

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ECTO - ATP  
DIFOSFOIDROLASE (EC 3.6.1.5, APIRASE) E ECTO- 5'  
NUCLEOTIDASE (EC 3.1.3.5) EM CÉLULAS ESTRELADAS  
HEPÁTICAS**

**SUSANLY CANDAL TSO**

**ORIENTADORAS:  
FÁTIMA T.COSTA RODRIGUES GUMA  
ANA MARIA O BATTASTINI**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO APRESENTADO AO CURSO DE  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, COMO  
REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO GRAU EM BACHAREL EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, ÊNFASE MOLECULAR, CELULAR  
FUNCIONAL**

**Porto Alegre, maio de 2002.**

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Introdução</b> .....  | 06 |
| 1.1. Células estreladas hepáticas.....                                | 06 |
| 1.1.1. Cirrose hepática.....  | 07 |
| 1.2. Linhagem celular GRX.....  | 08 |
| 1.3. Trifosfato de adenosina (ATP).....                               | 09 |
| 1.4. Apirase.....   | 11 |
| 1.5. 5'- Nucleotidase.....  | 12 |
| 1.6. Adenosina.....   | 13 |
| 1.7. Adenosina no fígado.....   | 15 |
| <br>  |    |
| <b>2. Objetivos</b> .....   | 16 |
| <br>  |    |
| <b>3. Material e métodos</b> .....                                    | 17 |
| 3.1 Cultura de células.....   | 17 |
| 3.2. Materiais.....   | 17 |
| 3.3. Soluções.....  | 17 |
| 3.4. Método.....  | 18 |
| 3.4.1. Preparação do material de cultura.....                         | 18 |
| 3.4.2. Preparação da cultura de células.....                          | 18 |
| 3.4.3. Indução do fenótipo lipocítico por retinol e indometacina..... | 19 |
| 3.4.4. Ensaio enzimático.....   | 19 |
| 3.4.5. Determinação da proteína.....                                  | 20 |
| 3.4.6. Análise estatística.....                                       | 21 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. Resultados.....</b>                               | <b>22</b> |
| 4.1. Determinação das atividades nucleotidásicas.....   | 22        |
| 4.2. Determinação da atividade de 5'- nucleotidase..... | 23        |
| <b>5. Discussão.....</b>                                | <b>28</b> |
| <b>6. Referências bibliográficas.....</b>               | <b>33</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Equilíbrio entre os fenótipos nas células estreladas hepáticas   | 07 |
| <b>Figura 2.</b> Linhagem celular GRX, A: fenótipo miofibroblastóide;<br>B:fenótipo lipocítico.....   | 09 |
| <b>Figura 3.</b> Esquema da cadeia enzimática formada pelas enzimas apirase<br>e 5'- nucleotidase na hidrólise de ATP, ADP e AMP.....                 | 12 |
| <b>Figura 4.</b> Curva de tempo para a hidrólise do ATP por ecto-nucleotidases<br>na linhagem celular GRX (lipocíticas e miofibroblastóides).....     | 22 |
| <b>Figura 5.</b> Curva de tempo para a hidrólise do ADP por ecto-nucleotidases<br>na linhagem GRX (lipocíticas e miofibroblastóides).....             | 23 |
| <b>Figura 6.</b> Curva de substrato da ecto-5'- nucleotidase: hidrólise do AMP<br>por células da linhagem GRX (lipocíticas e miofibroblastóides)..... | 24 |
| <b>Figura 7.</b> Hidrólise do AMP por células GRX, miofibroblastóides e<br>Lipocíticas, induzidas por retinol e indometacina.....                     | 25 |
| <b>Figura 8.</b> Revelação por imunocitoquímica da ecto-apirase e da ecto-<br>5'nuceleotidase .....   | 27 |
| <b>Figura 9.</b> Relação hepatócito / HSC: ações autócrinas e<br>parácrinas da adenosina .....  | 31 |



## RESUMO

As células estreladas hepáticas (HSC), também denominadas lipócitos ou células armazenadoras de gordura são distribuídas através de diferentes zonas do lóbulo hepático. Uma das suas características é a capacidade de expressar um duplo fenótipo. No fígado sadio, as células mostram um fenótipo denominado quiescente ou lipocítico, e no fígado lesado as células passam para um fenótipo conhecido como “ativado”, diferenciando-se em células miofibroblásticas.

As HSC ativadas constituem um elemento chave no contexto da cirrose, termo genérico usado para referir-se à doença hepática, em que a arquitetura de todo o fígado está desorganizada em consequência da formação de cicatrizes fibrosas em resposta à lesão e perda dos hepatócitos.

A linhagem GRX foi estabelecida através de indução de granulomas fibróticos em fígado de camundongo através de uma infecção experimental com *Schistosoma mansoni*. Quando cresce em condições de cultura padrão, a GRX pode ser induzida a adquirir um fenótipo lipocítico pelo tratamento com retinol ou indometacina.

Neste trabalho estudou-se a atividade de ecto-nucleotidases através da degradação dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP nos dois fenótipos estabelecidos na linhagem GRX, lipócitos e miofibroblastos. Verificando-se também a influência de agentes indutores como retinol e indometacina na atividade destas enzimas.

A hidrólise extracelular de ATP e ADP foi semelhante nos dois fenótipos, mas a produção extracelular de adenosina foi significativamente maior nos lipócitos, independente do agente indutor da transformação fenotípica.

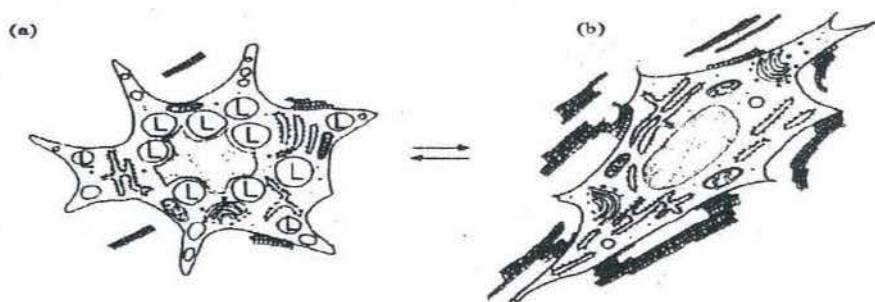
## **1. INTRODUÇÃO.**

### **1.1. Células estreladas hepáticas.**

As células estreladas hepáticas (HSC), também denominadas lipócitos ou células armazenadoras de gordura (BRAESCO et al., 1995) são distribuídas quase homogeneamente através de diferentes zonas do lóbulo hepático e estão localizadas no espaço de Disse em contato com hepatócitos e células endoteliais (CARLONI et al., 1996). Morfologicamente elas consistem em um corpo celular e vários processos dendríticos (BLOMHOFF e WAKE, 1991). A ultraestrutura das HSC mostra um complexo de Golgi e um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos, sugerindo uma atividade de síntese protéica e secreção, enquanto há poucos lisossomas e mitocôndrias (NANNI et al., 1997).

Uma das características das HSC é a sua capacidade de expressar um duplo fenótipo. No fígado sadio, as células mostram um fenótipo denominado quiescente ou lipocítico que contém gotas lipídicas ricas em vitamina A, organelas pouco desenvolvidas e uma baixa taxa de proliferação. No fígado lesado as células passam para um fenótipo conhecido como "ativado", diferenciando-se em células miofibroblásticas, com alta capacidade de proliferação, perda das gotas de gordura que contém vitamina A e desenvolvimento de um proeminente retículo endoplasmático rugoso, microtúbulos extensos e feixes de filamentos de actina com condensações locais (HAUTEKEETE e GEERTS, 1997).

O armazenamento e metabolismo da vitamina A (retinol) é realizado principalmente pelo fígado (PINZANI e GENTILINI, 1999). Em torno de 50 a 80 % do retinol total do organismo em circunstâncias normais é estocado no fígado, sendo que dois diferentes tipos celulares hepáticos são importante nesse armazenamento: os hepatócitos e as HSC (BLANER e OLSON, 1994). Estudos demonstraram que o retinol que chega aos hepatócitos é transferido para as HSC. As HSC são as armazenadoras de 80 a 90 % do retinol hepático (BLOMHOFF e WAKE, 1991).



**Figura 1.:** Equilíbrio entre os fenótipos nas Células Estreladas Hepáticas (HSC): (a) fenótipo lipocítico, (L) gotas lipídicas no citoplasma; (b) fenótipo miofibroblastóide. Fortuna (2002).

### 1.7. Cirrose hepática.

A cirrose é um termo genérico usado para referir-se à doença hepática de etiologia variada, em que a arquitetura de todo o fígado está desorganizada em consequência da formação de cicatrizes fibrosas em resposta à lesão e perda dos hepatócitos (ROBBINS *et al.*, 1994). A base molecular da fibrose hepática passou a ser melhor entendida a partir da caracterização e isolamento



dos diferentes tipos de células hepáticas e dos recentes estudos sobre a biologia da matriz extracelular e das citocinas. As HSC ativadas têm sido claramente identificadas como a fonte primária dos componentes de matriz na progressão da fibrose hepática, por sua distribuição topográfica e suas características biológicas, não há dúvida de que estas células constituem um elemento chave no contexto da cirrose (FRIEDMAN, 1999).

## 1.2. Linhagem celular GRX.

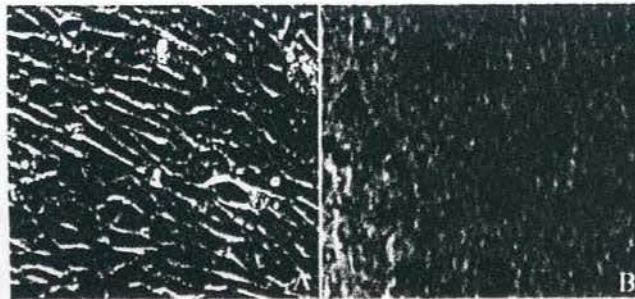
A linhagem celular GRX foi estabelecida através de indução de granulomas fibróticos em fígado de camundongo através de uma infecção experimental com *Schistosoma mansoni* (BOROJEVIC, et al. 1985). Esta linhagem celular tem uma morfologia miofibroblástica e secreta in vitro uma complexa matriz extracelular. Ela apresenta características morfológicas e bioquímicas de culturas primárias de células do tecido conectivo hepático humano (MONTEIRO e BOROJEVIC, 1987a).

Quando cresce em condições de cultura padrão, a GRX pode ser induzida a adquirir um fenótipo lipocítico pelo tratamento com retinol, similar à indução *in vivo* das HSC para o fenótipo da hipervitaminose A, diminuindo a proliferação na população celular. Na presença de retinóides, a GRX adquire um corpo poligonal mais regular e se espalha no substrato, aumentando sua aderência à este, pois aumenta sua resistência ao desprendimento durante a tripsinização das células (BOROJEVIC et al, 1991). Após 24 horas de tratamento, pequenos pontos pretos podem ser observados na área perinuclear, crescendo então para vacúolos esféricos e refringentes, ocupando a maior parte do volume celular, mas nunca se fusionando em um único vacúolo central (MARGIS e BOROJEVIC, 1989).



Além da indução com retinol, a indometacina, conhecido indutor da diferenciação adipocítica, também é capaz de desencadear nas células GRX a diferenciação lipocítica (GUARAGNA et al, 1991). O tratamento com indometacina induz a mudança fenotípica por mecanismos ainda não esclarecidos.

As drogas que induzem o fenótipo lipocítico nas células GRX, retinol e indometacina, diminuem a proliferação e a densidade celular na confluência. O padrão de síntese de proteínas de matriz extracelular também é modificado ao longo da indução lipocítica (BOROJEVIC et al, 1991).



**Figura 2:** Linhagem Celular GRX, A: fenótipo miofibroblastóide; B: fenótipo lipocítico.

### 1.3. Trifosfato de Adenosina (ATP).

Trifosfato de adenosina ou ATP é um composto altamente energético que desempenha um papel essencial em transferir energia de processos catabólicos geradores de energia para reações que requerem a presença da mesma.

O papel central do ATP nas trocas de energia em sistemas biológicos foi descrito em 1941, por Fritz Lippmann e Herman Kalckar.

O ATP é um nucleotídeo constituído por uma molécula de adenina, uma ribose e três grupos fosfato. A porção trifosfato do ATP explica o seu papel como portador de energia. O ATP é uma molécula rica em energia porque a sua unidade trifosfato contém duas ligações fosfoanidrido. Quando o ATP é hidrolizado a adenosina difosfato (ADP) e ortofosfato (Pi), ou quando o ATP é hidrolizado a adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato (PPi), uma quantidade de energia é liberada, de tal ordem que permite classificar o ATP como molécula "rica em energia".

O ATP pode ser liberado no espaço extracelular e ativar receptores específicos sendo após inativado por ação de ecto-enzimas que fazem a conversão deste nucleotídeo até adenosina (ZIMMERMANN, 1996). A degradação do ATP extracelular envolve um conjunto de enzimas ligadas à superfície celular, que constituem a via das ecto-nucleotidases, da qual participam, entre outras enzimas, a ecto-ATPase (EC 3.6.1.3), a ecto-adenosina trifosfatase (EC 3.6.1.5) e a ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (BATTASTINI et al., 1991,1995). A hidrólise extracelular de ATP por esta via resulta na formação de ADP, AMP e adenosina. Os nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina podem exercer seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos subdivididos em dois grandes grupos: P1 e P2. Os purinoreceptores P1 são ativados com o potencial agonista na ordem adenosina>AMP>ADP>ATP, enquanto que os purinoreceptores P2 são ativados por ATP>ADP>AMP>adenosina (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).



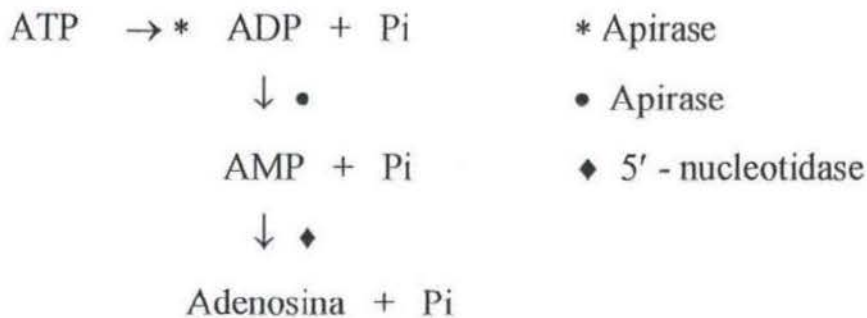
As ações extracelulares de nucleosídeos e nucleotídeos púricos foram primeiramente reconhecidos por Drury e Szent-Györgyi [1929]. Os efeitos clínicos da administração de ATP em homens foram explorados em 1950 especialmente em pacientes geriátricos com desordens cardiovasculares.

Sabe-se também que o ATP tem ações glicogenolíticas e hiperpolarizantes sobre hepatócitos, possivelmente por um mecanismo indireto, que é mediado por purinoreceptores P2 (BURNSTOCK, 1993).

#### **1.4. Apirase.**

O nome apirase ou ATP difosfohidrolase, primeiramente proposto por Meyerhof em 1945, é uma designação geral para enzimas que hidrolizam todos os nucleosídeos di e trifosfatados até os seus respectivos nucleosídeos monofosfatados e fosfato inorgânico, liberando 2 mol Pi (fosfato inorgânico) por mol de nucleosídeo difosfatado. A partir de 1945 e, principalmente, na última década, várias isoformas de ATP difosfohidrolases foram descritas em diferentes tipos de célula de origem animal e vegetal, sugerindo um papel importante no metabolismo celular. Estudos sobre localização e mecanismos de catálise das ATP difosfohidrolases indicam o envolvimento da enzima na regulação dos níveis de nucleotídeos e seus produtos de hidrólise em células e tecidos (KOMOSZYNSKY, 1994). Na grande maioria das vezes a apirase é encontrada associada em membranas com a 5' - nucleotidase (AMPase) sendo que as duas enzimas formam uma "cadeia enzimática" capaz de hidrolisar ATP e ADP até adenosina, e abaixo esquematizada:





**Figura 3:** Esquema da cadeia enzimática formada pelas enzimas apirase e 5 nucleotidase na hidrólise de ATP, ADP e AMP.

Apirases são enzimas de membrana cuja localização já tem sido bem estabelecida. A ampla ocorrência de apirases inclui tecidos vegetais, bem como de animais.

### 1.5. 5'Nucleotidase.

A enzima 5'-nucleotidase é uma glicoproteína ligada à membrana plasmática por resíduos de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (ZIMMERMANN, 1992), mas também está presente em membranas de retículo endoplasmático (MAGNUMUSSON et al., 1974) e em forma solúvel no citosol (ORFORD & SAGGERSON, 1996).

A 5' nucleotidase de membrana plasmática é descrita como sendo uma ecto-enzima constituinte da cadeia enzimática descrita na figura 3. A associação com a ATP difosfohidrolase se justifica com base no fato de que a atividade de hidrólise da apirase sobre o ATP e o ADP fornece o substrato AMP para 5'nucleotidase. Por ser uma das enzimas responsáveis pela

produção de adenosina em vários tecidos (NISHIO et al., 1987; ZIMMERMANN et al.; 1993; DARVISH, 1996), a 5' nucleotidase possui importante papel fisiológico.

### **1.6. Adenosina.**

A adenosina é um metabólito constituinte de todas as células, envolvida na síntese de nucleotídeos purinérgicos, metabolismo de aminoácidos e na modulação de rotas metabólicas. Considerando este papel homeostático da adenosina relacionado ao controle do metabolismo celular, a mesma tem sido denominada como um "hormônio local" e "metabólito retaliatório" para sumarizar seu papel nas condições de stress máximo onde a carga energética está comprometida (CUNHA, 2001).

Existem duas principais vias de formação de adenosina a nível intracelular: a clivagem da S-adenosil-homocisteína pela enzima S-adenosil-homocisteína-hidrolase (PATEL & TUDBALL, 1986) e a degradação de AMP a adenosina por ação de uma 5'-nucleotidase citosólica. Após sua formação, a adenosina pode passar através da membrana celular por difusão facilitada, utilizando transportadores de nucleosídeos. Estes transportadores são bidirecionais e equilibram as concentrações intracelular e extracelular de adenosina (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997).

A adenosina também pode ser formada e degradada no espaço extracelular. O ATP liberado pode originar adenosina pela ação de ectoenzimas: ecto-ATPases, ecto-apirases e ecto-5'-nucleotidases (BATTASTINI et al., 1995; PLESNER, 1995; DUNWIDDIE et al., 1997; ZIMMERMAN et al., 1998). Com relação à degradação da adenosina, foi identificada a presença

de ecto-adenosina desaminases (FRANCO et al., 1997). Foi estimada que a concentração basal de adenosina no espaço extracelular está na faixa de nanomolar (DUNWIDDIE & DIAO, 1994). Entretanto, diversas situações podem conduzir à significativa elevação da sua concentração extracelular (LLOYD et al., 1993). A adenosina também pode ser removida do espaço extracelular através da sua captação pelo sistema transportador de nucleosídeos (RATHBONE et al., 1999).

Uma das evidências que ajudou a identificar a adenosina como um modulador da atividade celular foi a identificação dos subtipos de receptor para adenosina. Os receptores de adenosina (purionoreceptores P1) estão divididos em quatro subtipos, que foram identificados e clonados: A1, A2A, A2B e A3 e pertencem à família de receptores acoplados às proteínas G (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997).

As primeiras evidências de que a adenosina apresentava atividade fisiológica foram obtidas através dos estudos de DRURY & SZENT-GYORGYI (1929), que observaram efeitos significativos da adenosina no coração. Desde então, tem se tornado claro que a adenosina pode exercer vários efeitos através da interação com receptores específicos de superfície celular (SATTIN & RALL, 1970; BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997). No sistema nervoso central, a adenosina altera os níveis de AMP cíclico (SATTIN & RALL, 1970), inibe a atividade sináptica e neuronal (DUNWIDDIE & HOFFER, 1980) e modula o fluxo sanguíneo cerebral (BERNE et al., 1981). Sua liberação durante a isquemia cerebral conduziu à hipótese de que a adenosina age como um neuroprotetor, prevenindo a excitotoxicidade e danos isquêmicos (DRAGUNOW & FAULL, 1988).



### 1.7. Adenosina no fígado.

O efeito hepatoprotetor de adenosina foi demonstrado em experimentos em que a cirrose hepática foi induzida por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). O tratamento com adenosina de ratos intoxicados previne parcialmente alterações na composição da membrana mitocondrial, impedindo assim a diminuição da função da mitocôndria (HERNANDEZ-MUNOZ *et al*, 1992).

A administração intraperitoneal de adenosina a ratos cirróticos bloqueia a atividade fibrogênica e aumenta a degradação de colágeno, provavelmente por diminuir os níveis dos inibidores teciduais de metaloproteínases (TIMPs) normalizando sua concentração. Além disso, o nucleosídeo promove uma efetiva proliferação dos hepatócitos no fígado cirrótico, acelerando a regeneração funcional e diminuindo os níveis de estresse oxidativo. (HERNANDEZ-MUNOZ *et al*, 1997 e 2001).

Tem sido sugerido que a expressão da 5' nucleotidase pode ser direta ou indiretamente controlada pela tensão local de oxigênio. No fígado, a ecto 5' nucleotidase foi detectada no canalículo biliar, no tecido conectivo da tríade portal e da veia central e nas HSC. SCHMID *et al* (1994) mostraram diferenças na distribuição da atividade entre animais saudáveis e anêmicos. A anemia provoca um aumento de 5' nucleotidase nas HSC da zona pericentral e nos fibroblastos que circundam a veia central, resultando na formação de um gradiente ao longo dos sinusóides.

Também já foi demonstrado o efeito hepatoprotetor da adenosina em fígados isquêmicos. Este efeito pode resultar do aumento da adenosina

extracelular, que provocaria uma ativação de receptores A2. Esta ativação provocaria geração de NO, que exerceria efeito protetor contra a injúria associada ao processo de isquemia e reperfusão hepática (PERALTA et al, 1999).

Os efeitos da adenosina e seus análogos na acumulação de AMPc induzida por glucagon em hepatócitos foram descritos por ROBES- FLORES et al. (1995). Os autores mostraram que a ativação de receptores A1 para adenosina inibe o acúmulo de AMPc, por bloquear o efeito inibitório do glucagon sobre a AMPc fosfodiesterase.

## 2. OBJETIVOS.

- Determinar as atividades de Ecto - ATP difosfohidrolase e Ecto 5'-nucleotidase nos dois fenótipos da linhagem GRX, miofibroblastóide e lipocítico.
- Verificar a possível relação das atividades de ecto-nucleotidases com o papel exercido pelos dois fenótipos das HSC na fisiologia hepática.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS.

#### 3.1. Cultura de células.

A linhagem celular GRX é proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os estoques das linhagens eram criopreservados em nitrogênio líquido à aproximadamente - 200° C.

#### 3.2. Materiais.

DMEN, HEPES, tripsina, all-trans retinol (Sigma); soro fetal bovino (SFB) (Cultilab); filtros à vácuo, membranas de éster de celulose 0,2 µm (Millipore); ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, vermelho de fenol, HCL, Extran, etanol absoluto (Merck), NaHCO<sub>3</sub>, NaOH, NaCl (Reagen).

#### 3.3. Soluções utilizadas:

**3.3.1. Solução salina tamponada de Hanks - HBSS:** CaCl<sub>2</sub> 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,65 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,27 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 3,5 mM, glicose 6,10 mM e vermelho de fenol.

Usa-se água de Milli-Q para dissolver os reagentes e ajusta-se o pH em 7,4 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Filtra-se e mantém-se a 4° C.

**3.3.2. Solução salina sem cálcio e magnésio - CMF-BSS:** NaCl 136,0 mM, KCl 5,36 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,27 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,10 mM, glicose 6,10 mM e vermelho de fenol.

Usa-se água de Milli-Q para dissolver os reagentes e ajusta-se o pH em 7,4 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Filtra-se e mantém-se a 4° C.



**3.3.3. Solução de Tripsina/EDTA:** Tripsina (1:250) 0.0625 g/L, EDTA (Tritriplex II) 0,037 g/L e CMF-BSS qsp 100 mL.

Acerta-se o pH em 7,9 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Filtra-se e mantém-se a 4° C.

**3.3.4. Meio de Cultura:** O meio de cultura utilizado foi o Eagle modificado por Dulbecco, que consiste em uma mistura de sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas, glicose e vermelho de fenol. DMEN 10,0 g/L, HEPES 2,0 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 2,2 g/L, água do Milli-Q qsp 1000 mL.

Acerta-se o pH 7,4 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N e adiciona-se 5% de soro fetal bovino. Filtra-se e mantém-se a 4°C.

## **3.4. Método.**

### **3.4.1. Preparação do material de cultura.**

Todos os materiais utilizados para a preparação da cultura (provetas, copos de Becker, pipetas Pasteur, filtros à vacuo e garrafas) eram lavados com Extran alcalino, enxaguados e submetidos a quatro passagens em água destilada e duas em água bidestilada em vidro. As pipetas Pasteur, ponteiras, garrafas e gases eram autoclavados à 121 °C e 1 atm de pressão por 40min e os filtros somente 20min.

### **3.4.2. Preparação da cultura de células.**

A partir de garrafas de culturas estoques, preparou-se as culturas utilizadas nos experimentos. Lavou-se as células estoques três vezes com CMF-BSS, adicionou-se cerca de 2 mL de tripsina/EDTA e através de agitação mecânica, despreendeu-se as células da garrafa. Inibiu-se a tripsina

com quatro volumes de DMEN 5% de SFB e retira-se uma alíquota para contar as células em câmara de Neubauer. As células eram semeadas na densidade de  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  e mantidas sob atmosfera úmida de 5% de  $\text{CO}_2$  à  $37^\circ\text{C}$ . O meio de cultura era trocado diariamente e as células examinadas diariamente em microscópio invertido Nikon Diaphot.

### **3.4.3. Indução do fenótipo lipocítico por retinol e por indometacina.**

Culturas subconfluentes (dois dias de cultura) eram tratadas com meio de cultura suplementado com uma solução de all-trans retinol  $5 \mu\text{M}$  ou com uma solução de indometacina  $0,13 \text{ mM}$  por um período de quatro dias, ambos preparados com etanol absoluto. A concentração de etanol nos meios de cultura nunca ultrapassou 1:1000. Culturas controle foram tratadas apenas com etanol.

### **3.4.4. Ensaio enzimático.**

As culturas de células foram lavadas com meio de incubação livre de substrato constituído de tampão HEPES, pH 7,4,  $2,0 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $5,0 \text{ mM KCl}$ ,  $120 \text{ mM NaCl}$ ,  $10 \text{ mM}$  glicose. As células foram incubadas no mesmo meio descrito, contendo  $1,0 \text{ mM}$  de ATP, ADP ou AMP como substrato por 0, 10, 20 e 30 minutos. Ao final desses tempos, alíquotas de  $150 \mu\text{l}$  foram retiradas e transferidas para tubos contendo  $150 \mu\text{l}$  de TCA 10% no gelo. O fosfato inorgânico liberado foi determinado pelo método do Verde de Malaquita (CHAN, 1986). Controles livres de substrato e livres de células foram executados simultaneamente. As amostras foram analisadas em triplicata para cada ponto da curva de tempo.

### **3.4.5. Determinação da proteína.**

A proteína foi determinada pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando-se como padrão albumina sérica bovina.

### **3.4.6. Imunocitoquímica.**

As células foram semeadas sobre lamínulas, colocadas em placas de múltiplos poços, e deixadas em cultura por 12 h. . Após, foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% tamponado. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com albumina 3% em PBS por 1 h, temperatura ambiente. A incubação com o anticorpo primário, anti CD 39 ou anti CD 73, foi realizada “overnigh” a 4°C, em câmara úmida. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS, três vezes de 10 min e incubadas com o anticorpo secundário (anti IgG de camundongo conjugado com rodamina) por 90 min, a 37°C em câmara úmida. As lamínulas foram montadas sobre lâminas em fluorsafe. As células foram examinadas em um microscópio Nikon E-600 epifluorescente e as imagens fotografadas com um equipamento para fotomicrografia Nikon U-III. As fotografias foram escaneadas e as figuras montadas usando ADOBE Photoshop software (Adobe Systems, USA). As imagens foram impressas em uma Epson Stylus Color 777. Experimentos controles foram realizados omitindo-se o primeiro anticorpo.



| <b>Anticorpo Primário</b>  | <b>Diluição</b> | <b>Fonte</b>           |
|--|-----------------|------------------------|
| Anti-CD39 monoclonal<br>Origem do antígeno: humano<br>Gerado em: camundongo  | 1/100           | Zymed Laboratorie Inc. |
| Anti- CD73 monoclonal<br>Origem do antígeno: humano<br>Gerado em: camundongo | 1/100           | BD PharMigen           |
| <b>Anticorpo Secundário</b>  | <b>Diluição</b> | <b>Laboratório</b>     |
| Anti-IgG de camundongo, conjugado com rodamina                               | 1/1000          | Sigma Chemical Co.     |

### 3.4.7. Análise estatística.

As diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas por teste T de Student para amostras independentes, usando-se o programa SPSS for Windows.

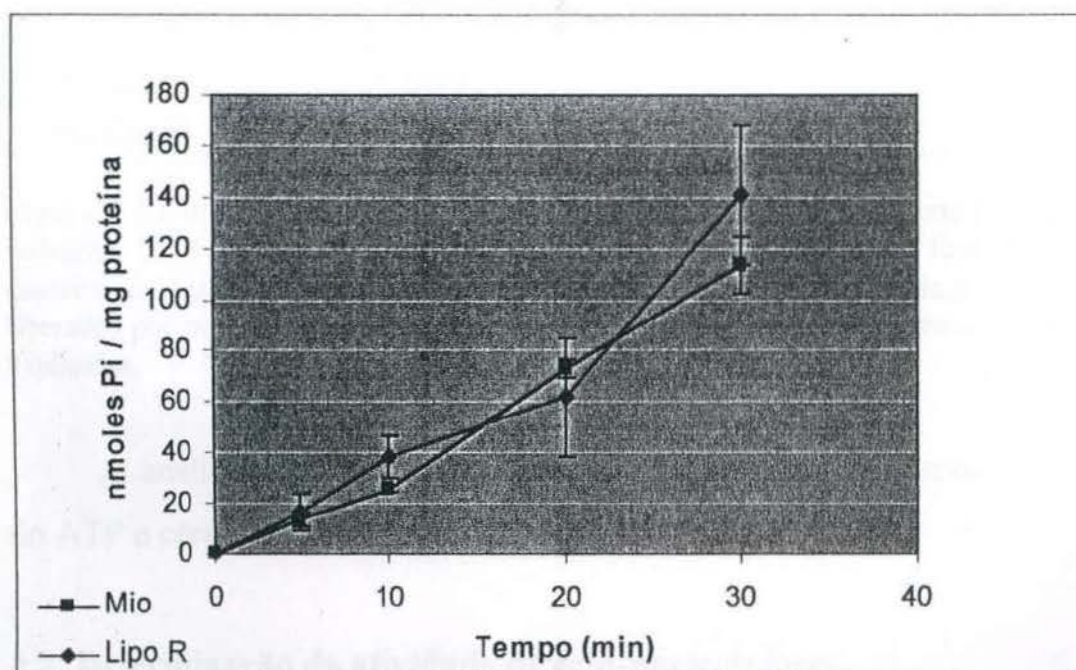


Figura 4. Atividade de tempo sobre a hidrólise do ATP por as 12-oxo- $\alpha$ -oxoacido desaminase em células J558 (irradiadas e não irradiadas). As 12-oxo- $\alpha$ -oxoacido desaminase foram avaliadas como atividade em irradiação e atividade. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD (erro de P, significância) de pelo menos três experimentos, realizados em triplicata.

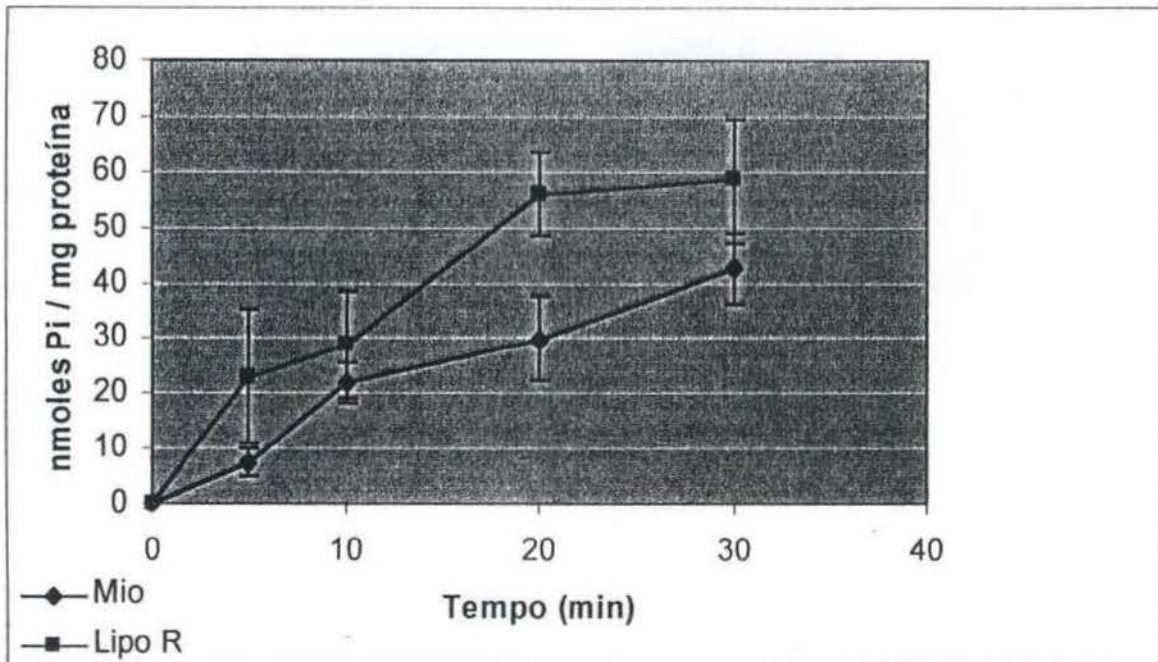
## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Determinação das atividades ecto-ATPase e ecto-ADPase:

As figuras 4 e 5 representam o efeito do tempo sobre a liberação de fosfato inorgânico por ecto-nucleotidases em células GRX miofibroblastóides e lipocíticas. Os resultados mostram que não houve diferenças na hidrólise de ATP e ADP entre os fenótipos.



**Figura 4:** Efeito do tempo sobre a hidrólise do ATP por ecto-nucleotidases na linhagem celular GRX (lipocíticas e miofibroblastóides). As determinações foram realizadas como descrito em material e métodos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  SE (nmol de Pi liberados por mg de proteína) de pelo menos três experimentos, realizados em triplicatas.



**Figura 5:** Efeito do tempo sobre a hidrólise de ADP por ecto-nucleotidasas por células da linhagem GRX (lipocíticas e miofibroblásticas). As determinações foram feitas como descrito em materiais e métodos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  SE (nmol de Pi liberados por mg de proteína por minuto) de pelo menos três experimentos, realizados em triplicatas.

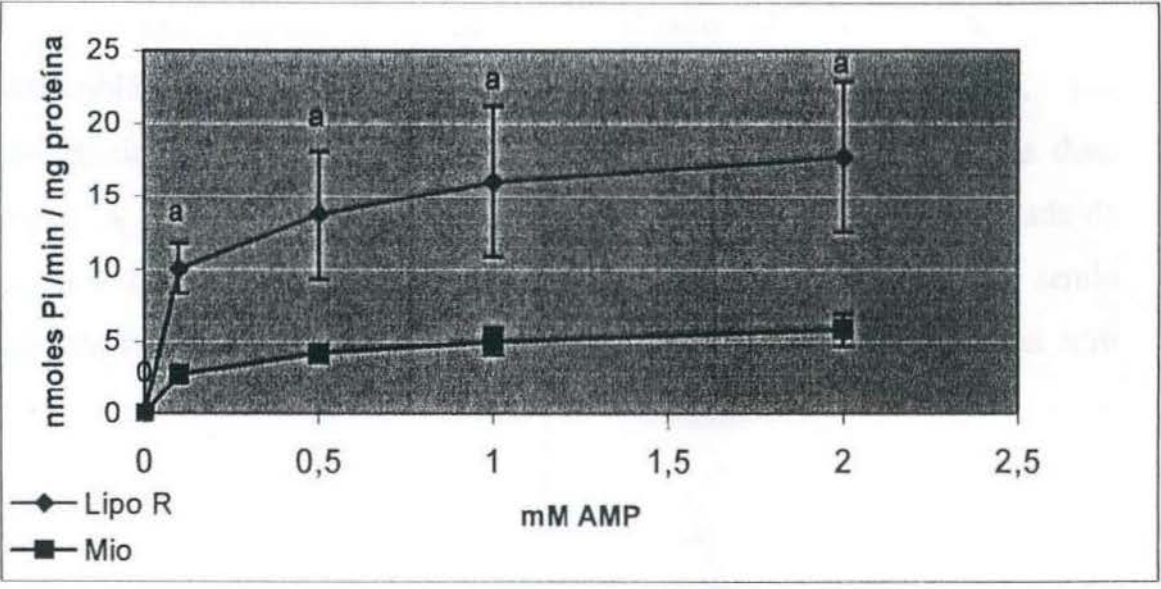
A análise das figuras 4 e 5 mostra que, nos dois fenótipos, a hidrólise do ATP e cerca de duas vezes maior que a do ADP.

#### 4.2. Determinação da atividade de ecto-nucleotidasas.

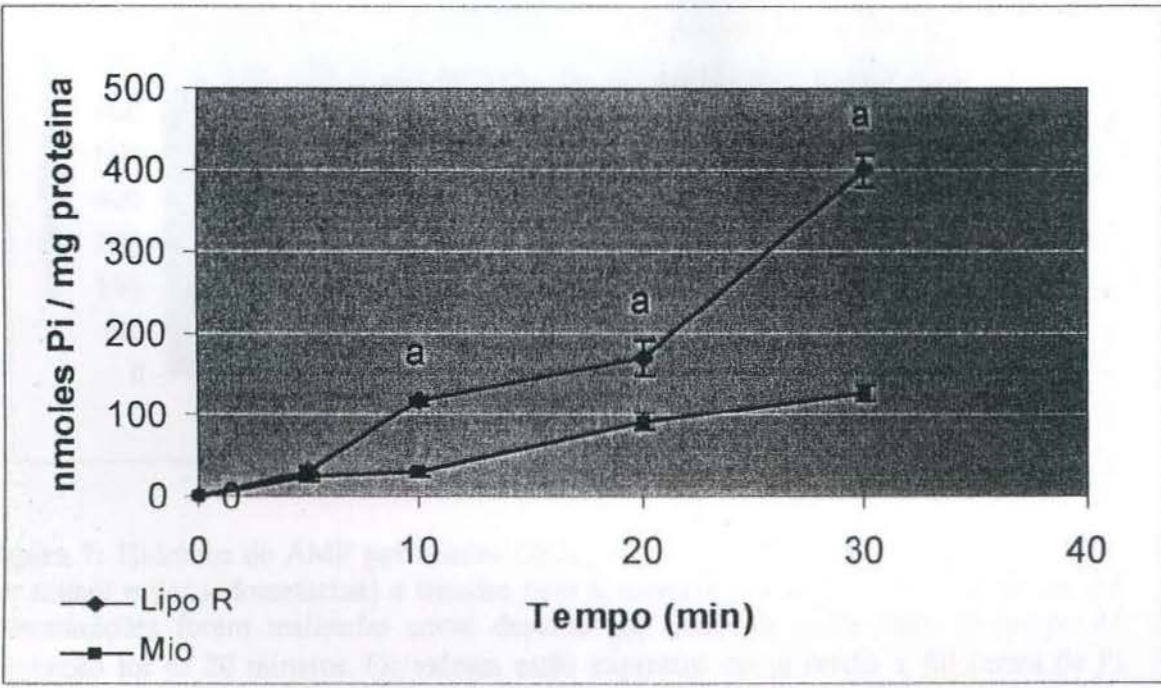
O estudo da atividade de ecto-5' nucleotidase mostrado nos experimentos representados nas Figuras 6 e 7, evidenciou que os lipócitos induzidos pelo tratamento com retinol apresentavam uma atividade significativamente maior que os miofibroblastos (células mantidas em condições padrão de cultura).



(A)

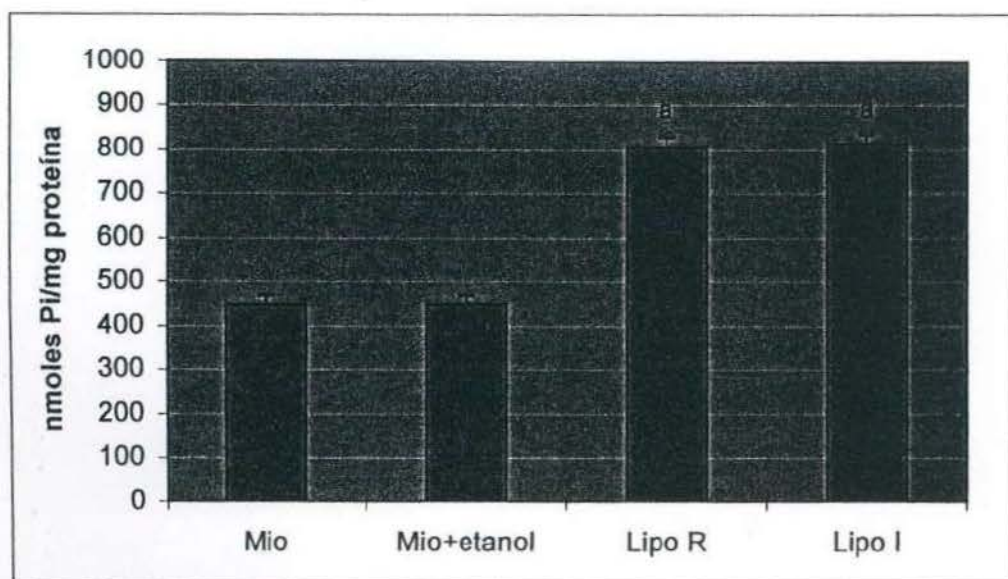


(B)



**Figura 6 :** (A) Curva de substrato da Ecto 5' nucleotidase; (B) Curva de tempo da Ecto 5' nucleotidase: hidrólise do AMP por células GRX lipocíticas e miofibroblastóides. As determinações foram realizadas como descrito em materiais e métodos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  SE (nmol de Pi liberados por mg de proteína) de pelo menos três experimentos, realizados em triplicatas. a = significativamente diferente do miofibroblasto (Mio) para um  $p < 0,05$ .

A figura 7 representa as atividades de ecto-5' nucleotidase em células miofibroblastóides (controles), lipócitos induzidos por retinol, por indometacina e em células tratadas apenas com etanol (solvente das duas drogas). A análise dos resultados mostra que o etanol não altera atividade da enzima e que a atividade é semelhante nos dois tipos de lipócitos sendo significativamente maior que nos controles e nas células tratadas apenas com etanol.



**Figura 7:** Hidrólise do AMP por células GRX, miofibroblastóides, lipocíticas (induzidas por retinol e por indometacina) e tratadas com o solvente dos dois agentes indutores. As determinações foram realizadas como descrito em materiais e métodos. O tempo de incubação foi de 20 minutos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  SE (nmol de Pi liberados por mg de proteína) de pelo menos três experimentos, realizados em triplicatas. **a** = significativamente diferente dos miofibroblastos (Mio) e dos miofibroblastos tratados apenas com etanol (Mio + etanol) para um  $p < 0,05$ .

A figura 8 representa a determinação por imunocitoquímica das atividades de ecto-apirase (Figura 8-A) e de ecto-5' nucleotidase (figura 8-B). A presença de ecto-apirase foi comprovada pela reação com o anticorpo anti-CD39 e a de ecto-5' nucleotidase pela reação com anti-CD73. Incubações somente com o segundo anticorpo descartaram a possibilidade de ligação inespecífica (figura 8-A (1)).

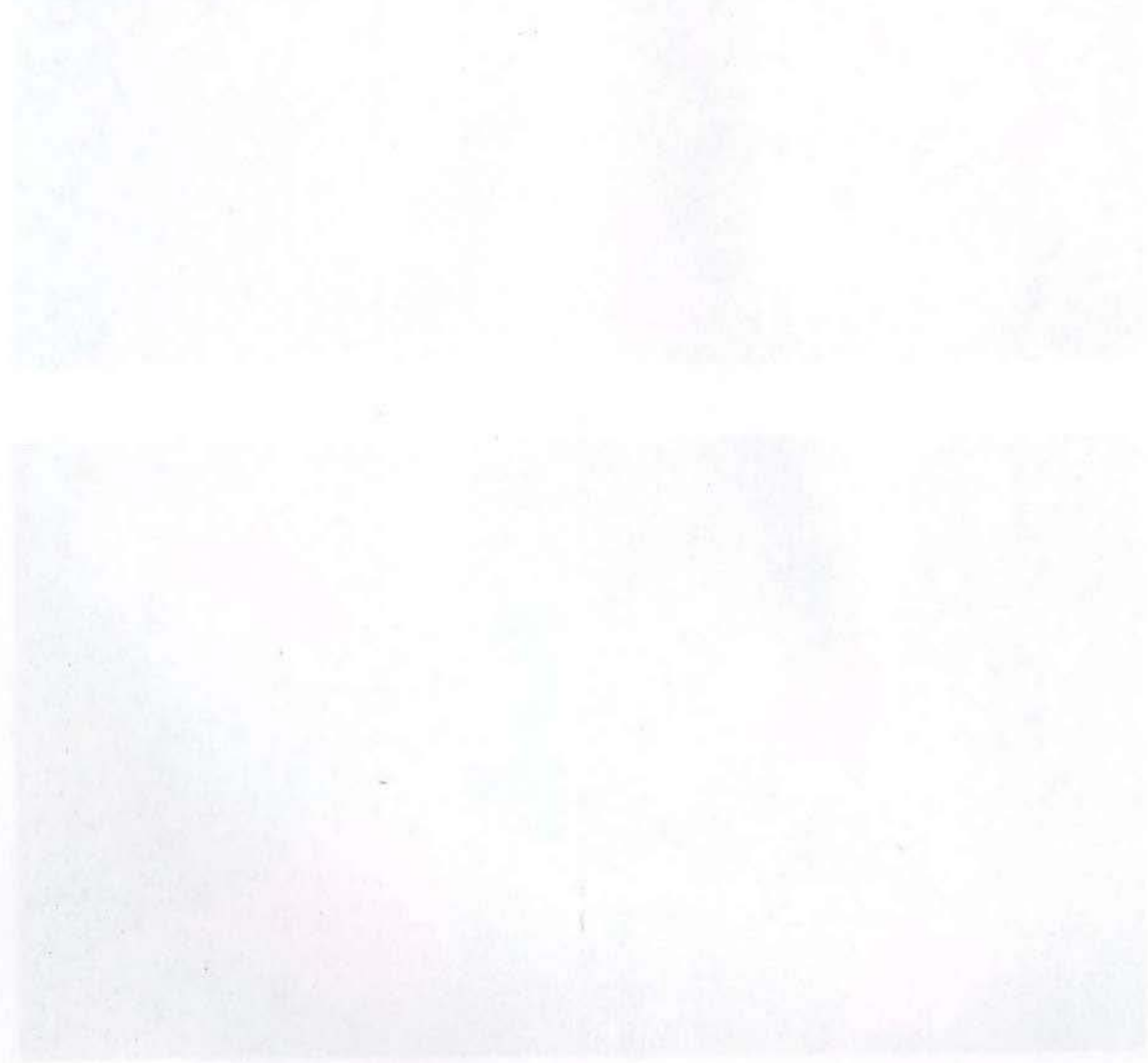
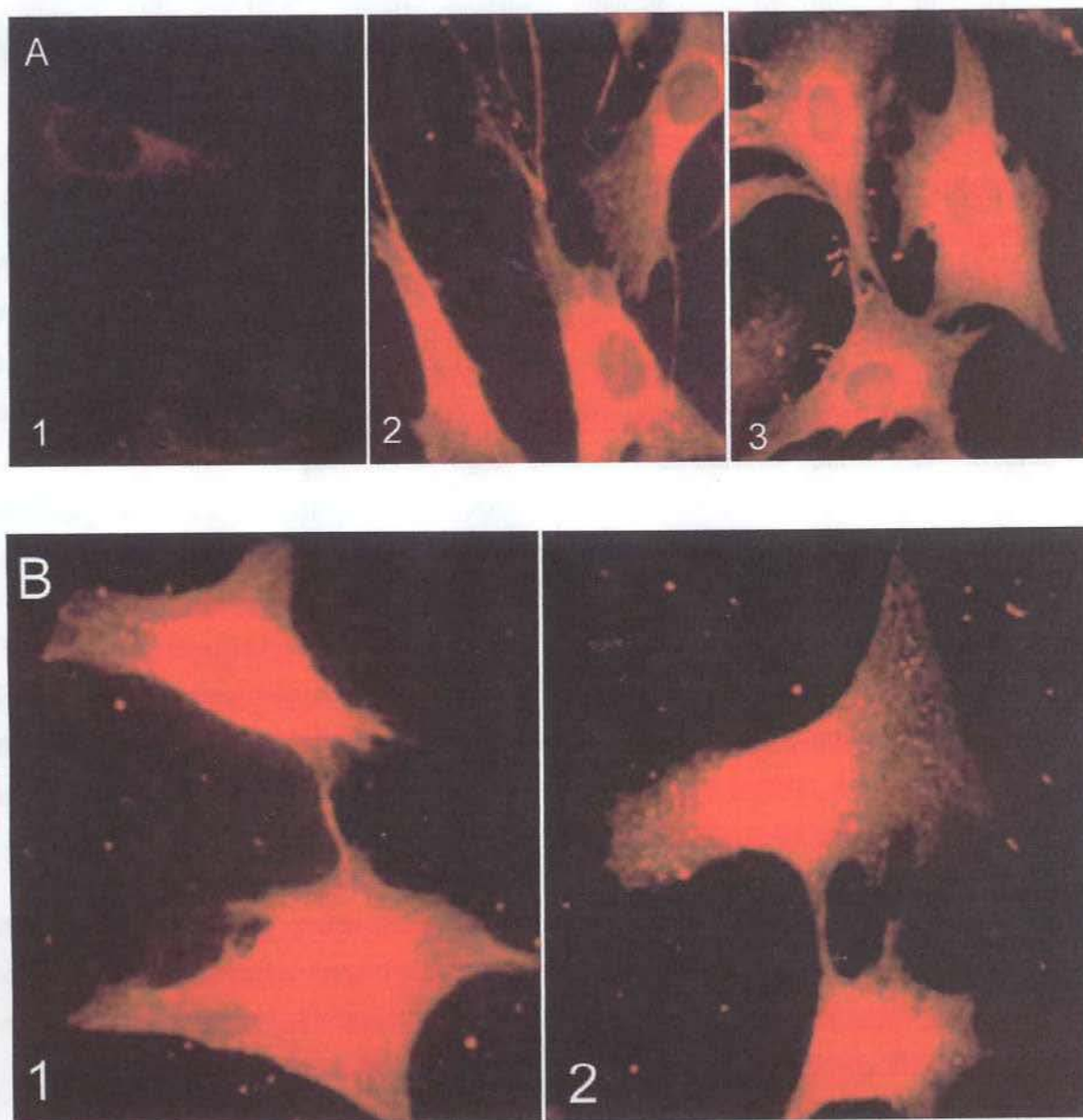


Figura 8. Imunocitoquímica de Ecto-apirase (CD39) e Ecto-5' nucleotidase (CD73) em células peritoneais. (A) Ecto-apirase (CD39) e (B) Ecto-5' nucleotidase (CD73). (1) Controle negativo (sem anticorpo primário).





**Figura 8:** (A) Revelação imunocitoquímica da Ecto- apirase (CD39); (B) e da ecto-5' nucleotidase (CD 73): As condições experimentais estão descritas em materiais e métodos. (A); 1, controle ligação inespecífica; 2, miofibroblasto; 3; lipócito (induzido com retinol) (B); 1, miofibroblasto; 2, lipócito (induzido com retinol) Magnitude 400x.

## 5. Discussão:

As HSC são uma população de células aparentemente heterogênea. Em reações fibróticas do tecido hepático, elas podem mudar de seu fenótipo “quiescente” para um “ativado” ou miofibroblastóide, expressando altos níveis de desmina,  $\alpha$ -actina de músculo liso e secretando ativamente matriz extracelular (GRESSNER, 1991). Alternativamente, elas podem mudar para o fenótipo “lipocítico”, quando acumulam gotas de lipídios e estocam retinol. O primeiro fenótipo é representado no modelo *in vitro* de ativação espontânea das culturas primárias de HSC, quando isoladas de ratos alimentados com excesso de vitamina A e postas em contato com plástico (RAMADORI, 1991). O último não pode ser observado em culturas primárias de HSC que não podem ser convertidas para o fenótipo lipocítico, mas pode ser estudado no modelo de indução lipocítica estabelecido na linhagem GRX (BOROJEVIC et al, 1990).

O modelo experimental de células estreladas hepáticas GRX permite estudar vários parâmetros metabólicos que sofrem alterações ao longo da indução do fenótipo lipocítico. Possibilitando assim, a discussão de seu papel no fígado, tanto em condições fisiológicas normais quanto patológicas. Neste trabalho nós estudamos as atividades de ectonucleotidases nos dois fenótipos da linhagem GRX.

Trabalhos anteriores tem demonstrado que a adenosina possui um importante papel no metabolismo celular, tendo como exemplo sua função hepatoprotetora. Sabe-se, por exemplo que esse nucleosídeo provoca uma inibição da síntese de colágeno, principal constituinte responsável pela formação de cirrose hepática.

A produção extracelular de adenosina é favorecida pela cadeia enzimática formada por ATP difosfohidrolase e 5'nucleotidase. A ATP difosfohidrolase ou apirase, é uma ectoenzima capaz de remover dois fosfatos lábeis do ATP e um do ADP. Ao hidrolisar os nucleotídeos ATP e ADP, forma AMP que é substrato para a 5'nucleotidase, contribuindo assim para a produção de adenosina.



As figuras 4 e 5, representam o estudo do efeito do tempo sobre as atividades de ecto-ATPase e ecto-ADPase em células GRX miofibroblastóides e em lipócitos induzidos pelo tratamento com retinol. Os resultados mostram que não há diferenças entre as velocidades de hidrólise do ATP e do ADP pelos dois fenótipos.

Já os resultados das figuras 6A e 6B mostram que nos lipócitos a atividade de ecto 5'- nucleotidase é cerca de 3 vezes maior que nos miofibroblastos. A análise da curva de substrato (fig.6A) nos permite sugerir que existe maior quantidade de enzima no fenótipo lipocítico, indicando haver um aumento na expressão da mesma neste fenótipo.

Os resultados apresentados na figura 7 mostram que lipócitos induzidos pelo tratamento com indometacina apresentam os mesmos níveis de atividade de ecto-5' nucleotidase que os induzidos por retinol. Na mesma figura pode-se também verificar que o etanol, solvente das duas drogas, não tem nenhum efeito sobre a atividade.

Os resultados aqui apresentados sugerem a existência nas células GRX de atividades da cadeia enzimática, composta por ecto-NTDPases e ecto 5' nucleotidase, cuja finalidade é produzir adenosina no meio extracelular. Com a identificação na membrana das células GRX (miofibroblastóides e lipocíticas) de uma proteína imuno-revelada pelo anticorpo anti-CD39 (figura 8A), pode-se afirmar que pelo menos parte da hidrólise de ATP e ADP encontrada nos experimentos usando células intactas é proveniente da ecto-apirase. A presença ecto-5' nucleotidase também foi confirmada imunocitoquímica, figura 8B.

O fato da atividade de ecto-5' nucleotidase ser semelhante nos dois tipos de lipócitos, isto é, induzidos por retinol ou por indometacina, diminui a possibilidade de uma ação direta das drogas indutoras sobre a enzima. Sabe-se também, que os programas de diferenciação desencadeados pelas duas drogas são diferentes. Estes fatos nos permitem sugerir que o aumento da atividade de ecto -5' nucleotidase que acompanha a diferenciação lipocítica deva estar relacionado com a função desempenhada por este tipo celular no tecido hepático.



O efeito da adenosina prevenindo a cirrose hepática induzida por CCl<sub>4</sub> está associado com uma melhora geral da função hepática deteriorada pela toxina. HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al (1990) mostraram que o tratamento por 4 semanas com CCl<sub>4</sub> causa uma diminuição nos níveis de ATP hepáticos e que depois de 8 semanas de tratamento a quantidade total de nucleotídeos da adenina está diminuída. A adenosina foi capaz de reverter essas alterações, aumentando a carga energética.

A adenosina é um potente vasodilatador, considerado um dos principais reguladores do fluxo arterial hepático, isto seria importante principalmente nas regiões centrilobulares do fígado que normalmente são menos oxigenadas. A ação vasodilatadora seria controlada por adenosina produzida localmente (LAUTT et al, 1985).

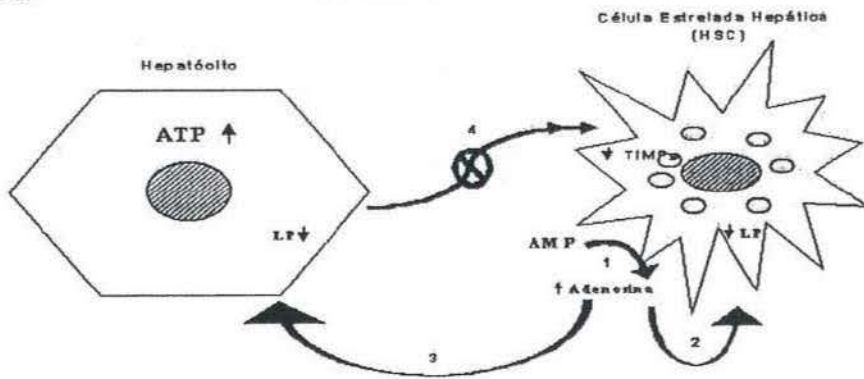
BELOSSA et al (1994) demonstram em co-culturas de hepatócitos e HSCs tratadas com CCl<sub>4</sub> que os hepatócitos exercem um efeito "parácrino" sobre a lipoperoxidação (LP) e a expressão dos genes do colágeno tipo I nas HSCs. O tratamento com álcool alílico que causa o mesmo grau de lesão hepática, mas sem induzir a formação de adutos aldeído-proteína, não tem efeito sobre a síntese de colágeno, mostrando que a necrose dos hepatócitos não é suficiente para a ativação da expressão do gene. Esses experimentos também mostraram que a LP dos hepatócitos atuaria regulando a síntese de colágeno pelas HSCs, comprovando a existência da ligação entre o dano ocorrido nos hepatócitos e a fibrogênese hepática.

Em conclusão, os resultados aqui apresentados, nos permitem desenvolver as seguintes hipóteses para justificar a maior produção de adenosina extracelular pelo fenótipo lipocítico da linhagem GRX:

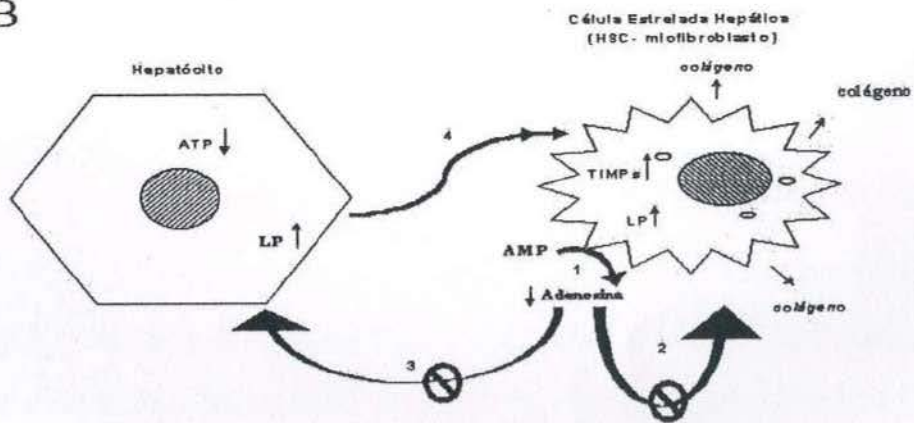
- a) A adenosina atuaria de forma autócrina nas HSCs, ativando produção de TIMPs, aumentando a atividade colagenolítica, participando assim da manutenção homeostasia da matriz extracelular.
- b) Considerando que o processo fibrogênico está diretamente relacionado com o aumento do estresse oxidativo, a adenosina diminuiria os níveis de LP de forma autócrina nas HSCs e de forma parácrina nos hepatócitos.

O resultados dessas ações seriam menor síntese de colágeno pelas células HSC diminuindo a lesão fibrótica. Já nos hepatócitos a adenosina diminuiria a LP, normalizando a carga energética e inibindo a ação ativadora sobre a síntese de colágeno nas HSCs.

A



B



**Figura 9** : Relação hepatócito / HSC : ações autócrinas e parácrinas da adenosina.

**LP**, lipoperoxidação; **TIMPs**, inibidores teciduais de metaloproteinases

**1**= Ecto- 5' nucleotidase; **2**= ação autócrina sobre as HSC (diminui a LP e os níveis de TIMPs);

**3**= ação parácrina sobre os hepatócitos (diminui a LP); **4**= ação parácrina dos hepatócitos sobre as HSC (estimulada pela maior peroxidação)

**A** =

- **HSC**: maior produção de adenosina extracelular = ação autócrina, menor LP; menor produção de TIMPs; menor deposição de colágeno; menor fibrogênese
- **Hepatócitos**: ação parácrina, menor LP; inibição da ação parácrina sobre as HSC que estimula a síntese de colágeno; aumento da carga energética.

**B** =

- **HSC**: baixa produção de adenosina extracelular = maior LP, maior síntese de TIMPs, maior síntese de colágeno, maior fibrogênese.
- **Hepatócito**: menor carga energética, maior LP, ação parácrina sobre as HSC aumentando a síntese de colágeno.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTASTINI, <sup>a</sup> M. <sup>o</sup>, ROCHA, J. B. T., BARCELLOS, C. K., DIAS, R. D. & SARKIS, J. J. F. Characterization of na ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochem. Res.** 16: 1303-1310, 1991.

BATTASTINI, A .M.O .; OLIVEIRA, E.M.; MOREIRA, C.M.; BONAN, C.D.; SARKIS, J.J.F. & DIAS, R.D. Solubilization and characterization of na ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from rat brain synaptic plasma membranes. **Biochem. Mol. Int.** 37: 209-219, 1995.

BEDOSSA, P., HOUGLUM, K., TRAUTWEIN, C., HOLSTEGE, A ., CHOJKIER, M. Stimulation of collagen alpha 1(1) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? **Hepatology**, 19(5): 1262-71, 1994.

BERNE, R.M.; WINN, H.R. & RUBIO, R. The local regulation of cerebral blood flow. **Prog. Cardiovasc. Dis.** 24: 243-260, 1981.

BLANER, W.S.; OLSON, J.A . Retinol and retinoic acid metabolism. In: Sporn, M.B.; Roberts, <sup>a</sup>B.; Goodman, D.S. (Ed) **The Retinoids - Biology, Chemistry and Medicine**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 5, p.229.

- BLOMHOFF, R.; WAKE, K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis: **The FASEB Journal**, 5: 271-277, 1991.
- BOROJEVIC, R.; MONTEIRO, A .N.; VINHAS, S.A . DOMONT, G.B.; MOURAO, P.A .; EMONARD, H.; GRIMALDI, G.JR.; GRIMAUD, J.A . Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, 21: 382-390, 1985.
- BOROJEVIC, R.; GUARAGNA, R.M.; MARGIS, R.; VICENTE, C.P. AND DA SILVA, L.C. In vitro conversion of a hepatic myofibroblast cell line GRX into lipocytes (Ito cells). **Cells of the Hepatic Sinusoid.**, 3: 249-252, 1991.
- BRAESCO, V.A .; DODEMAN, I.; DELPAL, S., GOUABAU, M.C.A .; PARTIER, A .; BOREL, P.; GROLIER, P. Vitamin A contained in the lipid droplets of rat liver stellate cells is substrate for acid retinyl ester hidrolase. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1259: 271-276, 1995.
- BRUNDEGE, J.M. & DUNWIDDIE, T.V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. **Advances in Pharmacology**, 39: 353-391, 1997.
- BURNSTOCK, G. Physiological and Pathological Roles of Purines: Na Update. **Drug Development Research**, 28: 195-206, 1993.

CARLONI, V., ROMANELLI, R.G., PNZANI, M., LAFFI, G., GENTILINI, P. Expression and function of integrin receptors for collagen lamin in cultured human hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, 110: 1127-1136, 1996.

CUNHA, R. A. Adenosina as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, 38: 107-125, 2001.

DARVISH, A.; POMERANTZ, R. W.; ZOGRAFIDES, P. G.; METTING, P. J. Contribution of cytosolic and membrane-bound 5'-nucleotidases to cardiac adenosine production. **Am. J. Physiol.** 271(5 Pt 2): H2162-7, 1996.

DRAGUNOW, M. & FAULL, R.L. Neuroprotective effects of adenosine. **Trends Pharmacol. Sci.**, 9: 193-194, 1988.

DRURY, A .N. & SZENT-GYÖRGYI, A . The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. **J. Physiol.** (London) 68: 213-237, 1929.

DUNWIDDIE, T.V. & HOFFER, B.J. Adenine nucleotides and synaptic transmission in the in vitro rat hippocampus. **Br. J. Pharmacol**, 69: 59-68, 1980.

DUNWIDDIE, T.V. & DIAO, L. Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 268: 537-545, 1994.



- DUNWIDDIE, T.; DIAO, L. & PROCTOR, W.R. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. **J. Neurosci.**, 17: 7673-7682, 1997.
- FRANCO, R.; CASADÓ, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E.I. & LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Prog. Neurobiol.**, 52: 283-294, 1997.
- FRIEDMAN, S. Cytokines and Fibrogenesis. **Seminars in Liver Disease**, 19 (2): 129-140, 1999.
- GRESSNER, A.M. Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. **Eur. J. Chem. Clin. Biochem.**, 29: 293-311, 1991.
- GUARAGNA, R. M., TRUGO, L., BOROJEVIC, R. Neutral lipid synthesis and accumulation during in vitro induction of the lipocyte phenotype in hepatic connective tissue cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1985: 29-34, 1991.
- HAUTEKEETE, M.L.; GEERTS, A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. **Virchows Archives**, 430: 195-207, 1997.
- LLOYD, H.G.B., LINDSTROM, K. & GREENHOLM, B.B. **Virchows Archives**
- HERNANDEZ-MUNOZ R., DIAZ-MUNOZ M., DE SANCHEZ, V.C. Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Arch Biochem Biophys**, 294(1): 160-7, 1992.

HERNANDEZ-MUNOZ, R., DÍAZ-MUNOZ, M., LÓPEZ, V., LÓPEZ-BARRERA, F., YÁNEZ, L., VIDRIO, S., ARANDA-FRAUSTRO, A., CHAGOYA DE SÁNCHEZ, V. Balance Between Oxidative Damage and Proliferative Potential in an Experimental Rat Model of CCl<sub>4</sub> - Induced Cirrhosis: Protective Role of Adenosine Administration. **Hepatology**, 26: 1100-1110, 1997.

HERNANDEZ-MUNOZ, R., DIAZ-MUNOZ M, SUAREZ-CUENCA JÁ, TREJO-SOLIS C, LOPEZ V, SANCHEZ-SEVILLA L, YANEZ L, DE SANCHEZ VC. Adenosine reverses a preestablished CCl<sub>4</sub>-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. **Hepatology**, 34: 677-87, 2001.

KOMOSZYNSKI, M. A. Apyrases-enzymes controlling levels of free nucleotides in cells and tissues. **Postepy Biochem.** 40(3): 174-81, 1994.

LAUTT, W.W., LEGARE, D.J., D'ALMEIDA, M.S. Adenosine as putative ewgulator of hepatic arterial flow (the buffer response). **Am. J. Physiol.**, 248(3 Pt 2): H331-8, 1985.

LLOYD, H.G.E., LINDSTROM, K. & GREDHOLM, B.B. Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion. **Neurochem. Int.**, 23: 173-185, 1993.

MAGNUMUSSON, B. C.; HEYDEN, G.; SVENNSON, S. E. Histochemical observations on 5'-nucleotidase activity in equamous cell carcinomas of the rat. **Histochemistry**, 42: 1-8, 1974.

MARGIS, R., BOROJEVIC, R. Retinoid – mediated induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line (GRX). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1011:1-5, 1989.

MEYERHOF, O. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. **J. Biol. Chem.** 157: 105-119, 1945.

MONTEIRO, A. N. A.; BOROJEVIC, R. Interaction of human liver connective tissue cells, skin, fibroblasts and smooth muscle cells with collagen gels. **Hepatology**, 7: 665-671, 1987a.

NANNI, G.; CANEPA, C.; CASU, A. Dolichol and vitamin A content in rat liver Ito (perisinusoidal) cells. **Cells Life Sciences**, 60: 21-28, 1997.

NISHIO, H.; TAKESHITA, K.; OKUGAWA, K.; SEGAWA, T. Effect of concanavalin A on 5'-nucleotidase activity of rabbit blood platelets. **J. Pharmacol.**, 43: 230-233, 1987.

ORFORD, M. R.; SAGGERSON, E. D. A low-K<sub>m</sub> 5'-nucleotidase from rat brain cytosolic fraction: purification, kinetic properties, and description of regulation by a novel factor that increases sensitivity to inhibition by ATP and ADP. **J. Neurochem.** 67(2): 795-804, 1996.



- PATEL, B.T. & TUDBALL, N. Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase and adenosine deaminase immunoreactivities in rat brain. **Brain Res.**, 370: 250-264, 1986.
- PERALTA, C., HOTTER, G. CLOSA, D. PRATS, N., XAUS, C., GELPI, E., ROSELLO-CATAFAU, J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. **Hepatology**, 29 (1): 126-132, 1999.
- PINZANI, M.; GENTILINI, P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. **Seminars in Liver Disease**, 19: 397-410, 1999.
- PLESNER, L. Ecto-ATPases: Identities and Functions. **Int. Ver. Cytol.**, 158: 141-214, 1995.
- RALEVIC, V. & BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev** 50: 413-492, 1998.
- RAMADORI, G. The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell. **Virchows Arch. B Cell. Pathol.**, 61: 147-158, 1991
- RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.L.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, C.; HERMAN, M.A. R.; REED, J.K.; CICCARELLI, R.; Di ORIO, P. & CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Prog. Neurobiol.**, 59: 663-690, 1999.

ROBLES-FLORES, M.; ALLENDE, G.; PINA, E., GARCIA-SAINZ, J. A .  
Croos-talk between glucagon-and adenosine-mediated signalling systems in  
rat hepatocytes: effects on cyclic AMP-phosphodiesterase activity.  
**Biochem. J.** , 312 (3): 763-767, 1995.

ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. **Pathologic Basis of Disease.**  
5 ed. Philadelph. W.B. Saunders, 1994.

SATTIN, A . & RALL, T.W. The effect of adenosine and Adenine nucleotides  
on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral  
cortex slices. **Mol Pharmacol.**, 6: 13-23, 1970.

SCHMID, T.C., LOFFING, J., LE HIR, M., KAISLING, B. Distribution of  
ecto-5'-nucleotidase in the rat liver: effect of anaemia. **Histochemistry**,  
101(6): 439-47, 1994.

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

ZIMMERMANN, H.; VOGEL, M.; LAUBE, U. Hippocampal localization of  
5'-nucleotidase as revealed by immunocytochemistry. **Neuroscience.**  
55(1): 105-12, 1993.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecti-  
nucleotidases in the nervous system. **Prog. Neurobiol.** 49, 587-618, 1996.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B. & HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system, **Neurochem. Int.**, 32: 421-425, 1998.