenine nucleotides on vascular and platelet functions has long been established. Apyrase (CD39) takes part of a family of ecto-enzymes that hydrolyze adenosine di and triphosphate and its participation on thromboregulatory system is under study. We used an *in vivo* experimental model of acute arterial thrombosis to test the hypothesis that administering soluble form of potato apyrase could prevent thrombus formation. Twenty five white New Zealand male rabbits suffer balloon aortic endothelium denudation and fifteen days after were submitted to a thrombosis triggering protocol with a procoagulant (Russel's viper venom) and epinephrine. After the thrombosis triggering protocol 13 animals received two soluble apyrase administration (with 90 minutes interval) and 12 animals that received no treatment were used as controls. Three hours after the triggering protocol, the animals were killed and the rate and area of arterial thrombosis were analyzed. The rate of thrombosis in the apyrase group was significantly lower than the control group (69% vs. 16,7%, respectively, $P= 0,015$) as well as the area of thrombosis ($1,7 \text{ mm}^2 \pm 4,3$ vs. $21,7 \text{ mm}^2 \pm 37,4$, respectively, $P=0,008$). Our results confirm that apyrase do participate in homeostasis through a potent antithrombotic effect.

Key words: apyrase, NTPDase, CD39, thrombosis, experimental model, rabbits

Introduction

Plaque disruption and subsequent arterial thrombosis are considered the underlying mechanisms of most acute ischemic syndromes. Thrombus formation is closely related to increased platelet aggregability and adhesivity. Platelet deposition and thrombus formation take part both at the initiation of atherogenesis, at the growing of the plaque, and at the final events of clinical syndromes such as myocardial infarction and ischemic stroke. Besides platelet activation, other circulating molecules with pro- and anti-coagulability activities take part of this process. The endothelium, a highly selective barrier, produces a variety of active substances that have a fundamental role in the protection of the vascular wall. The endothelium non-thrombogenic surface is a result of the interaction of several products: prostaglandin, nitric oxide, plasminogen and ecto-nucleotidases among others [1-3].

Adenine nucleotides are released from activated endothelium and secreted in high concentration by platelets following their stimulation with exogenous ADP, collagen, thrombin or activated complement components. ADP, the first low molecular weight platelet aggregating agent, has different actions by interaction with specific receptors. In P_{2t} receptor of platelets, it causes amplification of platelet aggregability and in P_{2x} receptors, in smooth muscle cells, it causes vasoconstriction [4-6]. In the endothelium, acting in P_{2y} receptors, ATP stimulate the nitric oxide and prostacyclin production, which have an antiplatelet effect and cause vasodilatation [4-6]. Thus, in endothelium dysfunction a pro-coagulation state and vasoconstriction overcomes with consequent thrombus formation.

ATP diphosphohydrolase (ecto-apyrase; ATPDase or CD39), one of the critical thromboregulatory agents associated with the vascular endothelium, is a member of a family of cell surface enzymes which catalyses the hydrolysis of both ATP and ADP to AMP and orthophosphate [2,5,7,8]. A variety of studies demonstrated that ecto-

apyrase/CD39 inhibits platelets aggregation by hydrolyzing the ADP that is important in the regulation of platelet activation and blood viscosity [9,10]. The subsequent hydrolysis of AMP by ecto-5'-nucleotidase leads to the adenosine formation and contributes to the anti-aggregatory effect of the ecto-nucleotidase system [9,11]. It was also showed that ecto-apyrase modulates von Willebrand factor secretion induced by ATP [12]. In 1999, two works showed that loss of vascular ATPDase/CD39 might modulate progression of vascular injury [13,14].

Sequence analysis revealed amino acid homology between human CD39 and soluble apyrase from potato tubers [7,15]. In fact, there is a straight homology among apyrases expressed throughout animal and vegetable kingdom [15]. Truncated derivatives containing enzymatic active site for systemic administration of NTPDase were developed. Gayle III *et al.* [16] designed a recombinant, soluble form of human CD39 which blocked ADP-induced platelet aggregation *in vitro*, and inhibited collagen-induced platelet reactivity. In a study of xenograft rejection, apyrase administration significantly prolonged graft survival [17]. More recently, recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolonged cardiac xenograft survival [18,19]. Gangadharan *et al.* [20] observed a decrease in NTPDase activity in the arterial wall in animals submitted to the experimental model of balloon endothelial denudation. They also showed that adenovirus-mediated transfer the human CD39 gene restore ADPase activity and enhanced local thromboresistance.

Experimental models of atherosclerosis and thrombosis are useful for testing antithrombotic interventions. In 1960, Constantinides and Chakravarti [21] developed an *in vivo* experimental model with New Zealand male rabbits submitted to a cholesterol-enriched diet. After 8 months thrombosis was induced over advanced atherosclerotic plaques with the administration of a procoagulant (Russell's viper venom - Rvv) plus a

vasoconstrictor (histamine and epinephrine). This model has still been used [22] and has been suffering adaptations and modernizations. With the modifications introduced by our group through the addition of balloon-induced mechanical lesion, the time to thrombosis was reduced to 4 months [23]. Subsequently we showed that the chemical lesion is not necessary [24] and also that one-month was enough (Scipioni PP, personal communication). It is noteworthy that when animals were treated with Rvv and epinephrine immediately after the balloon injury only 6 hours were enough to induce arterial thrombosis in 71% of the animals [25].

In the present work, we investigated the effect of administration of soluble potato apyrase on prevention of thrombosis in a three-hour model.

Material and Methods

Animals

Twenty seven New Zealand white rabbits were studied (mean age, 3 months; mean weight, 2,5-3,5 kg). Twelve rabbits were submitted to administration of soluble purified potato apyrase. A group of thirteen animals that did not receive any NTPDase administration were used as controls. Two rabbits died during the anesthesia of the denudation procedure before the randomization and were excluded from any analysis.

Thrombosis triggering protocol:

Animals were anesthetized with ketamine (10 mg/kg, intramuscular) and diazepam (1mg, intravenous). A 3 cm longitudinal incision was made in inguinal region and right femoral artery was dissected. A Fogarty 3F catheter (Baxter) was introduced through right femoral artery up to aortic arch. The balloon was inflated with 0,8 ml of air and pulled until it reached right femoral artery. This procedure was repeated once more. The femoral artery

was tied up and operative wound was closed. Fifteen days later all animals received thrombosis-triggering treatment consisting of intraperitoneal administration of 100 µg/kg procoagulant, Rvv (Sigma Co.-Saint Louis, USA), followed after thirty minutes of epinephrine 20 µg/kg intravenously.

Apyrase Administration

Immediately after receiving the thrombosis triggering protocol, twelve animals received two intravenous administration of purified potato apyrase. The lyophilized apyrase – prepared as described by Kettlun *et al.* [26] – was diluted in 200 U/ml in deionized water and given at a dose of 100U per rabbit at each administration. The thirteen control group animals received no intervention other than the thrombosis triggering protocol.

Death, aortic macroscopy and videoplanimetry

Animals were killed three hours after the thrombosis triggering protocol by intracardiac lidocaine injection after receiving anesthesia with ketamine and diazepam. The thorax and abdomen were opened and aorta and iliac arteries were dissected and removed in block. The block was opened in a longitudinal manner and fixed in a plan surface. The presence of thrombus was analyzed, pictures were taken and video-planimetry of the aorta and thrombus were performed for area measurement of thrombi. The surface area of thrombi was expressed in square millimeters (mm²).

Determination of ADPase activity

A pilot study with 3 rabbits was done in order to standardize the measurements of apyrase activity in rabbits and to test the tolerability of administrating apyrase intravenously.

During the experiment several blood samples were collected. Blood samples were put at room temperature to spontaneous coagulation and centrifuged to obtain serum samples. The reaction medium used to assay the ADPase activity contained (final concentration) 45 mM TRIS-HCl (pH 8,0) and 1,5 mM CaCl in a final volume of 200 μ l. Twenty microliters of serum was added to the incubation medium and pre-incubated for 10 minutes at 37°C. Enzyme reaction was started by the addition of ADP to a final concentration of 3.0 mM and stopped after 40 min by the addition of 200 μ l 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 min and 100 μ l samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) as described by Chan *et al.* [27]. Incubation time and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. Controls with the addition of serum after the addition of trichloroacetic acid were used to correct non-enzymatic hydrolysis of the substrate. All samples were run in triplicate. The enzyme activity was expressed as nmolPi/min/ml.

Statistics

Sample size calculation: we previously defined that, to detect a difference of 50% in the incidence of thrombosis between the groups, considering an incidence of 71% in the control group, a power (1- β) of 80% and a two-side significance of 5%, 17 animals would be necessary in each group. When 25 animals were done, an interim analysis showed that the incidence of thrombosis in the apyrase group was lower than the initially expected and the study was terminated. The variation of apyrase activity was compared with ANOVA for repeated measures. The incidence of thrombosis in the two groups was compared using a Fisher exact test and, total thrombi area was compared between the two groups using Mann-Whitney test.

Results

Pilot study

Using 30 samples from three animals in a pilot study we noticed that the serum measurement of apyrase activity in normal rabbits varied between 6 to 12 nmolPi/ml/min. We also showed that after administrating a single intravenous injection of 100 IU of apyrase, the serum activity increased about 10 to 20 times. From that pilot study the estimated half-life was about 30 minutes (Figure 1). From that data we decided that two administrations with 90 minutes interval would be necessary to provide a three-hour anti-thrombotic effect.

ADPase activity was analyzed before and after all the intervention procedures (anesthesia, balloon denudation, Rvv, epinephrine and apyrase administration and death) in 3 rabbits. None of these procedures but apyrase administration had any effect on serum ADPase activity.

Measurement of serum ADPase activity

Since we previously observed that none of the interventions other than the apyrase administration had any influence on its serum activity, the serum ADPase activity was performed only in the group of animal which receive the enzyme. Serum ADPase activity increased significantly after the intravenous administration of the enzyme. It varied from 12,3 nmolPi/ml/min before apyrase administration to 134 nmolPi/ml/min immediately after the first injection. Ninety minutes after the administration serum ADPase activity was 19,7 nmolPi/ml/min. A second administration at this time increased its activity to 120,9 nmolPi/ml/min. At the moment of the death of the rabbits, 90 minutes after the second

injection, serum ADPase activity was 14,58 nmolPi/ml/min. Figure 2 illustrates such sequence of events and shows that statistical significant difference were obtained for the serum apyrase activity in each measurement obtained immediately after the injection.

Rate of arterial thrombosis:

Nine out of 13 animals (69%) in the control group developed thrombosis. Of the 12 animals that received apyrase, only two (16,7%) developed thrombosis (one in the femoral artery and one animal had two thrombi, one in the abdominal aorta and one in the right femoral artery) (Fisher Exact Test $P=0,015$ RR 0,24; 95% IC 0,06-0,9,) (Figure 3).

Thrombus area measurement by planimetry

The mean thrombi area in the control group was 21,7 mm² (SD 37,4). The mean thrombi area in the apyrase group was 1,7 mm² (SD 4,3). This difference was statistically significant (Mann-Whitney test $P=0,008$).

Discussion

The Evolution of the Model

It is well known that atherosclerosis can be induced in experimental models of endothelial lesion and hyperlipidemia [28,29]. In 1961, Constantinides and Chakravarti [21] for the first time developed an experimental model of atherosclerosis and thrombosis *in vivo* by pharmacologic manipulation of coagulation and haemodynamic factors. They induced atherosclerosis in New Zealand white rabbits by the administration of a cholesterol-enriched diet for eight months. At the end of the dietary treatment, arterial thrombosis was induced by a two-day administration of Rvv, followed by injection of a

vasoconstrictor. Baumgartner [30] showed that balloon denudation could also be used to induce arterial wall lesion and accelerate atherosclerotic process. Abela *et al.* [23] reproduced the experimental model described by Constantinides and Chakravarti and showed that the association of the chemically induced lesion by cholesterol and the balloon denudation lesion used together not only accelerated the atherosclerosis process, but also increased the thrombogenicity of the model. After only four months of chemical plus mechanical injury 71% of the animals developed thrombus. Our group have shown that no cholesterol lesion was necessary [24] and that 4 weeks was enough to the development of thrombus (Scipioni PP, personal communication). In another adaptation of the original model, we demonstrated that the same rate of thrombosis could be obtained with a hyperacute model of lesion and thrombosis. Rvv and vasoconstrictor agent were administered immediately after the balloon denudation with the rabbits being killed 6 hours after this procedure [25]. In this model of acute injured endothelium and the pro-thrombotic state, thrombosis was observed also in 71% of the animals. In the present study a new modification was introduced. The endothelium denudation was performed 2 weeks before the induction of the pro-thrombotic state. We also used a smaller dose of the Rvv (100 µg/kg intraperitoneally) followed after 30 minutes by epinephrine and killed the animals 3 hours after that triggering treatment. Reducing Rvv dose and time to killing we intent to decrease the high thrombogenicity of this model. Although not reducing the thrombosis rate, the area of the thrombi was significantly reduced in this evolution of the model. In the first 4 month study and two doses of Rvv plus epinephrine in two consecutive days we found a mean area of thrombosis of 194 ± 182 mm² [24]. In the one-month study whereas only one dose of Rvv plus epinephrine was administered the mean thrombosis area was

65,9 ± 96,1 mm² (Scipioni PP, personal communication). In the study where animals were killed after 6 hours of balloon-injury and triggering treatment [25] the mean area of thrombosis was 52,9 ± 50,5 mm². In the present study we found a smaller mean area of thrombosis (21,7 ± 37,4 mm²). This positive correlation between time to killing, number and amount of Rvv used and thrombi area might indicate a decrease in the thrombogenicity of the model.

The present study was the first to demonstrate a significant difference in the incidence of thrombosis after a pharmacological intervention using this model.

The apyrase

Many studies have demonstrated that apyrase might have an important role in the maintenance of homeostasis. The role of ADP in platelet aggregation was first demonstrated by Hellen *et al.* in 1960 [31] and confirmed by Gaardner *et al.* in 1961 [32]. After those pioneer studies, many other authors have demonstrated that adenosine nucleotides and its metabolites and enzymatic pathways do participate in homeostasis [33].

Lieberman *et al.* [34] detected antiplatelet activity in homogenized tissue of rabbit aorta. This effect seemed to depend on an enzyme activity that hydrolyzed ADP. Yagi *et al.* [35] purified an enzyme that hydrolyzed ATP and ADP from bovine aorta. The same group [36] showed that this enzyme was an ecto-ATPase and -ADPase with activity in both endothelial and smooth muscle cells. Many other studies confirmed the presence of this ecto-enzyme that has the ability of controlling platelet aggregability on vascular wall [7,9,37]. Cote *et al.* [38] also showed ATPDase activity in endothelium and smooth muscle cells in bovine aorta, and proposed its role in platelet aggregation and in control of vascular

tone. The same group [39] showed that the concentration of the enzyme is different in intimal and media layers and suggested a dual role for it: by converting ATP released from damaged cells into ADP it could induce platelet aggregation at the site of the injury and the subsequent conversion of ADP to AMP and adenosine could limit this aggregation. The ability of CD39 in regulating extracellular ATP concentration was demonstrated in cultures of human endothelial cells [13]. Using stable 25-base antisense chimeric oligonucleotides targeting sequences at the 5' region of CD39 to suppress CD39 synthesis, the total ADPase activity fell and the concentration of extracellular nucleotides increased.

Kaczmarec *et al.* [7] demonstrated that ATPDase can inhibit platelet aggregation *in vitro* in response to ADP, collagen and thrombin, and that this activity is lost following exposure to oxidative stress. Marcus *et al.* [40] also showed the importance of apyrase in the control of platelet aggregability. They showed that even after blocking prostacyclin and nitric oxide, the endothelial cells still had an anti-aggregability activity.

All those *in vitro* studies made a solid background and justified the development of *in vivo* models to test the antithrombotic effect of CD39. The initial *in vivo* studies have also shown indirect evidences of an antithrombotic effect of apyrase. Three studies of experimental xenograft rejection, where endothelial cell activation, platelet aggregation and microthrombosis play a central role [10,41], were used to study the potential benefit of CD39. In the first study [17] the administration of a soluble form of CD39 prolonged xenograft survival. It was also shown that the onset and the extent of platelet deposition was attenuated in the apyrase group and that serum from apyrase-treated animals inhibited platelet aggregation induced by ADP *in vitro*. The studies of Imai *et al.* [18,19] showed that supplementation of NTPDase activity within xenograft vasculature using CD39 recombinant adenovirus (AdCD39) had protective effects *in vivo*. AdCD39 infection

limited platelet sequestration and inhibited inflammation besides prolonging graft survival. The main mechanism associated with prolongation of xenograft survival is supposed to be inhibition of platelet deposition and thrombosis. Our results are in agreement with that explanation.

Pinsky *et al.* [42] utilized an experimental model of brain ischemia in mice and studied the effect of administering recombinant soluble human CD39 (solCD39) to wild type mice and CD39^{-/-} mice. The CD39^{-/-} mice were generated by the elimination of the enzymatically active extracellular domain (apyrase-conserved regions 2-4) of the CD39 gene and demonstrated no obvious phenotype (baseline hematological and coagulation profiles were normal). In those mice, solCD39 inhibited platelet and fibrin accumulation in the ipsilateral cerebral hemisphere following induction of stroke, improved postischemic cerebral perfusion, reduced neurological deficit and mortality as compared to no treatment and to aspirin. No increase in intracerebral hemorrhage was observed with solCD39, whereas aspirin did increase it. Once CD39 blocks only ADP induced platelet activation and that in the dysfunctional endothelium other platelet activators are involved, platelets do adhere to subendothelium tissue to maintain vascular integrity. Through ADP hydrolysis CD39 will then reduce platelet adhesion and thrombosis will not overcome. Hemorrhage does not occur because ruptured endothelium was plugged by platelets. In our experiments, we did demonstrate a decrease in thrombi formation, and although not measured, no hemorrhage tendency was observed in the apyrase group during surgical procedures before death.

The first CD39-deficient mice was developed by Enjyoji *et al.* [14] through disruption of the CD39 gene by homologous recombination. Both ATPase and ADPase activities were decreased in CD39^{-/-} endothelial cell cultures. Plasma ATP and ADP

concentration in CD39^{-/-} mice were similar to those in wild-type mice. Peripheral blood platelet count in CD39^{-/-} mice were 20% lower than those in wild-type controls. Bleeding times were prolonged in CD39^{-/-} mice. Platelet plug formation *in vivo* was also delayed after mesenteric arterioles injury in the CD39^{-/-} mice. Platelets purified from CD39^{-/-} mice failed to fully aggregate to ADP, collagen or low doses of thrombin *in vitro*. When treated with soluble ATPDase, these platelets restored aggregatory potential. Enjyoji *et al.* [14] also transplanted mouse hearts into rats sensitized 7 days before transplantation. The survival times of functioning CD39^{-/-} cardiac grafts were significantly shorter than the wild-type. CD39^{-/-} grafts showed more widespread parenchymal injury, infarction and hemorrhage besides a more evident endothelial cell activation, platelet aggregation, increased P-selectin expression and fibrin deposition.

The differences in phenotype in the mice described by Enjyoji *et al.* [14] and by Pinsky *et al.* [42] may be explained by the fact that Enjyoji *et al.* targeted the ATG start site and a portion of the 5'UTR, whereas Pinsky *et al.* focused on elimination of the enzymatically active extracellular domain. Gene disruption may affect cell populations that may secondarily affect phenotype. Other possible explanation is the involvement of other enzymes that could be suppressed by gene disruption and not affected by Pinsky *et al.* [42] technique. Although in those studies conflicting results were found with respect to thrombus formation or bleeding tendencies, from our results the anti-thrombotic effect hypothesis attributed to apyrase is reinforced.

Recently, a novel enzyme that hydrolyses ATP and ADP has been described [43]. This new nucleotide phosphohydrolase have shown to control platelet aggregation corroborating the importance of ATPases and ADPases on homeostasis. This enzyme may

also explain the discordant phenotypes of CD39-null mice from Enjyoji and Pinsky, which has shown different coagulation patterns.

While our study was in progress, Ganagadharan *et al.* [20] published a study using an experimental model similar to ours but with no thrombosis induction to test the effect of CD39 gene transfer in endothelial and smooth muscle cells. They showed that AdCD39 infection increases the adenosine diphosphatase activity by 40-fold in endothelial cells and by 3-fold in smooth muscle cells. They also showed that the balloon denudation causes a significant reduction in the NTPDase activity in the wall of the injured vessel and that AdCD39 infection augments this activity. No difference in platelet deposition on the injured arterial surface was observed comparing the infected and non-infected vessels. They justify this finding by the modest platelet deposition found in both groups. In a previous study of our group [25] we also observed a reduction in the ATPDasic activity on the wall of the aorta of rabbits submitted to balloon denudation. In the present study of acute arterial macro-thrombosis we could demonstrate that apyrase has a strong anti-thrombotic effect. Our findings are in accordance with all the available knowledge accumulated. The significant reduction in thrombosis rate by the administration of soluble potato apyrase was even greater than we expected.

We did not objectively evaluate platelet count and coagulation parameters but the subjective impression was that the blood took longer to coagulate after the apyrase administration. Further studies controlling these parameters are to be done.

The role of ADP on the physiopathology of thrombosis has long been studied and the benefits of its manipulation are well established: The CURE [44] is an example of a clinical study with an ADP inhibitor – Clopidogrel – that has proved to be beneficial in patients with acute coronary syndromes.

Conclusions

The present study was the first to demonstrate the increase in ADPase serum activity after intravenous administration of soluble potato apyrase in rabbits. Also we were able to show a significant reduction in the incidence and size of thrombi in a model of *in vivo* aortic acute thrombosis. We conjecture that in a near future apyrase will be an alternative for clinical practice.

References

1. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med* 1996; **47**: 315-331.
2. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1351-1360.
3. Schafer AI. Vascular endothelium: in defense of blood fluidity. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1143-1144.
4. Rongen GA, Floras JS, Lenders JW, Thien T, Smits P. Cardiovascular pharmacology of purines. *Clin Sci (Lond)* 1997; **92**: 13-24.
5. Koziak K, Sevigny J, Robson SC, Siegel JB, Kaczmarek E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1538-1544.
6. Rongen GA, Smits P, Thien T. Characterization of ATP-induced vasodilation in the human forearm vascular bed. *Circulation* 1994; **90**: 1891-1898.
7. Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 1996; **271**: 33116-33122.
8. Sevigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 2002; **99**: 2801-2809.
9. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Pinsky DJ, Islam N, Maliszewski CR. Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD39/ecto-ADPase: significance for occlusive vascular diseases. *Ital Heart J* 2001; **2**: 824-830.

10. Robson SC, Cooper DK, d'Apice AJ. Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2000; **7**: 166-176.
11. Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 2000; **96**: 2157-2162.
12. Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, Robson SC. CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med* 2000; **6**: 591-603.
13. Imai M, Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Goepfert C, Guckelberger O, Csizmadia E, Schulte Am EJ, Robson SC. Suppression of ATP diphosphohydrolase/CD39 in human vascular endothelial cells. *Biochemistry* 1999; **38**: 13473-13479.
14. Enjyoji K, Sevigny 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. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 1999; **5**: 1010-1017.
15. Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 916-923.
16. Gayle RB, III, Maliszewski CR, Gimpel SD, Schoenborn MA, Caspary RG, Richards C, Brasel K, Price V, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Broekman MJ, Marcus AJ. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1851-1859.
17. Koyamada N, Miyatake T, Candinas D, Hechenleitner P, Siegel J, Hancock WW, Bach FH, Robson SC. Apyrase administration prolongs discordant xenograft survival. *Transplantation* 1996; **62**: 1739-1743.
18. Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Lin Y, Sevigny J, Kaczmarek E, Goepfert C, Enjyoji K, Bach FH, Rosenberg RD, Robson SC. CD39/vascular ATP diphosphohydrolase modulates xenograft survival. *Transplant Proc* 2000; **32**: 969.
19. Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Kaczmarek E, Csizmadia E, Bach FH, Robson SC. Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. *Transplantation* 2000; **70**: 864-870.
20. Gangadharan SP, Imai M, Rhyhart KK, Sevigny J, Robson SC, Conte MS. Targeting platelet aggregation: CD39 gene transfer augments nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in injured rabbit arteries. *Surgery* 2001; **130**: 296-303.
21. Constantinides P, Chakravarti RN. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. *Archives of Pathology* 1961; **72**: 79-90.
22. Johnstone MT, Botnar RM, Perez AS, Stewart R, Quist WC, Hamilton JA, Manning WJ. In vivo magnetic resonance imaging of experimental thrombosis in a rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 1556-1560.

23. Abela GS, Picon PD, Friedl SE, Gebara OC, Miyamoto A, Federman M, Tofler GH, Muller JE. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation* 1995; **91**: 776-784.
24. Picon PD, Goncalves SC, Wainstein MV, Costa AF, Mengarda CV, Machado RP, Berlim GL, Edelweiss M, Edelweiss MI, Ribeiro JP. Atherosclerosis and acute arterial thrombosis in rabbits: a model using balloon desendothelization without dietary intervention. *Braz J Med Biol Res* 1997; **30**: 415-417.
25. Iturry-Yamamoto GR, Battastini AMO, Martins NLC, Edelweiss MI, Rosig LM, Sarkis J.J., Ribeiro JP, Picon PD. Acute Arterial Thrombosis induced by endothelial injury and activation of blood coagulation: the role of the ATP diphosphohydrolase (ecto-apyrase). *Thromb Haemost* 2002; Submitted.
26. Valenzuela MA, Kettlun AM, Sandoval S, Garcia L, Mancilla M, Neckelmann G, Chayet L, Alvarez A, Cuevas F, Collados L, Espinosa V, Traverso-Cori A, Bravo I, Acevedo CG, Aranda E. Comparison of the biochemical properties, regulation and function of ATP-diphosphohydrolase from human placenta and rat kidney. *Braz J Med Biol Res* 1996; **29**: 589-597.
27. Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; **157**: 375-380.
28. Anitschkow N. Experimental Atherosclerosis in animals. In: Cowdry EV (editor). *Arteriosclerosis - A Survey to the Problem*. New York: MacMillan, 1933.
29. Sslowjew A. Experimentelleuntersuchungen über die bedeutung von lokader schädigung für die lipoidablagerung in der arterienwand. *Zeitschr F D Exper Med* 1929; **69**: 94-97.
30. Baumgartner HR. Eine neue methode zur erzeugung vor thromben durch gezielte uberdehnung der gefässwand. *S Ges Exp Med* 1963; **137**: 227.
31. Hellem A. The adhesiveness of human blood platelets in vitro. *Scand J Clin Lab Invest* 1960; **12**: 1-6.
32. Gaarder A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owren PA. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* 1961; **192**: 531-532.
33. Robson SC, Sevigny J, Imai M, Guckelberger O, Enjyoji K. Thromboregulatory potential of endothelial CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase: modulation of purinergic signalling in platelets. *Emerging Therapeutic Targets* 2000; **4**: 155-171.
34. Lieberman GE, Lewis GP, Peters TJ. A membrane-bound enzyme in rabbit aorta capable of inhibiting adenosine-diphosphate-induced platelet aggregation. *Lancet* 1977; **2**: 330-332.
35. Yagi K, Arai Y, Kato N, Hirota K, Miura Y. Purification of ATP diphosphohydrolase from bovine aorta microsomes. *Eur J Biochem* 1989; **180**: 509-513.
36. Yagi K, Shinbo M, Hashizume M, Shimba LS, Kurimura S, Miura Y. ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **180**: 1200-1206.

37. Sevigny J, Levesque FP, Grondin G, Beaudoin AR. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1334**: 73-88.
38. Cote YP, Picher M, St Jean P, Beliveau R, Potier M, Beaudoin AR. Identification and localization of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1078**: 187-191.
39. Cote YP, Filep JG, Battistini B, Gauvreau J, Sirois P, Beaudoin AR. Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovine aorta: evidence for a regulatory role in platelet activation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1139**: 133-142.
40. Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA, Ullman HL, Islam N, Broekman MJ, Eiroa AM. Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1690-1696.
41. Robson SC, Schulte Am EJ, Bach FH. Factors in xenograft rejection. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **875**: 261-276.
42. Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES, Jr., Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1031-1040.
43. Birk AV, Bubman D, Broekman MJ, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, Szeto HH. Role of a novel soluble nucleotide phospho-hydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: hemostasis, thrombosis, and vascular biology. *J Lab Clin Med* 2002; **139**: 116-124.
44. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001; **345**: 494-502.

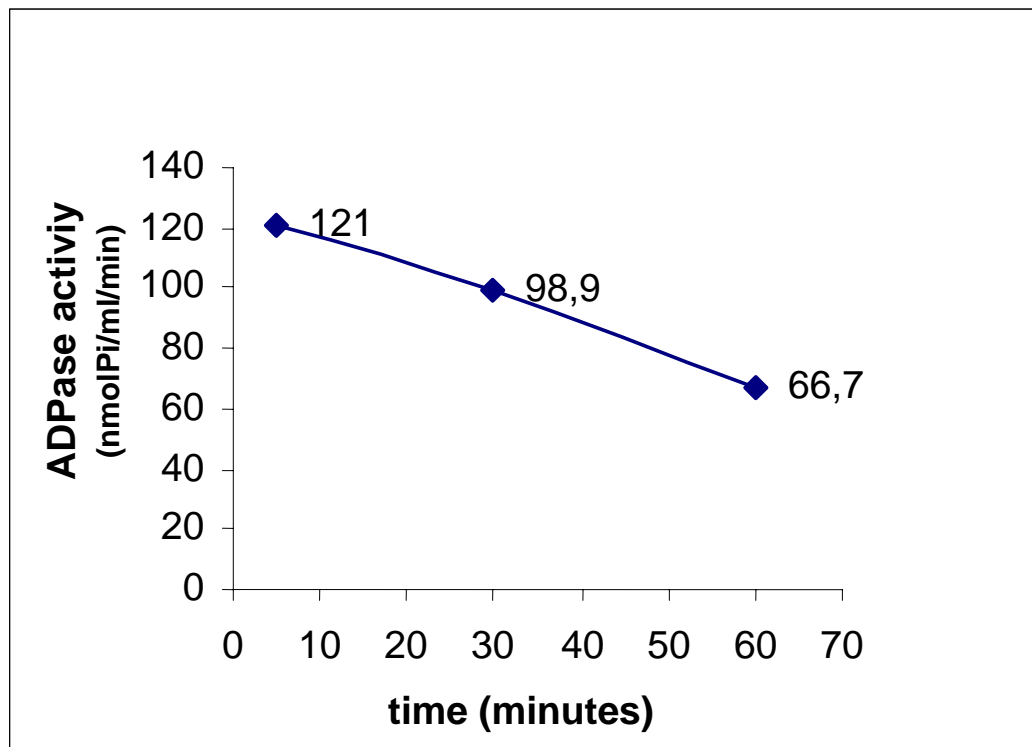


Figure 1. Pharmacokinetic analysis of soluble potato apyrase in rabbits. Soluble apyrase was intravenously administered (100 IU in 1 ml of water) to rabbits. At various time points blood samples were taken and ADPase activity was measured. The figure shows data from one rabbit representative of the experiment.

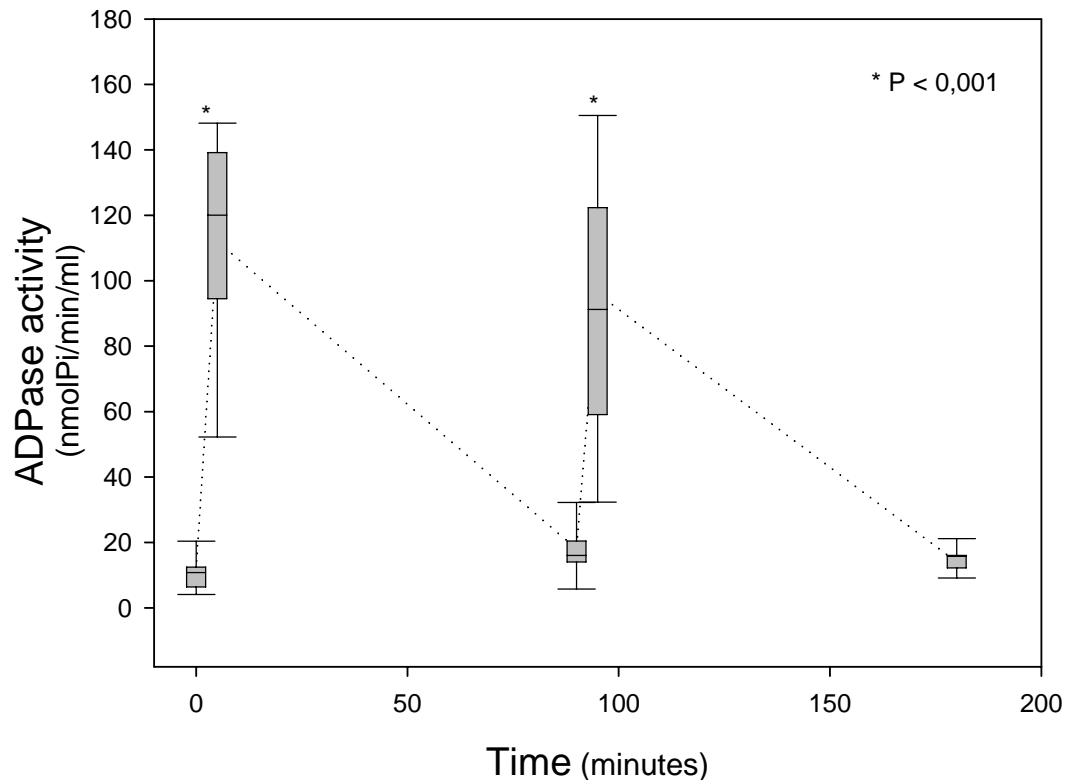


Figure 2. ADPase activity in the apyrase group during the experiment. The central horizontal bars, columns, and peripheral horizontal bars indicate the median values, between the 25th and 75th percentile, and the 10th and 90th percentile, respectively. The dotted line shows the variation of the mean ADPasic activity. The first box-plot is the basal ADPasic activity of the rabbit. The second and the forth box-plot represent the ADPasic activity 5 minutes after each apyrase administration, and the third and the fifth represent the activity 90 minutes after each injection. Significant differences ($P < 0,001$) are observed between the 5th and 95th minutes (after each apyrase administration) and the other measurements (time 0, 90 and 180 minutes, before each injection and at the moment of the death, respectively).

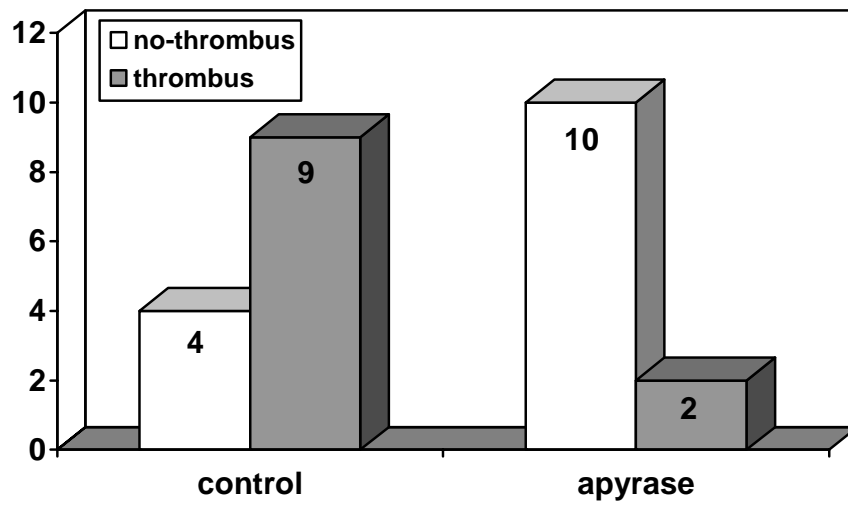


Figure 3. Incidence of thrombosis in the apyrase and control groups. The absolute incidences are presented for each group. A statistically significant reduction in thrombosis incidence is observed in the apyrase group (Fisher Exact test $P = 0,015$)

Resumo

O papel dos nucleotídeos da adenina na função vascular e plaquetária já está bem estabelecido. Apirase (CD39) faz parte de uma família de ecto-enzimas capazes de hidrolisar nucleosídeos di- e trifosfatados da adenosina e sua participação no sistema tromborregulador tem sido estudada. Nós utilizamos um modelo experimental *in vivo* de trombose arterial aguda para testar a hipótese de que a administração de apirase solúvel pode prevenir a formação de trombos. Vinte e cinco coelhos brancos Nova Zelândia foram submetidos à lesão arterial com cateter balão e, após 15 dias, a um protocolo indutor de trombose. Treze animais receberam duas administrações intravenosas de apirase solúvel (com 90 minutos de intervalo) e 12 animais foram utilizados como controle. Após 3 horas do protocolo indutor de trombose, os animais foram mortos e a taxa e área de trombose foram avaliadas. A taxa de trombose no grupo apirase foi significativamente menor que no grupo controle (69% vs. 16,7%, respectivamente, $P=0,015$) assim como a área de trombose ($1,7 \text{ mm}^2 \pm 4,3$ vs. $21,7 \text{ mm}^2 \pm 37,4$, respectivamente, $P=0,008$). Nossos resultados confirmam a participação da apirase na homeostasia através de um potente efeito anti-trombótico.

Palavras chave: apirase, NTPDase, CD39, trombose, modelo experimental, coelhos

Introdução

Ruptura da placa aterosclerótica e subsequente trombose arterial são consideradas os mecanismos principais do desenvolvimento da maioria das síndromes isquêmicas agudas. A formação do trombo está fortemente relacionada com o aumento da agregabilidade e adesividade plaquetárias. Deposição plaquetária e trombose tomam parte das várias fases do processo aterosclerótico, desde o início da aterogênese passando pelo crescimento da placa até o evento final das síndromes clínicas como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico. Além da ativação plaquetária, outras moléculas circulantes com atividade pró- e anticoagulante tomam parte neste processo. O endotélio, uma barreira altamente seletiva, produz uma variedade de substâncias ativas que apresentam um papel fundamental na proteção da parede vascular. A superfície não trombogênica do endotélio é o resultado da interação de vários produtos: prostaglandinas, óxido nítrico, plasminogênio, ecto-nucleotidases entre outros [1-3].

Nucleotídeos da adenina são liberados pelo endotélio ativado e secretados em altas concentrações pelas plaquetas após sua estimulação por ADP exógeno, colágeno, trombina ou componentes ativados do complemento. ADP, o primeiro agente pró-agregante plaquetário de baixo peso molecular, tem diferentes ações em receptores específicos. Nos receptores P_{2t} das plaquetas, causa amplificação da agregação plaquetária e em receptores P_{2x} das células musculares lisas causa vasoconstrição [4-6]. No endotélio, agindo em receptores P_{2y} , o ATP estimula a produção de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), os quais apresentam efeito antiplaquetário e causam vasodilatação [4-6]. Desta forma, em situações de disfunção endotelial, um estado pró-coagulante e de vasoconstrição sobressai com a consequente formação do trombo.

ATP difosfohidrolase (ecto-apirase, ATPDase ou CD39), um dos agentes críticos associados à trombo-regulação ligada ao endotélio vascular, é um membro de uma família de enzimas de superfície celular que catalisam a hidrólise de ATP e ADP para AMP e

ortofosfatos [2,5,7,8]. Vários estudos têm demonstrado que a ecto-apirase inibe a agregação plaquetária por hidrolisar o ADP, que é um importante regulador da agregação plaquetária e da viscosidade sanguínea [9,10]. A subsequente hidrólise do AMP pela ecto-5'-nucleotidase leva a formação de adenosina, o que contribui para o efeito antiagregante plaquetário do sistema da ecto-nucleotidase [9,11]. Também tem sido demonstrado que a ecto-apirase modula a secreção do fator de Von Willebrand induzida por ATP [12]. Em 1999, dois outros estudos demonstraram que a perda da ATPDase vascular pode estimular a progressão da injúria vascular [13,14].

Análise de seqüência revelou homologia de aminoácidos entre CD39 humano e a apirase solúvel de batatas [7,15]. Há, de fato, uma estreita homologia entre as apirases dos reinos animal e vegetal [15]. Derivados contendo sítios enzimáticos ativos para a administração sistêmica de NTPDase foram desenvolvidos. Gayle III *et al.* [16] produziu uma forma recombinante solúvel de CD39 que bloqueou a agregação plaquetária induzida *in vitro* por ADP e inibiu a reatividade plaquetária ao colágeno. Em um estudo de rejeição de xenoenxerto, a administração de apirase prolongou significativamente a sobrevida do enxerto [17]. Mais recentemente, transferência gênica de adenovírus contendo CD39 (AdCD39) prolongou a sobrevida de xenotransplante cardíaco [18,19]. Gangadharan *et al.* [20] observaram uma diminuição na atividade NTPDásica nas paredes arteriais de animais submetidos ao modelo experimental de lesão endotelial com cateter balão. Neste trabalho foi demonstrado, também, que a infecção por AdCD39 restaurava a atividade ADPásica e aumentava a trombo-resistência local.

Modelos experimentais de aterosclerose e trombose são úteis para avaliar intervenções antitrombóticas. Em 1960, Constantinides e Chakravarti [21] desenvolveram um modelo experimental *in vivo* com coelhos branco Nova Zelândia submetidos a dieta

enriquecida com colesterol. Após 8 meses de tratamento dietético, trombose foi induzida sobre placas ateroscleróticas avançadas através da administração de um pró-coagulante (veneno de víbora Russelis - vvR) associado a um vasoconstritor (histamina e adrenalina). Este modelo continua sendo utilizado atualmente [22] sofrendo adaptações e modernizações com o tempo. Com modificação realizada por nosso grupo, através da adição de lesão mecânica através de cateter balão, o tempo para o desenvolvimento de trombose foi reduzido para 4 meses [23]. A seguir demonstramos que a lesão química não era necessária [24] e que um mês era suficiente (Scipioni PP, comunicação pessoal). Animais tratados com vvR e adrenalina imediatamente após a lesão com balão somente 6 horas foram suficientes para induzir trombose arterial em 71% dos animais [25].

No presente estudo, nós avaliamos o efeito da administração de apirase solúvel de batatas na prevenção de trombose arterial aguda em um modelo de 3 horas.

Material e Métodos

Animais

Vinte e sete coelhos machos brancos Nova Zelândia foram estudados (idade média 3 meses, peso médio 2,5-3,5 kg). Doze coelhos foram submetidos à administração de apirase solúvel purificada de batatas. Um grupo de treze animais que não receberam administração de nenhuma NTPDase foram utilizados como controle. Dois animais morreram durante a anestesia do procedimento de lesão endotelial antes da randomização não tendo sido incluídos na análise.

Protocolo Indutor de trombose

Os animais foram anestesiados com quetamina (10 mg/kg via intramuscular) e diazepam (1mg via intravenosa). Uma incisão longitudinal de 3 cm foi realizada na região inguinal direita e a artéria femoral foi dissecada. Um cateter Fogarty 3F (Baxter) foi introduzido pela artéria femoral direita até o arco da aorta. O balão foi inflado com 0,8 ml de ar e então tracionado até atingir a artéria femoral. Este procedimento foi repetido uma vez. Após a artéria femoral foi ligada e a ferida operatória suturada. Quinze dias após a lesão endotelial, todos os animais receberam o protocolo indutor de trombose que consistiu da administração intraperitoneal de 100 µg/kg do pró-coagulante veneno de víbora Russelis (Sigma Co-Saint Louis, USA), seguido, após 30 minutos, de administração intravenosa de 20 µg/kg de adrenalina.

Administração de Apirase

Imediatamente após receber o protocolo indutor de trombose, doze animais receberam duas administrações intravenosas de apirase purificada de batatas. A apirase liofilizada – preparada como descrito por Kettlun *et al.*[26] – foi diluída em água deionizada em uma concentração final de 200 U/ml e administrada uma dose de 100 U por coelho em cada injeção. Os 13 animais do grupo controle não receberam nenhuma intervenção após o protocolo indutor de trombose.

Protocolo de morte, macroscopia e videoplanimetria

Os animais foram mortos 3 horas após o protocolo indutor de trombose através da administração de lidocaína intracardíaca após anestesia com quetamina e diazepam. O tórax e o abdome foram abertos e o bloco aorta-ílicas dissecado e removido. O bloco foi então aberto de maneira longitudinal e fixado em uma superfície plana. A presença de trombo foi analisada, fotografias obtidas e planimetria da aorta e dos trombos foi realizada para avaliação da área de trombose. A área de trombose foi expressa em milímetros quadrados (mm^2).

Determinação da atividade ADPásica

Um estudo piloto com 3 coelhos foi realizado para padronizar as condições de aferição da atividade apirásica em coelhos e testar a tolerabilidade da administração da apirase por via intravenosa.

Durante o experimento várias amostras de sangue foram coletadas. As amostras de sangue foram colocadas em temperatura ambiente para coagulação espontânea e então centrifugadas para a obtenção do soro. O meio de reação utilizado para avaliar a atividade ADPásica continha (concentração final) 45 mM TRIS-HCl (pH 8,0) e 1,5 mM CaCl em um volume final de 200 μl . Vinte microlitros de soro foram adicionados para o meio de incubação e pré-incubados a 37°C por 10 minutos. A reação enzimática foi iniciada pela adição de ADP a uma concentração final de 3,0 mM e interrompida após 40 minutos pela adição de 200 μl de ácido tricloroacético a 10%. As amostras foram agitadas e colocadas em gelo por 10 minutos, centrifugadas e 100 μl foram separados para avaliação da

quantidade de fosfato inorgânico como descrito por Chan *et al.* [27]. O tempo de incubação e concentração de proteína foram escolhidos, baseados no estudo piloto, de forma a assegurar a linearidade da reação. Controles com a adição de soro após a adição do ácido tricloroacético foram utilizados para corrigir para a hidrólise não enzimática do substrato. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade enzimática foi expressa como nmolPi/min/ml.

Análise Estatística

Cálculo de tamanho da amostra: foi definido que, para detectar uma diferença de 50% na incidência de trombose entre os grupos, considerando uma incidência de 71% no grupo controle, um poder ($1-\beta$) de 80% e uma significância bi-caudal de 5%, 17 animais seriam necessários em cada grupo. Quando 25 animais haviam sido arrolados, uma análise interina demonstrou que a incidência de trombose no grupo apirase estava menor que o inicialmente esperado e o estudo foi terminado. A variação da atividade apirásica foi comparada por ANOVA para medidas repetidas. A incidência de trombose nos dois grupos foi comparada utilizando o teste exato de Fisher e a área total de trombose foi comparada entre os grupos utilizando o teste Mann-Whitney.

Resultados

Estudo piloto

Utilizando 30 amostras de sangue de três coelhos em um estudo piloto observamos que a atividade apirásica em coelhos normais varia entre 6 e 12 nmolPi/min/ml. Após a administração de 100 UI de apirase, a atividade ADPásica do soro aumentava de 10 a 20

vezes. Deste estudo piloto, definiu-se a meia vida da apirase administrada como sendo de 30 minutos (figura 1). Através destes dados decidimos que duas administrações com 90 minutos de intervalo seriam necessárias para obter efeito anti-trombótico durante 3 horas.

Atividade ADPásica foi analisada antes e após as intervenções (anestesia, lesão endotelial com balão, administração de vvR, adrenalina e apirase e morte) em 3 coelhos. Nenhum destes procedimentos alterou a atividade ADPásica, exceto a administração de apirase.

Aferição da atividade ADPásica

Como observamos previamente que nenhuma das intervenções além da administração da apirase exercia influência sobre a atividade sérica da apirase, a avaliação da atividade ADPásica foi realizada apenas nos animais que receberam a enzima. A atividade sérica ADPásica aumentou significativamente após a administração intravenosa da enzima. A atividade aumentou de 12,3 nmolPi/min/ml antes da administração para 134 nmolPi/min/ml imediatamente após a primeira injeção. Noventa minutos após a administração, a atividade ADPásica estava em 19,7 nmolPi/min/ml. A segunda injeção elevou a atividade sérica da apirase para 120,9 nmolPi/min/ml. No momento da morte dos animais, 90 minutos após a segunda administração, a atividade sérica aferida estava em 14,58 nmolPi/min/ml. A Figura 2 ilustra esta seqüência de eventos e mostra que uma diferença estatisticamente significativa foi alcançada após cada administração de apirase.

Taxa de trombose arterial

Nove (69%) dos 13 animais no grupo controle desenvolveram trombos. Dos 12 animais que receberam apirase, somente dois (16,7%) desenvolveram trombose (um na artéria femoral e um animal que apresentou dois trombos, um em aorta abdominal e um na artéria femoral direita) (Teste Exato de Fisher $P=0,015$ RR 0,24; IC 95% 0,06-0,9) (Figura 3).

Aferição da área de trombose pela planimetria

A área de trombose no grupo controle foi de 21,7 mm² (DP 37,4). A área média de trombose no grupo apirase foi de 1,7 mm² (DP 4,3). Esta diferença foi estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney P = 0,008).

Discussão

A evolução do modelo

É sabido que aterosclerose pode ser induzida em modelos experimentais de lesão endotelial e hiperlipidemia [28,29]. Em 1961 Constantinides e Chakravarti [21] pela primeira vez desenvolveram um modelo de aterosclerose e trombose arterial aguda *in vivo* através da manipulação farmacológica da coagulação e de fatores hemodinâmicos. Eles induziram aterosclerose em coelhos brancos Nova Zelândia pela administração de dieta enriquecida com colesterol por 8 meses. Ao final do tratamento dietético, trombose arterial foi induzida pela administração, em dois dias consecutivos, de vvR seguida pela injeção intravenosa de um vasoconstritor. Baumgartner [30] demonstrou que a desendotelização endotelial com cateter balão pode também ser utilizada para lesão da parede arterial e acelerar o processo aterosclerótico. Abela *et al.* [23] reproduziram o modelo experimental descrito por Constantinides e Chakravarti e demonstraram que a associação de lesão química induzida por colesterol e lesão física induzida por cateter balão não apenas aceleram o processo aterosclerótico mas também aumentam a trombogenicidade do modelo. Após apenas 4 meses de injúria química e física associadas 71% dos animais desenvolveram trombos. Nosso grupo demonstrou que a lesão química não é necessária

[24] e que até mesmo 4 semanas são suficientes para o desenvolvimento de trombose (Scipioni PP, comunicação pessoal). Em outra adaptação do modelo original, demonstramos que a mesma taxa de trombos pode ser obtida com um modelo hiperagudo de lesão endotelial e trombose. Foram administrados vvR e o vasoconstritor imediatamente após a lesão endotelial com balão e os coelhos foram mortos após 6 horas deste procedimento [25]. Neste modelo de injúria aguda do endotélio e estado pró-trombótico, trombose pode ser observada em 71% dos animais. No presente estudo, uma nova adaptação foi introduzida. A lesão endotelial foi realizada 2 semanas antes da indução do estado pró-trombótico. Também utilizamos uma dose menor de vvR (100 µg/kg intraperitonealmente) seguidos após 30 minutos de adrenalina e a morte dos animais 3 horas após o tratamento indutor de trombose. Com a redução da dose do vvR e do tempo para a morte dos animais nós intencionávamos diminuir a trombogenicidade do modelo. Apesar de não termos reduzido a taxa de trombose, a área dos trombos foi significativamente reduzida com a evolução do modelo. No primeiro estudo de 4 meses e duas administrações de vvR e adrenalina em dois dias consecutivos nós encontramos uma área média de trombose de $194 \pm 182 \text{ mm}^2$ [24]. No estudo de um mês no qual apenas uma dose de vvR e adrenalina foram administradas, a área média de trombose foi de $65,9 \pm 96,1 \text{ mm}^2$ (Scipioni PP, comunicação pessoal). No estudo em que os animais foram mortos após 6 horas da injúria com balão e do tratamento indutor [25] a área média de trombose foi de $52,9 \pm 50,5 \text{ mm}^2$. No presente estudo nós encontramos uma área de trombose ainda menor ($21,7 \pm 37,4 \text{ mm}^2$). Esta correlação positiva entre tempo para a morte, número e quantidade de vvR utilizada e área de trombose pode indicar uma diminuição da trombogenicidade do modelo.

O presente estudo é o primeiro a demonstrar uma diferença significativa na incidência de trombose após uma intervenção farmacológica utilizando este modelo.

A Apirase

Muitos estudos têm demonstrado que a apirase pode exercer um importante papel na manutenção da homeostasia. O papel do ADP na agregação plaquetária foi inicialmente demonstrado por Hellen *et al.* em 1960 [31] e confirmado por Gaardner *et al.* em 1961 [32]. Após estes estudos pioneiros, muitos autores têm demonstrado que nucleotídeos da adenosina, seus metabólicos e rotas enzimáticas efetivamente participam na homeostasia [33].

Lieberman *et al.* [34] detectaram atividade antiplaquetária em homogenato de aorta de coelhos. Este efeito parecia depender da atividade de uma enzima que hidrolisava ADP. Yagi *et al.* [35] purificaram, em aorta de bovinos, uma enzima capaz de hidrolisar ATP e ADP. O mesmo grupo [36] demonstrou que esta enzima é uma ecto-ATPase e -ADPase com atividade em células endoteliais e musculares lisas. Muitos outros estudos confirmaram a presença desta ecto-enzima que tem habilidade de controlar a agregabilidade plaquetária [7,9,37]. Cote *et al.* [38] confirmaram a presença de uma apirase no endotélio e em células musculares lisas e propuseram um papel no controle da agregação plaquetária e do tônus vascular. O mesmo grupo [39] demonstrou que a concentração enzimática é diferente na íntima e na média e sugerem uma dupla função: ao converter ATP liberado por células lesadas a ADP, pode induzir a agregação plaquetária no sítio da injúria; a subsequente conversão do ADP para AMP e adenosina pode limitar esta agregação. A

habilidade do CD39 em regular concentração extracelular de ATP foi demonstrada em cultura de células endoteliais humanas [13].

Kaczmarec *et al.* [7] demonstraram que ATPDase pode inibir a agregação plaquetária *in vitro* em resposta a ADP, colágeno e trombina e que esta atividade é perdida após exposição a estresse oxidativo. Marcus *et al.* [40] também demonstraram a importância da apirase no controle da agregação plaquetária. Eles mostraram que mesmo após bloqueando prostaciclina e óxido nítrico o endotélio persistia com atividade antiagregante.

Todos estes estudos *in vitro* criaram um sólido embasamento e justificaram o desenvolvimento de modelos *in vivo* para testar o efeito anti-trombótico do CD39. Os estudos *in vivo* iniciais demonstraram evidências indiretas de efeito anti-trombótico da apirase. Três estudos experimentais de rejeição de xenoenxerto, onde a ativação endotelial, agregação plaquetária e microtrombose apresentam um papel central [10,41], foram utilizados para testar o potencial benefício do CD39. No primeiro estudo [17] a administração de uma forma solúvel de CD39 prolongou a sobrevida do xenoenxerto. Também foi demonstrado que o início e a extensão de deposição plaquetária foi atenuada no grupo apirase e que soro de animais tratados com CD39 solúvel inibiam a agregação plaquetária induzida por ADP *in vitro*. Os estudos de Imai *et al.* [18,19] demonstraram que a suplementação da atividade NTPDásica na vasculatura do xenoenxerto utilizando CD39 adenovírus recombinante (AdCD39) apresentavam efeito protetor. A infecção com AdCD39 limitou o seqüestro plaquetário e inibiu a inflamação, além de prolongar a sobrevida do xenoenxerto. Um dos principais mecanismos associados com o prolongamento da sobrevida do xenoenxerto é suposto ser a inibição da deposição plaquetária e trombose. Nossos resultados são concordantes com esta explicação.

Pinsky *et al.* [42] utilizaram um modelo experimental de isquemia cerebral em ratos e estudaram o efeito da administração de CD39 humano solúvel (solCD39) para ratos normais e para ratos CD39-nocauteados. Os ratos CD39^{-/-} foram gerados pela eliminação do domínio extracelular enzimaticamente ativo (regiões conservadas da apirase 2-4) do gene do CD39. Estes animais não apresentaram nenhum fenótipo óbvio (perfil hematológico e coagulação basal normais). Nestes ratos, solCD39 inibiu a acumulação de plaquetas e fibrina no hemisfério cerebral ipsilateral após a indução da isquemia, melhorou a perfusão cerebral pós-isquêmica, reduziu o déficit neurológico e mortalidade comparados ao tratamento com aspirina ou ao não tratamento. Nenhum incremento na taxa de hemorragia intracerebral foi observada com solCD39, enquanto que com aspirina essa diferença ocorreu. Como o CD39 bloqueia somente a agregação plaquetária induzida por ADP e na disfunção endotelial outros ativadores plaquetários estão envolvidos, as plaquetas aderem ao tecido subendotelial para recuperar a integridade vascular. Através da hidrólise do ADP, CD39 reduz a adesão plaquetária e trombose não ocorre. Hemorragias não ocorrem, pois o endotélio lesado é tamponado pelas plaquetas. Em nosso experimento efetivamente demonstramos uma redução na formação de trombos e, embora não especificamente aferido, nenhuma tendência hemorrágica foi observada no grupo apirase durante os procedimentos cirúrgicos antes da morte dos animais.

O primeiro rato nocauteado para CD39 foi desenvolvido por Enjyoji *et al.* [14] através da depleção do gene do CD39 por recombinação homóloga. Tanto as atividades ATPásicas quanto ADPásicas foram diminuídas nas culturas de células endoteliais CD39^{-/-}. Concentrações plasmáticas de ATP e ADP nos ratos CD39^{-/-} foram similares aquelas dos ratos normais. A contagem de plaquetas nos ratos CD39^{-/-} foi 20% menor do que nos ratos normais. Tempo de sangramento foi prolongado nos ratos CD39^{-/-}. Formação de plug de

plaquetas *in vivo* foi também retardada após lesão das arteríolas mesentéricas nos ratos nocauteados. Plaquetas purificadas dos ratos CD39^{-/-} não se agregaram completamente ao serem estimuladas por ADP, colágeno ou baixas doses de trombina *in vitro*. Quando tratados com ATPDases solúveis, estas plaquetas recuperaram seu potencial de agregação. Enjyoji *et al.* [14] também transplantaram corações para ratos previamente sensibilizados (7 dias antes do transplante). O tempo de sobrevivência dos enxertos funcionantes foi significativamente menor nos ratos CD39^{-/-} em comparação com os ratos normais. Enxertos de ratos CD39^{-/-} apresentaram injúria do parênquima mais difusa, infartos e hemorragias, além de uma mais evidente ativação de células endoteliais, agregação plaquetária e aumento na expressão de P-selectina e deposição de fibrina.

As diferenças em fenótipos nos ratos descritos por Enjyoji *et al.* [14] e por Pinsky *et al.* [42] podem ser explicadas pelo fato de que Enjyoji *et al.* manipularam todo o gene enquanto que Pinsky *et al.* focaram na eliminação do domínio extracelular enzimaticamente ativo. Tais manipulações podem afetar populações celulares e secundariamente alterar o fenótipo. Outra possível explicação é o envolvimento de outras enzimas que podem ser suprimidas pela manipulação do gene inteiro e não afetadas pela técnica de Pinsky *et al.* [42]. Embora nestes estudos resultados conflitantes tenham sido encontrados a respeito de formação de trombos e tendências hemorrágicas, os nossos resultados reforçam a hipótese antitrombótica da apirase.

Recentemente uma nova enzima que hidrolisa ATP e ADP foi descrita [43]. Esta nova nucleotídeo-fosfohidrolase demonstrou controlar a agregação plaquetária, corroborando a importância de ATPases e ADPases na homeostasia. Essa nova enzima pode também explicar os fenótipos discordantes encontrados nos ratos CD39-nocauteados de Enjyoji e Pinsky, que apresentam diferentes padrões de coagulação.

Enquanto nosso estudo estava em andamento, Ganadharan *et al.* [20] publicaram um estudo utilizando um modelo experimental semelhante ao nosso, porém sem indução de trombose, para avaliar o efeito da transferência gênica de CD39 em células endoteliais e musculares lisas. Eles inicialmente demonstraram que a infecção com vetores adenovírus-recombinante contendo CD39 (Ad-CD39) aumentavam a atividade adenosino-difosfatase em 40 vezes em células endoteliais e em 3 vezes em células musculares lisas. Também demonstraram que a desendotelização com cateter balão causa uma redução significativa da atividade NTPDásica na parede do vaso lesado e que a infecção com o Ad-CD39 restaura esta atividade. Avaliação da deposição plaquetária na superfície arterial lesada não demonstrou diferenças quando comparados os vasos infectados e não infectados. Os autores discutem esta ausência de diferença pela modesta deposição plaquetária encontrada nos dois grupos. Em um estudo anterior do nosso grupo [25] também observamos uma redução da atividade NTPDásica na parede da aorta de coelhos submetidos a lesão com balão. No presente estudo de macrotrombose arterial aguda nós demonstramos que a apirase tem um potente efeito anti-trombótico. Nossos achados estão de acordo com o conhecimento acumulado. A significativa diminuição na taxa de trombose pela administração de apirase solúvel de batatas foi inclusive maior do que a esperada.

Nós não avaliamos objetivamente contagem de plaquetas e parâmetros de coagulação, mas foi possível observar que o sangue demorava mais para coagular após as administrações de apirase. Outros estudos controlando estes parâmetros devem ser realizados.

O papel do ADP na fisiopatologia da trombose tem sido há muito estudado e benefícios de sua manipulação são bem estabelecidos: o estudo CURE [44] é um exemplo

de ensaio clínico com um inibidor do ADP – clopidogrel – que demonstrou ser benéfico em pacientes portadores de síndrome coronariana aguda.

Conclusões

O presente estudo é o primeiro a demonstrar um aumento na atividade ADPásica sérica após a administração intravenosa de apirase solúvel de batatas em coelhos. Também este é o primeiro estudo a demonstrar uma redução significativa na incidência e área de trombose em um modelo experimental de trombose arterial aguda *in vivo* através da administração de apirase. Esperamos que num futuro próximo a apirase seja uma alternativa para a prática clínica.

Referências

1. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med* 1996; **47**: 315-331.
2. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1351-1360.
3. Schafer AI. Vascular endothelium: in defense of blood fluidity. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1143-1144.
4. Rongen GA, Floras JS, Lenders JW, Thien T, Smits P. Cardiovascular pharmacology of purines. *Clin Sci (Lond)* 1997; **92**: 13-24.
5. Koziak K, Sevigny J, Robson SC, Siegel JB, Kaczmarek E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1538-1544.
6. Rongen GA, Smits P, Thien T. Characterization of ATP-induced vasodilation in the human forearm vascular bed. *Circulation* 1994; **90**: 1891-1898.
7. Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 1996; **271**: 33116-33122.

8. Sevigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 2002; **99**: 2801-2809.
9. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Pinsky DJ, Islam N, Maliszewsk CR. Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD39/ecto-ADPase: significance for occlusive vascular diseases. *Ital Heart J* 2001; **2**: 824-830.
10. Robson SC, Cooper DK, d'Apice AJ. Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2000; **7**: 166-176.
11. Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 2000; **96**: 2157-2162.
12. Goepfert C, Sundberg C, Sevigny J, Enjyoji K, Hoshi T, Csizmadia E, Robson S. Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice. *Circulation* 2001; **104**: 3109-3115.
13. Imai M, Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Goepfert C, Guckelberger O, Csizmadia E, Schulte Am EJ, Robson SC. Suppression of ATP diphosphohydrolase/CD39 in human vascular endothelial cells. *Biochemistry* 1999; **38**: 13473-13479.
14. Enjyoji K, Sevigny 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. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 1999; **5**: 1010-1017.
15. Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 916-923.
16. Gayle RB, III, Maliszewski CR, Gimpel SD, Schoenborn MA, Caspary RG, Richards C, Brasel K, Price V, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Broekman MJ, Marcus AJ. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1851-1859.
17. Koyamada N, Miyatake T, Candinas D, Hechenleitner P, Siegel J, Hancock WW, Bach FH, Robson SC. Apyrase administration prolongs discordant xenograft survival. *Transplantation* 1996; **62**: 1739-1743.
18. Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Lin Y, Sevigny J, Kaczmarek E, Goepfert C, Enjyoji K, Bach FH, Rosenberg RD, Robson SC. CD39/vascular ATP diphosphohydrolase modulates xenograft survival. *Transplant Proc* 2000; **32**: 969.
19. Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Kaczmarek E, Csizmadia E, Bach FH, Robson SC. Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. *Transplantation* 2000; **70**: 864-870.

20. Gangadharan SP, Imai M, Rhyndhart KK, Sevigny J, Robson SC, Conte MS. Targeting platelet aggregation: CD39 gene transfer augments nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in injured rabbit arteries. *Surgery* 2001; **130**: 296-303.
21. Constantinides P, Chakravarti RN. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. *Archives of Pathology* 1961; **72**: 79-90.
22. Johnstone MT, Botnar RM, Perez AS, Stewart R, Quist WC, Hamilton JA, Manning WJ. In vivo magnetic resonance imaging of experimental thrombosis in a rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 1556-1560.
23. Abela GS, Picon PD, Friedl SE, Gebara OC, Miyamoto A, Federman M, Tofler GH, Muller JE. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation* 1995; **91**: 776-784.
24. Picon PD, Goncalves SC, Wainstein MV, Costa AF, Mengarda CV, Machado RP, Berlim GL, Edelweiss M, Edelweiss MI, Ribeiro JP. Atherosclerosis and acute arterial thrombosis in rabbits: a model using balloon desendothelization without dietary intervention. *Braz J Med Biol Res* 1997; **30**: 415-417.
25. Iturry-Yamamoto, G. R., Battastini, A. M. O., Martins, N. L. C., Edelweiss, M. I., Rosig, L. M., Sarkis, J.J., Ribeiro, J. P., and Picon, P. D. Acute Arterial Thrombosis induced by endothelial injury and activation of blood coagulation: the role of the ATP diphosphohydrolase (ecto-apyrase). *Thromb.Haemost.* 2002 - Submitted.
26. Kettlun AM, Uribe L, Calvo V, Silva S, Rivera J, Mancilla M, Valenzuela MA, Traverso-Cori A. Properties of two apyrases from *Solanum tuberosum*. *Phytochem* 1982; **21**: 551-558.
27. Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; **157**: 375-380.
28. Anitschkow N. Experimental Atherosclerosis in animals. In: Cowdry EV (editor). *Arteriosclerosis - A Survey to the Problem*. New York: MacMillan, 1933.
29. Sslowjew A. Experimentelleuntersuchungen über die bedeutung von lokader schädigung für die lipoidablagerung in der arterienwand. *Zeittschr F D Exper Med* 1929; **69**: 94-97.
30. Baumgartner HR. Eine neue methode zur erzeugung vor thromben durch gezielte uberdehnung der gefässwand. *S Ges Exp Med* 1963; **137**: 227.
31. Hellem A. The adhesiveness of human blood platelets in vitro. *Scand J Clin Lab Invest* 1960; **12**: 1-6.
32. Gaarder A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owren PA. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* 1961; **192**: 531-532.

33. Robson SC, Sevigny J, Imai M, Guckelberger O, Enjyoji K. Thromboregulatory potential of endothelial CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase: modulation of purinergic signalling in platelets. *Emerging Therapeutic Targets* 2000; **4**: 155-171.
34. Lieberman GE, Lewis GP, Peters TJ. A membrane-bound enzyme in rabbit aorta capable of inhibiting adenosine-diphosphate-induced platelet aggregation. *Lancet* 1977; **2**: 330-332.
35. Yagi K, Arai Y, Kato N, Hirota K, Miura Y. Purification of ATP diphosphohydrolase from bovine aorta microsomes. *Eur J Biochem* 1989; **180**: 509-513.
36. Yagi K, Shinbo M, Hashizume M, Shimba LS, Kurimura S, Miura Y. ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **180**: 1200-1206.
37. Sevigny J, Levesque FP, Grondin G, Beaudoin AR. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1334**: 73-88.
38. Cote YP, Picher M, St Jean P, Beliveau R, Potier M, Beaudoin AR. Identification and localization of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1078**: 187-191.
39. Cote YP, Filep JG, Battistini B, Gauvreau J, Sirois P, Beaudoin AR. Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovine aorta: evidence for a regulatory role in platelet activation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1139**: 133-142.
40. Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA, Ullman HL, Islam N, Broekman MJ, Eiroa AM. Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1690-1696.
41. Robson SC, Schulte Am EJ, Bach FH. Factors in xenograft rejection. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **875**: 261-276.
42. Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES, Jr., Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1031-1040.
43. Birk AV, Bubman D, Broekman MJ, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, Szeto HH. Role of a novel soluble nucleotide phospho-hydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: hemostasis, thrombosis, and vascular biology. *J Lab Clin Med* 2002; **139**: 116-124.
44. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001; **345**: 494-502.

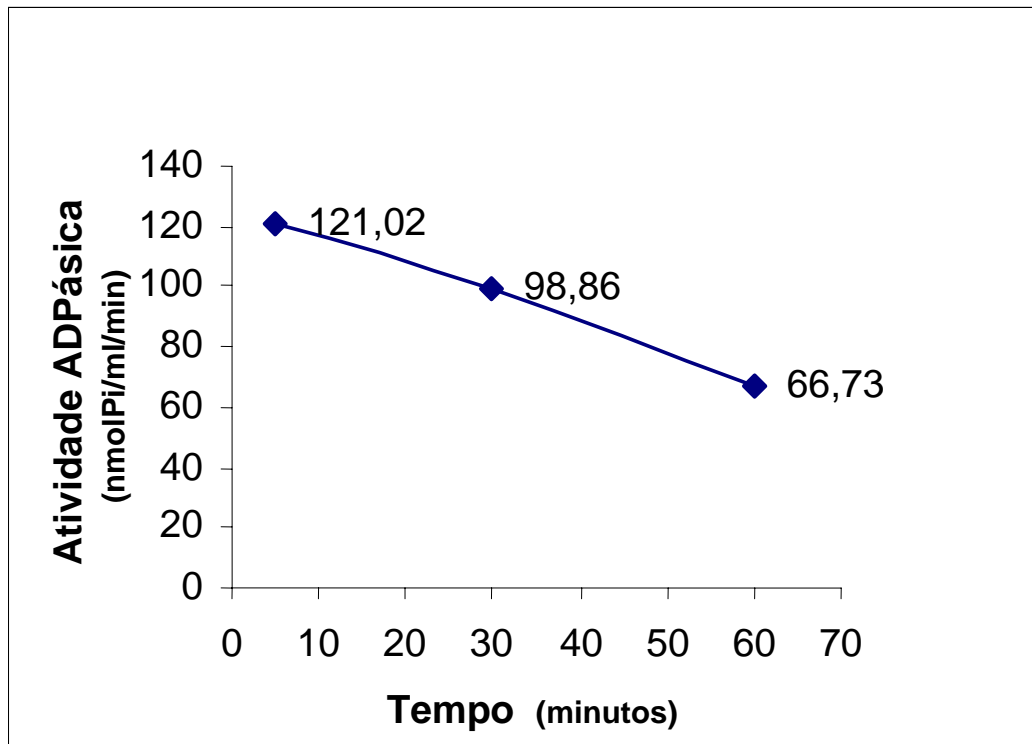


Figura 1. Análise farmacocinética da apirase solúvel em coelhos. Apirase solúvel de batatas foi administrada intravenosamente em coelhos. Foram coletadas amostras de sangue em vários tempos e aferida a atividade ADPásica. A figura apresenta dados de um coelho representativo do experimento.

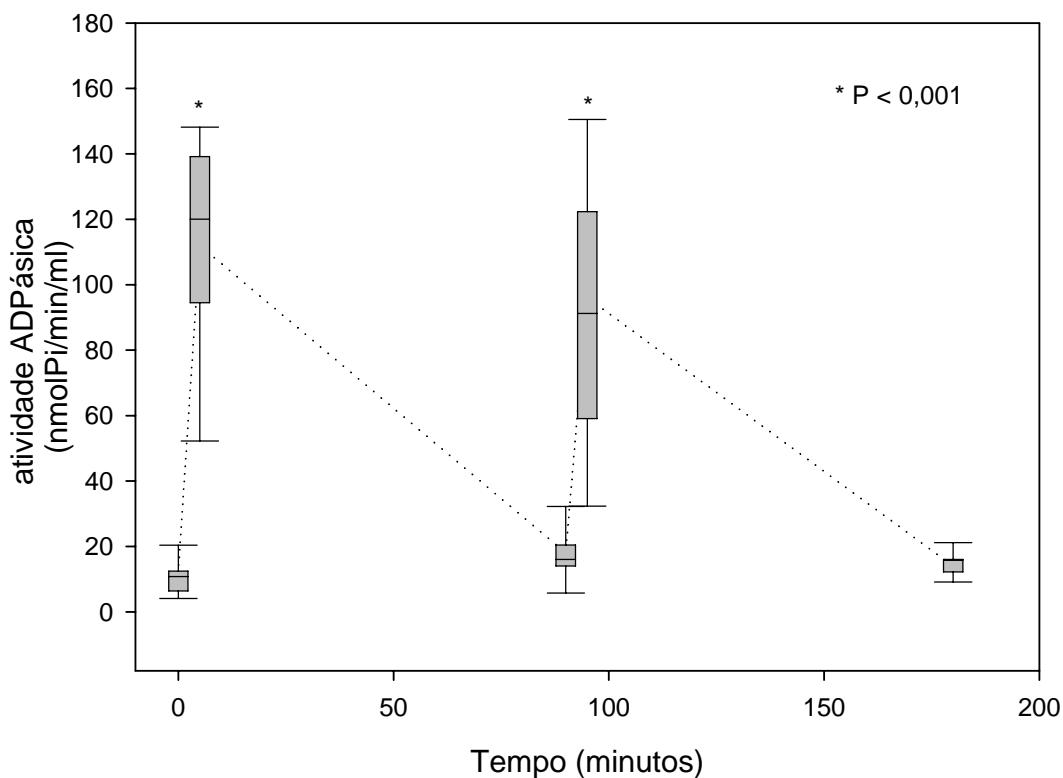


Figura 2. Atividade ADPásica no grupo apirase durante o experimento. As barras horizontais centrais, as colunas e as barras horizontais periféricas indicam a mediana, intervalo entre percentil 25 e 75, e o percentil 10 e 90, respectivamente. A linha pontilhada mostra a variação da atividade ADPásica média. O primeiro box-plot apresenta a atividade ADPásica basal do Coelho. O segundo e o quarto box-plot representam a atividade ADPásica 5 minutos após cada administração de apirase. O terceiro e quinto box-plot representam a atividade ADPásica 90 minutos após cada administração de apirase. Diferenças significativas ($P < 0,001$) são observadas entre o 5^o e 95^o minutos (após cada administração de apirase) e as demais aferições (tempo 0, 90 e 180 minutos, antes de cada administração de apirase e no momento da morte dos animais, respectivamente).

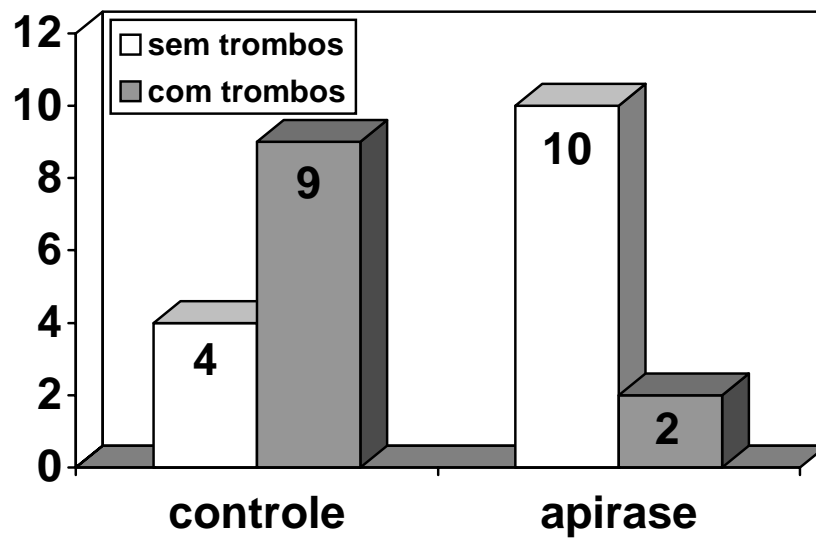


Figura 3. Incidência de trombose nos grupos apirase e controle. Estão representadas as incidências absolutas em cada grupo. Diminuição estatisticamente significativa da taxa de trombose é observada no grupo apirase em relação ao grupo controle (Teste exato de Fisher $P = 0,015$).