

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS,
EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DAS ECTO-NUCLEOTIDASES EM
CULTURA DE ASTRÓCITOS E LINHAGENS DE GLIOMAS**

MÁRCIA ROSÂNGELA WINK

Orientadora:

PROFA. DRA. ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre

2003

Aos meus pais, pela presença e apoio incondicional,

desde o primeiro dia de aula

Ao Guido, por ter mostrado o caminho, com o exemplo

*Na vida e no trabalho, o mais importante é
converter-se em algo que não se era no início.*

Michel Foucault

Agradecimentos

Ao **CNPq** pelo financiamento da minha formação com as bolsas de iniciação científica, doutorado e pela grande oportunidade da bolsa de “doutorado-sanduíche”.

À minha orientadora **Ana**, por tudo que representa para mim. Pela liberdade e confiança que sempre me ofereceu. Por ter aberto as portas que me possibilitaram a realização do sonhado “doutorado-sanduíche”. Pela presença constante e trabalho incansável durante o ano de 2002 para a finalização dessa tese. Pela amizade conquistada de forma equilibrada e madura desde 1995.

Às minhas bolsistas **Ale** (Alessandra S.K. Tamajusuku) e **Lizi** (Elizandra Braganhol), minhas princesinhas, que foram os anjinhos que Deus colocou na terra ao meu lado, para me prestar ajuda, força e ânimo para a realização dessa conquista. Sem vocês não teria sido possível. Espero que na vida profissional de vocês, iniciada agora com o mestrado, vocês possam sempre encontrar pessoas que façam por vocês, o que fizeram por mim.

Ao **Sarkis** pela amizade de longos anos; pela ajuda e orientação; e pelo carinho, cordialidade e proximidade com que trata os alunos.

I would like to thank Dr. **Simon C. Robson** for his patient and wise orientation and for welcoming me so nicely in his group; my dear friend **Kita** (Elzbieta Kaczmarek) for teaching me all techniques in the lab and for the beautiful friendship; to my wonderful lab-mates and friends **Eva, Yan, Mika, Amir, Sun** and **Keiichi** for all help and unforgettable time in Boston.

À Professora **Maria Luiza Barreto-Chaves** (Dep. Anatomia, ICB, USP), **Luiz Fernando Zerbini** (Harvard Medical School) e aos colegas **Émerson A. Casali** e **Juliana Karl** pela excelente colaboração, coleguismo e amizade.

Aos queridos colegas e amigos **Jean, Emerson, Carla, Déia, Bá, Ale** (Gibirú), **Ina, Grace, Simone, Ale** (japa), **Eli, Ana, Cris, Dani, Denise** pelo excelente convívio no laboratório, por

toda a ajuda, pelo vôlei regado a chimarrão e chocolate, pelas deliciosas jantãs e passeios sempre divertidos e descontraídos. A presença de todos vocês fez com que o nosso laboratório se transformasse num ambiente agradável e acolhedor, onde sempre adorei estar e trabalhar.

À **Denise** e Dona **Lia** pela ajuda técnica indispensável a todos nós.

À **Adriana B. Rocha, Cleber, Leonardo, Carol, Andressa, Ana Paula e Fernanda** pelo auxílio inicial com as culturas de gliomas.

Aos colegas da cultura do terceiro andar, em especial **Carmem, Mônica e Francine** por toda a ajuda com as culturas de astrócitos e principalmente pela amizade.

À Professora **Fátima C. R. Guma e seus estudantes** pelas aulas práticas de cultivo dos gliomas, por toda a solicitude e gentileza com que receberam e auxiliaram a mim e as minhas bolsistas na cultura.

À **Cléia** pela excelente profissional, sempre prestativa e atenciosa com todos os alunos.

A todos os **professores, colegas e funcionários** que me ajudaram de alguma maneira.

Aos meus pais, **Antônio e Zenilda** e a minha irmã, **Sílvia** que são tudo pra mim.

Ao **Guido** com admiração e reconhecimento, por toda ajuda, apoio, incentivo e companherismo durante todos esses anos.

Ao vô **Vitalino** (*in memoriam*) que tanto torceu para essa conquista. Por todo carinho e admiração.

A **Deus** por ter me dado sabedoria, coragem, força e paciência nos momentos mais difíceis. Por eu sempre encontrar amor e bondade em todos os lugares por onde ando.

Resumo

Nucleotídeos extracelulares são envolvidos em diversos processos patofisiológicos no sistema nervoso central. Astrócitos são a maior fonte de nucleotídeos extracelulares da adenina no cérebro e também importantes alvos para as ações desses nucleotídeos via receptores purinérgicos P2. As ações induzidas pela sinalização purinérgica são reguladas pelas ecto-nucleotidases, que incluem membros da família das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'N) e ecto-adenosina deaminase (ADA). Culturas de astrócitos preparadas de hipocampo, córtex e cerebelo de ratos foram capazes de rapidamente converter ATP extracelular a ADP, que foi então hidrolizado a AMP. Os nucleosídeos tri-fosfatados foram hidrolisados preferencialmente aos difosfatados em todas as estruturas cerebrais. A análise cinética sugere que varias ecto-nucleotidases estão envolvidas nessa cascata enzimática. Análises preliminares de mRNA por PCR indicaram que astrócitos expressam múltiplos membros da família das NTPDases (NTPDase1 a NTPDase3 e NTPDase5/6). Por RT-PCR quantitativo (Real-time PCR), nós identificamos a NTPDase2 (CD39L1) como a NTPDase predominante expressa por astrócitos de hipocampo, córtex e cerebelo de ratos.

Astrócitos do cerebelo apresentaram um padrão diferente para a hidrólise do AMP, com uma atividade específica 7 vezes maior, quando comparada com astrócitos de hipocampo e córtex. Uma maior expressão da ecto-5'N por RT-PCR foi identificada nessa estrutura. Não houve acúmulo de adenosina extracelular em todas as estruturas estudadas, indicando a presença de uma alta atividade ecto-adenosina deaminase em astrócitos. Dipiridamol aumentou significativamente os níveis de inosina no meio extracelular de astrócitos de hipocampo e córtex, mas não em astrócitos de cerebelo. Essas diferenças observadas podem indicar heterogeneidade funcional dos nucleotídeos no cérebro.

Com o objetivo de investigar as enzimas envolvidas no catabolismo dos nucleotídeos como indicadores da invasividade e agressividade dos gliomas malignos, nós avaliamos a degradação dos nucleotídeos extracelulares em cinco linhagens de gliomas diferentes e comparamos com astrócitos. Todas as linhagens de gliomas examinadas apresentaram baixas razões de hidrólise quando comparadas com astrócitos. Resultados preliminares sugerem que a falta de expressão da NTPDase1 e 2 possam ser responsáveis pela baixa hidrólise de ATP nas linhagens de gliomas. Considerando que o ATP é reconhecido como um fator mitogênico que induz a proliferação em células de gliomas, a substancial diminuição na hidrólise de ATP e ADP observadas em gliomas, sugere que alterações na via das ecto-nucleotidases pode representar um importante mecanismo associado com a transformação maligna desse tipo de tumor.

Abstract

Extracellular nucleotides have been implicated in diverse pathophysiological processes within the nervous system. Astrocytes are the major source of extracellular adenine-based nucleotides in the brain and an important target for the actions of nucleotides mediated via type-2 purinergic receptors (P_2). The actions induced by purinergic signaling are regulated by ecto-nucleotidases, including members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (E-NTPDase family), ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-N) and ecto-adenosina deaminase (ADA). Intact rat astrocytes cultured from hippocampus, cortex and cerebellum were able to rapidly convert extracellular ATP to ADP, that was in turn hydrolyzed to AMP. Tri-phosphonucleosides were hydrolyzed preferentially over di- and mono-phosphonucleosides in all brain structures. Kinetics analyses suggest that several ecto-enzymes are involved in this cascade. Preliminary mRNA analysis by PCR indicated that astrocytes express multiple NTPDase family members (NTPDase1 to NTPDase3 and NTPDase5/6). By quantitative real-time PCR, we identified NTPDase2 (CD39L1) as a predominant NTPDase expressed by astrocytes from hippocampus, cortex and cerebellum.

Astrocytes from cerebellum presented a distinct pattern for AMP hydrolysis with a 7-fold higher specific activity than cortical or hippocampal cells. A higher expression of ecto-5'-N was identified by RT-PCR in this structure. No accumulation of extracellular adenosine in all structures studied was observed, indicating the presence of a very active ecto-adenosina deaminase in astrocytes. Dipyridamol increased significantly inosine levels in the extracellular medium of hippocampal and cortical, but not in cerebellar astrocytes medium. The differences observed may indicate functional heterogeneity of nucleotides in the brain.

In order to characterize the enzymes involved in the purine nucleotide catabolism as indicators of invasiveness and aggressiveness of malignant gliomas, the degradation of extracellular nucleotides by five different glioma cell lines was investigated and compared with primary astrocytes. All glioma cell lines examined presented low rates of ATP hydrolysis when compared with astrocytes. Preliminary results point to a lack of expression of NTPDase1 and 2 in can be responsible for the low ATP hydrolysis in glioma cell lines. Considering that ATP is recognized as a mitogenic factor that induces proliferation in human glioma cells, the substantial decrease in ATP and ADP hydrolysis observed in gliomas leads us to suggest that alterations in the ecto-nucleotidases pathway may represent an important mechanism associated with malignant transformation of this kind of tumor.

Índice

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Nucleotídeos extracelulares	1
1.1.1	Receptores	1
1.1.2	O nucleotídeo ATP e a transmissão purinérgica	5
1.1.3	O nucleosídeo Adenosina.....	6
1.1.4	Importância da regulação	10
1.2	Ectonucleotidases	12
1.2.1	As apirases e as ecto-ATPases	12
1.2.2	A família E-NTPDase	17
1.2.3	A família E-NPP	28
1.2.4	Ecto-5'-Nucleotidase (EC 3.1.3.5).....	29
1.2.5	Adenosina deaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4).....	31
1.3	Células Gliais	32
1.3.1	Astrócitos.....	34
1.3.2	Interrelação Glia-glia e Glia-neurônio	37
1.3.3	Gliose reativa.....	39
1.3.4	As purinas e os astrócitos	40

1.4	Gliomas	41
1.4.1	Astrocitomas	42
2	OBJETIVOS	49
3	CAPÍTULOS - ARTIGOS CIENTÍFICOS	50
3.1	Capítulo 1	50
3.2	Capítulo 2	59
3.3	Capítulo 3	86
3.3.1	Anexo	121
4	DISCUSSÃO	133
4.1	Degradação dos nucleotídeos extracelulares em astrócitos	133
4.2	NTPDases em astrócitos	137
4.3	Degradação alterada dos nucleotídeos extracelulares em gliomas ...	140
4.4	Ecto-5'-nucleotidase nos gliomas	142
4.5	Expressão das NTPDases em gliomas	144
4.6	Modelo proposto para o envolvimento do ATP e das NTPDases em gliomas	149

5	CONCLUSÕES	154
5.1	Gerais	154
5.2	Específicas	154
6	PERSPECTIVAS	156
7	PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO DOUTORADO	157
8	REFERÊNCIAS	158

Índice de Figuras

Figura 1. Receptores de nucleotídeos e seus efetores.	3
Figura 2. Vias gerais do catabolismo dos nucleotídeos da adenina e geração de adenosina nas células.	8
Figura 3. Ilustração geral dos efeitos da adenosina.	10
Figura 4. Funções do ATP liberado no terminal nervoso e sua completa hidrólise até adenosina no espaço extracelular.	11
Figura 5. Topografia de membrana proposta para as ectonucleotidases.	18
Figura 6. Glia radial fornece suporte e direcionamento para a migração neuronal. .	35
Figura 7. O ciclo glutamato-glutamina.	36
Figura 8. Via de sinalização da sinapse tripartida.	38
Figura 9. Os dois tipos de glioblastoma.	44
Figura 10. Relação entre sobrevivência média, características histológicas e maiores lesões genéticas associadas com cada tipo de tumor.	46
Figura 11. Modo de ação da PTEN/MMAC1/TEP1 via sua regulação pela atividade proteína tirosina fosfatase ou fosfatidilinositol 3-fosfatase.	48
Figura 12. Modelo proposto para o envolvimento do ATP extracelular na progressão dos gliomas.	153

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais agonistas e antagonistas e localização dos receptores Purinérgicos.	4
Tabela 2. Nomenclatura e preferência de substratos dos membros da família E-NTPDase em vertebrados.	19

Lista de abreviaturas

ABC - ATP-binding cassette proteins

ACR - apyrase Conserved Regions

ADP - adenosina difosfato

AMP - adenosina monofosfato

ATP - adenosina trifosfato

CD39 - antígeno de ativação celular linfóide

CTP - citidina trifosfato

EBV - vírus Epstein Barr

Ecto -5'N - ecto-5'-nucleotidase

Ecto-ADA - ecto-adenosina deaminase

Ecto-ATPDase - ecto-ATP diphosphohydrolase

E-NPP family - ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family

E-NTPDase family - ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family

GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GTP -guanosina trifosfato

HB6 - human brain E-type ATPase clone

HPLC - high-performance liquid chromatography

ITP - inosina trifosfato

mRNA - RNA mensageiro

NDP - nucleoside diphosphate

NTP - nucleoside triphosphate

NTPDase - nucleoside triphosphate diphosphohydrolase

P2X - receptor purinérgico ionotrópico

P2Y - receptor purinérgico metabotrópico

Pi - fosfato inorgânico

p-nitrophenyl-TMP - p-nitrophenyl-5'-thymidine-monophosphate

Ppi - pirofosfato inorgânico

PTEN - phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10

RT-PCR - reverse transcriptase-polimerase chain reaction

SNC - Sistema Nervoso Central

T3 – triiodothyronine

TCA- ácido tricloroacético

TSC1 - tubular sclerosis I

UTP - uridina trifosfato

1 Introdução

1.1 Nucleotídeos extracelulares

Os nucleotídeos extracelulares purínicos (ATP, ADP e o nucleosídeo adenosina) e pirimidínicos (UTP e UDP) são moléculas sinalizadoras importantes, as quais induzem diversos efeitos biológicos via receptores celulares, nomeados purinoreceptores. Os efeitos promovidos por essas moléculas atingem o organismo completo e incluem contração do músculo liso, neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico, secreção exócrina e endócrina, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor, modulação da função cardíaca, entre outras (Ralevic e Burnstock, 1998).

Nos últimos anos tem havido grandes avanços no conhecimento sobre os nucleotídeos, principalmente no que se refere a sua liberação nos fluidos extracelulares, sua degradação pelas ecto-enzimas e sobre os receptores que promovem seus efeitos (Communi et al., 2000).

1.1.1 Receptores

Os nucleotídeos extracelulares exercem seus efeitos biológicos interagindo com receptores presentes nas superfícies das membranas celulares. Esses receptores são membros de uma grande família chamada na década de 70 de “purinérgicos”. Entretanto mais tarde foi demonstrado, que não somente os nucleotídeos da adenina, mas também os da uridina, agiam sobre a mesma classe de receptores. Desde então, passaram a ser nomeados, mais amplamente, de receptores de nucleotídeos, embora a designação prévia ainda seja empregada na literatura (Czajkowski e Baranska, 2002).

Os receptores que ligam nucleotídeos e nucleosídeos são divididos em receptores de adenosina ou P1 e em receptores P2 (Figura1). Os receptores P1 se subdividem em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ e são responsivos à adenosina com o potencial agonista na ordem adenosina > AMP > ADP > ATP. Enquanto os receptores A₁ e A₃ são acoplados a proteína G_i e inibem a adenilato ciclase, ambos tipos de receptores A₂ são acoplados a proteína G_s e estimulam a adenilato ciclase (Ralevic e Burnstock, 1998; Czajkowski e Baranska, 2002).

Os receptores P2 ligam preferencialmente ATP e/ou UTP e seus derivados difosfato, tendo uma afinidade muito baixa pelos derivados monofosfato (ATP > ADP > AMP > adenosina). São subdivididos em dois grandes grupos, os receptores ionotrópicos P2X (P2X₁₋₇) e os receptores metabotrópicos P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ e P2Y₁₃) (Figura 1) (Ralevic e Burnstock, 1998; Communi et al., 2001; Hollopeter et al., 2001; Ziganshin et al., 2002; Czajkowski e Baranska, 2002).

A família dos purinoreceptores está em constante crescimento, como demonstrado pela recente inclusão do receptor P2Y₁₃ (Communi et al., 2001). Entretanto, apesar dos avanços na descoberta de novos receptores por caracterizações moleculares e farmacológicas, até o presente momento, não existem agonistas ou antagonistas capazes de diferenciar adequadamente os receptores P2X e P2Y e seus respectivos subtipos. A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais agonistas e antagonistas para estas duas famílias de receptores, bem como a principal localização.

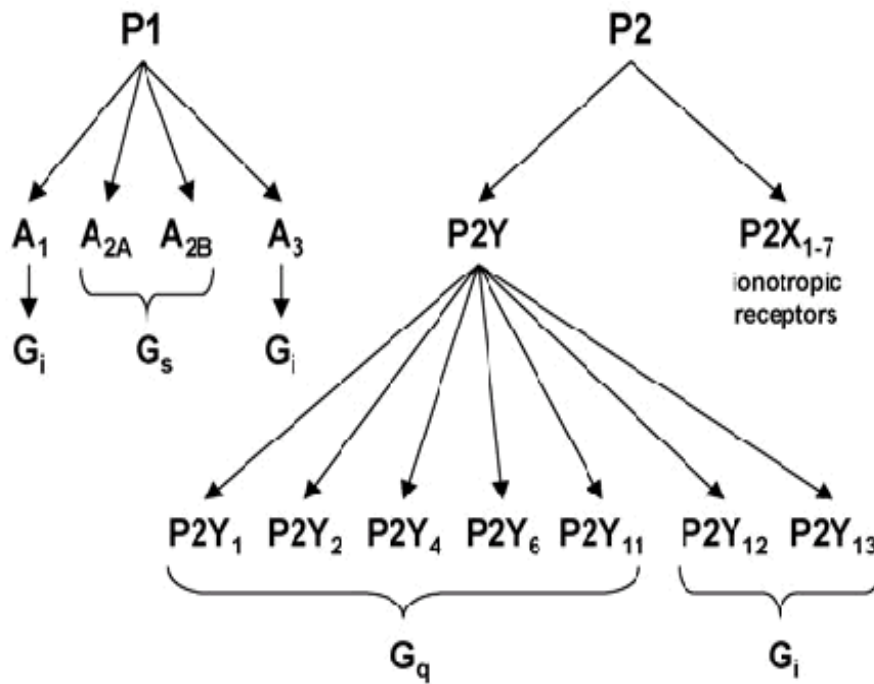


Figura 1. Receptores de nucleotídeos e seus efetores.

Os receptores P1 são ativados por adenosina e os P2 por ATP, ADP, UTP e UDP. Os receptores ionotrópicos (P2X) formam canais ativados por ligantes. Já os receptores metabotrópicos (P1, P2Y) são acoplados a proteína G que estimula a fosfolipase C (Gq) e estimula (Gs) ou inibe (Gi) a adenilato ciclase. Adaptado de Czajkowski e Baranska (2002).

Tabela 1. Principais agonistas e antagonistas e localização dos receptores Purinérgicos.

Receptor	Main distribution	Agonists	Antagonists
P1 (adenosine)			
A ₁	Brain, spinal cord, testis, heart, autonomic nerve terminals	CCPA, CPA	DPCPX, CPX, XAC
A _{2A}	Brain, heart, lungs, spleen	CGS21680	KF17837, SCH58261
A _{2B}	Large intestine, bladder	NECA	Enprofylline
A ₃	Lung, liver, brain, testis, heart	IB-MECA, DBX RM	MRS1220, L268605
P2X			
P2X ₁	Smooth muscle, platelets, cerebellum, dorsal horn spinal neurones	α, β meATP = ATP = 2meSATP (rapid desensitization)	TNP-ATP, IP ₅ I, NF023
P2X ₂	Smooth muscle, CNS, retina, chromaffin cells, autonomic and sensory ganglia	ATP \geq ATP γ S \geq 2meSATP \gg α, β meATP (pH + zinc sensitive)	Suramin, PPADS
P2X ₃	Sensory neurones, NTS, some sympathetic neurones	2meSATP \geq ATP \geq α, β meATP (rapid desensitization)	TNP-ATP, suramin, PPADS
P2X ₄	CNS, testis, colon	ATP \gg α, β meATP	-
P2X ₅	Proliferating cells in skin, gut, bladder, thymus, spinal cord	ATP \gg α, β meATP	Suramin, PPADS
P2X ₆	CNS, motor neurones in spinal cord	(does not function as homomultimer)	-
P2X ₇	Apoptotic cells in immune cells, pancreas, skin, among others	BzATP > ATP \geq 2meSATP \gg α, β meATP	KN62, KN04, Coomassie brilliant blue
P2Y			
P2Y ₁	Epithelial and endothelial cells, platelets, immune cells, osteoclasts	2meSADP > 2meSATP = ADP > ATP	MRS2279, MRS2179
P2Y ₂	Immune cells, epithelial and endothelial cells, kidney tubules, osteoblasts	UTP = ATP	Suramin
P2Y ₄	Endothelial cells	UTP \geq ATP	RB2, PPADS
P2Y ₆	Some epithelial cells, placenta, T cells, thymus	UDP > UTP \gg ATP	RB2, PPADS, suramin
P2Y ₁₁	Spleen, intestine, granulocytes	ARC67085MX > BzATP \geq ATP γ S > ATP	Suramin, RB2
P2Y ₁₂	Platelets	ADP	ARC67085MX, ARC69931MX

Adaptado a partir de Burnstock (2001). (O recém clonado receptor P2Y₁₃, ainda não consta nessa tabela.)

Abreviações usadas: α, β -meATP, α, β -metileno ATP; 2MeSATP, 2-metilatio ATP; BzATP, 2', 3'-O-(4-benzoil)benzoil ATP; CCPA, 2-cloro-N-ciclopentiladenosina; CPA, N-ciclopentiladenosina; CPX, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina; DBX RM, 1,3-dibutilxantina-1-riboside-5'-N-metilcarboxamida; DPCPX, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina; Ins (1,4,5)P₃, inositol (1,4,5)-trifosfato; IB-MECA, N-(3-iodobenzil)-5'-N-metilcarboxamidoadenosina; IP₅I, diinosina pentafosfato; NECA, N-etilcarboxamidoadenosina; NTS, nucleus of

the solitary tract; *PLC-β*, fosfolipase C-β; *PPADS*, ácido piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico; *RB2*, reactive blue; *TNP-ATP*, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil) adenosina-5'-trifosfato; *XAC*, xantina amino congener.

1.1.2 O nucleotídeo ATP e a transmissão purinérgica

Em 1929, o ATP, que pertence a família das purinas, foi identificado em extratos de músculo, sendo em um primeiro momento, acreditado estar primariamente relacionado à contração muscular. Nos anos seguintes a essa descoberta, foi demonstrado que o ATP era gerado durante a quebra da glicose a ácido láctico (glicólise anaeróbia) e predominantemente durante a oxidação aeróbica (fosforilação oxidativa). O reconhecimento de que o ATP era utilizado em funções que requeriam energia, levou a hipótese da transferência de energia entre células vivas. Como resultado o ATP se consolidou como a mais importante das biomoléculas e a fonte universal de energia química disponível para as células vivas (Burnstock, 1997; Bodin e Burnstock, 2001).

Devido a esse papel essencial atribuído ao ATP intracelularmente, houve uma considerável resistência ao conceito de que o ATP poderia exercer qualquer ação fisiológica extracelularmente. Principalmente baseados nos argumentos de que as células não liberariam uma bio-molécula tão fundamental à vida e que pelo tamanho e carga o ATP não poderia atravessar a membrana por simples difusão (Bodin e Burnstock, 2001).

Em 1954, Holton e Holton observaram que a estimulação de nervos sensoriais levava a liberação de ATP em quantidade suficiente para produzir a vasodilatação de artérias em orelha de coelhos. Assim, surgiram as primeiras evidências indicando o ATP como um neurotransmissor. Mais tarde, Burnstock (1972) propôs que o ATP é o neurotransmissor liberado de nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos, na musculatura lisa do intestino e da bexiga. Então, foi proposto que, além da transmissão colinérgica e noradrenérgica, existe no

sistema nervoso autônomo a transmissão purinérgica, onde o ATP é o principal neurotransmissor (Burnstock, 1972; Burnstock, 2001).

Existem três mecanismos gerais, descritos na literatura, pelos quais o ATP pode ser liberado: citólise, liberação vesicular e pela ativação das proteínas ABC (ATP-binding cassette proteins). A citólise é originada quando há danos na membrana ou morte celular, não é uma liberação fisiológica de ATP, pois ocorre devido a algum trauma físico ou biológico e contribui para mecanismos patofisiológicos. A liberação vesicular é o meio pelo qual o ATP é liberado dos terminais nervosos e de algumas células não neuronais sob estimulação. Proteínas ABC constituem uma família de ATPases de transporte, largamente difundidas, desde plantas até bactérias e têm sido mostradas por agirem como canais, transportando ou liberando ATP, embora suas funções sejam ainda controversas (Zimmermann, 1996a; Bodin e Burnstock, 2001).

No sistema nervoso central as principais fontes de purinas extracelulares são os neurônios, a glia, a microglia, as células endoteliais e o sangue. Além do bem documentado papel dos nucleotídeos extracelulares como neurotransmissores e moduladores no sistema nervoso central e periférico, um grande número de trabalhos tem mostrado que as purinas extracelulares podem atuar como fatores tróficos, regulando o desenvolvimento e a manutenção do sistema nervoso e sua resposta a doenças e injúrias (Neary et al., 1996; Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2001).

1.1.3 O nucleosídeo Adenosina

As primeiras evidências de que a adenosina apresentava atividade fisiológica foram obtidas através dos estudos de Drury e Szent-Gyorgyi (1929), que observaram significativos efeitos da adenosina no coração. A partir de então, estabeleceu-se que a adenosina pode

exercer vários efeitos através da interação com receptores específicos de superfície celular (item 1.1.1) (Brundege e Dunwiddie, 1997).

A adenosina é considerada um neuromodulador, mas não um neurotransmissor por si, pois não há evidências de que seja liberada pelas vias Ca^{2+} -dependente clássicas ou estocada em vesículas e também não há evidências da existência de sinapses onde o neurotransmissor primário seja a adenosina. Entretanto, os receptores A1 estão associados a inibição da liberação de virtualmente todos os neurotransmissores clássicos como, dopamina, noradrenalina, glutamato e acetilcolina. Dentre esses, o efeito inibitório mais proeminente está, geralmente, associado ao sistema excitatório glutamatérgico, onde a transmissão sináptica pode ser completamente bloqueada pela adenosina (Dunwiddie e Masino, 2001).

O nucleosídeo adenosina apresenta múltiplas funções importantes relacionadas com a fisiologia de tecidos excitáveis como o coração e o cérebro. Muitas das ações da adenosina podem tanto reduzir a atividade dos tecidos excitáveis (exemplo, diminuindo o ritmo cardíaco), como aumentar a liberação de substratos metabólicos (exemplo, induzindo a vasodilatação) desta forma, ajudando no balanço energético, por direcionar o gasto de energia para o suprimento de energia. Entretanto, no cérebro, a adenosina apresenta funções mais complexas, atuando como um mensageiro intercelular, envolvida em processos normais e patofisiológicos como regulação do sono, neuroproteção, epilepsia e isquemia (Dunwiddie e Masino, 2001).

A adenosina pode ser formada nos espaços intracelular e extracelular (Figura 2). Existem duas principais vias de formação de adenosina a nível intracelular: a clivagem da S-adenosil-homocisteína pela enzima S-adenosil-homocisteína -hidrolase 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. Além disso, seus níveis intracelulares podem ser controlados por vias que metabolizam a adenosina intracelular: a fosforilação até 5'-AMP catalisada por uma adenosina quinase e a desaminação até inosina catalisada pela adenosina desaminase (Spsychala, 2000; Dunwiddie e Masino, 2001). Em concentrações fisiológicas (1 μM) a adenosina é principalmente fosforilada pela adenosina quinase que possui o K_m de 40 nM. Já quando as concentrações de adenosina alcançam níveis mais altos, a adenosina deaminase é ativada por possuir um K_m de 70 μM e atividade específica 10 vezes maior que a adenosina quinase, funcionando como sistema de alto volume/baixa afinidade (Spsychala, 2000).

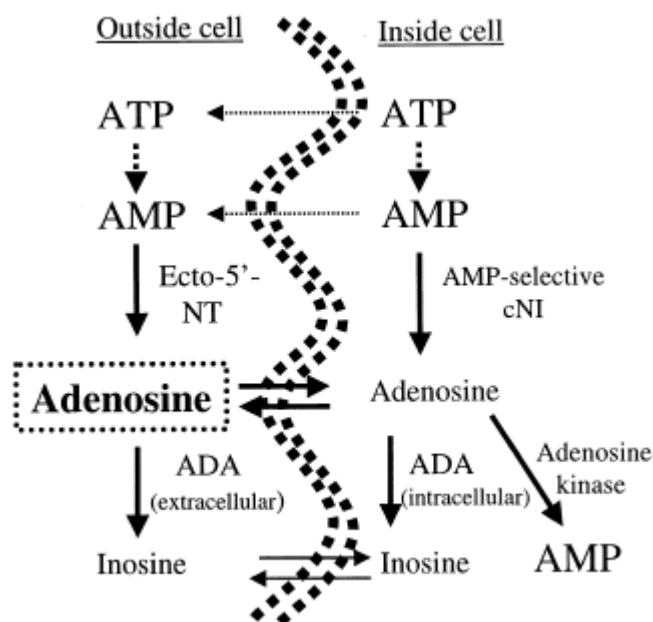


Figura 2. Vias gerais do catabolismo dos nucleotídeos da adenina e geração de adenosina nas células.

Adaptado de Spsychala (2000).

A adenosina também pode ser sintetizada e degradada no espaço extracelular. O ATP liberado no espaço extracelular pode originar adenosina pela ação conjunta das ecto-enzimas: ecto-ATPDases e ecto-5'-nucleotidases (Battastini et al., 1995; Plesner, 1995; Zimmermann et al., 1998). A constante liberação de adenosina é contrabalançada pelo seu metabolismo extracelular, atribuído a presença da ecto-adenosina desaminase (ecto-ADA) (Franco et al., 1997) e também pela remoção do espaço extracelular através da sua captação pelo sistema transportador de nucleosídeos (Rathbone et al., 1999).

O fato da adenosina ser um catabólito imediato dos nucleotídeos da adenina, a torna uma molécula sinalizadora adequada tanto para situações fisiológicas como patológicas, que resultem em degradação dos nucleotídeos da adenina (Spychala, 2000).

A adenosina tem sido considerada como uma substância promotora de tumores e assim como o ATP, tem sido descrita por estimular a proliferação (Rathbone et al., 1992; Morrone et al., 2003). A adenosina acumula nos tumores sólidos em altas concentrações e estimula o crescimento dos tumores e a angiogênese, bem como inibe a síntese de citocinas, a adesão das células imunes à parede do endotélio e a função das células-T, macrófagos e células NK (Figura 3). Entretanto os mecanismos pelos quais a adenosina acumula no câncer e os resultados específicos desse acúmulo não são completamente entendidos (Spychala, 2000).

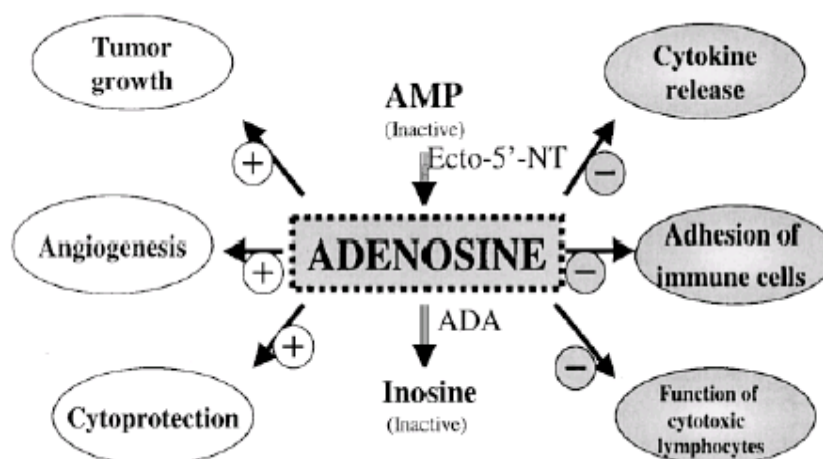


Figura 3. Ilustração geral dos efeitos da adenosina.

Incluindo funções promotoras (a esquerda) e funções imunossupressoras (a direita). Adaptado de Spychala (2000).

1.1.4 Importância da regulação

Terminar a sinalização e manter a concentração do agente transmissor em concentrações mínimas é fundamental para qualquer mecanismo sinalizador, que devido a isso possui proteínas capazes de degradar ou recaptar as moléculas sinalizadoras.

Considerando que os nucleotídeos da adenina podem ativar receptores purinérgicos P2 e que os produtos de degradação podem ativar os receptores P1, a regulação da quantidade relativa destes nucleotídeos/nucleosídeos torna-se parte fundamental na sinalização mediada por estes compostos. Assim, mecanismos que controlam a concentração dessas substâncias, como as ecto-nucleotidases e os transportadores de adenosina, possuem uma posição central

neste sistema. A Figura 4 mostra um esquema representando as vias de degradação dos nucleotídeos na fenda sináptica durante o processo de neurotransmissão.

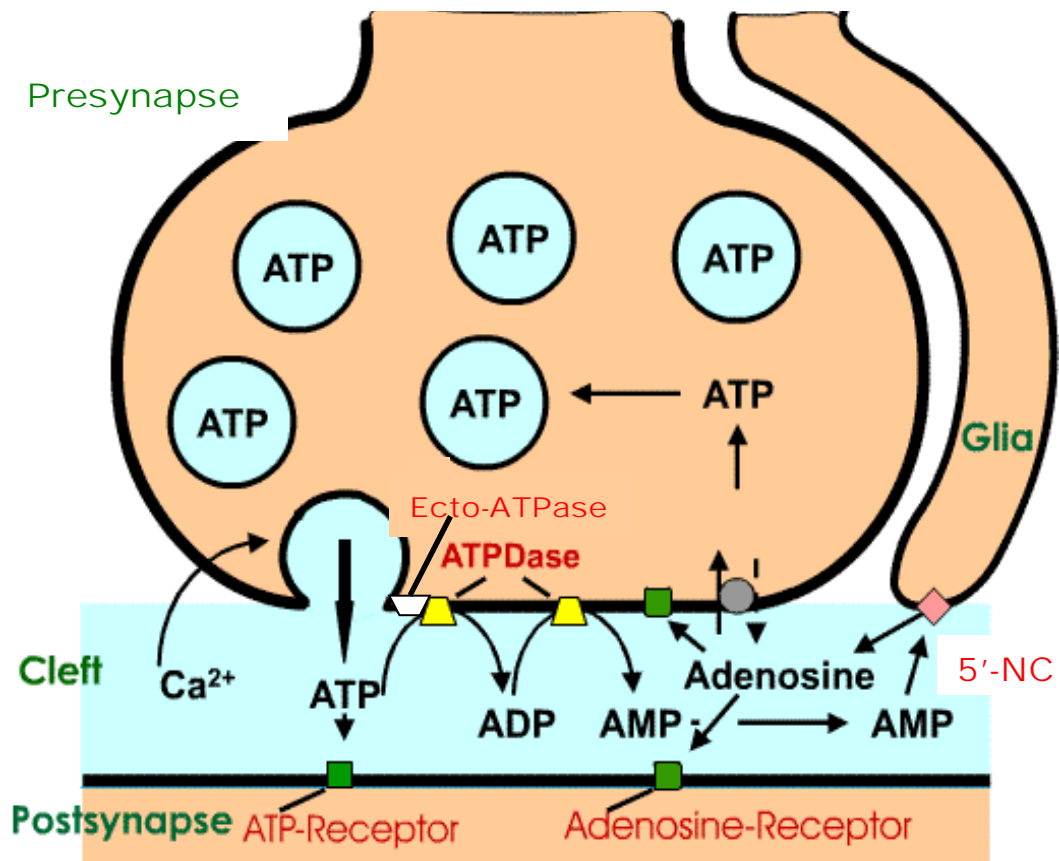


Figura 4. Funções do ATP liberado no terminal nervoso e sua completa hidrólise até adenosina no espaço extracelular.

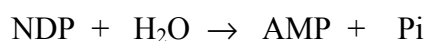
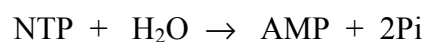
(Adaptado de www.biozentrum.uni-frankfurt.de/prof/zimmermann).

1.2 Ectonucleotidasas

Após a liberação no espaço extracelular e a ativação de receptores específicos, os nucleotídeos da adenina podem ser metabolizados pela ação de ecto-enzimas que fazem a conversão destes nucleotídeos até adenosina. Um grande número de trabalhos tem demonstrado que a degradação do ATP extracelular, envolve um conjunto de enzimas ligadas à superfície celular, que constituem a “via das ectonucleotidasas”, da qual podem participar uma ecto-ATPase (EC 3.6.1.3), uma ecto-apirase (EC 3.6.1.5) e a ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (Battastini et al., 1991,1995; Sarkis et al., 1995; Zimmermann, 1996a, 1996b, 1998, 1999, 2001). A hidrólise extracelular de ATP por esta via resulta na formação de ADP, AMP e adenosina (Figura 4.). Esta degradação pode inativar a sinalização mediada pelo ATP através dos receptores P2, contribuindo também para a sinalização mediada pela adenosina através dos receptores P1 (Komoszynski e Wojtczak, 1996).

1.2.1 As apirases e as ecto-ATPases

Apirase (ATP difosfohidrolase, EC 3.6.1.5) foi o nome proposto por Meyerhof (1945) para as enzimas que hidrolisam ATP, ADP e outros trifosfo- e difosfonucleosídeos, na presença de cátions divalentes, aos seus equivalentes monofosfonucleosídeos com liberação de fosfatos inorgânicos, de acordo com as seguintes reações:



Os primeiros trabalhos sobre as apirases foram estudos com o objetivo de conhecer a distribuição da atividade enzimática na natureza, bem como estabelecer as suas características cinéticas. Assim, principalmente nas últimas três décadas, inúmeras apirases foram purificadas e caracterizadas, indicando uma ampla distribuição na natureza, desde vegetais e invertebrados até mamíferos (Para revisão, Plesner, 1995; Sarkis et al., 1995; Battastini, 1996). Nesse período a presença das apirases em diferentes tecidos era detectada mais por protocolos que excluía outras atividades enzimáticas que poderiam mimetizar a enzima, do que por protocolos específicos (Sarkis et al., 1995). De fato, com o auxílio de protocolos bastante completos tem sido possível excluir a contribuição das enzimas contaminantes como: adenilato quinase, ATPases intracelulares, pirofosfatases inorgânicas e fosfatases inespecíficas, garantindo a presença de uma verdadeira apirase nos diferentes sistemas biológicos estudados (Sarkis et al., 1995; Battastini et al., 1995; Battastini, 1996; Oliveira et al., 1997). Além disso tem sido proposto que devido a vasta distribuição na natureza, essas enzimas possuem alta relevância no metabolismo celular (Plesner, 1995).

Muito do conhecimento sobre as apirases está relacionado as características bioquímicas e estruturais, porém alguns papéis fisiológicos tem sido propostos, de acordo com sua localização, como por exemplo: hidrólise do ADP (pró-agregante plaquetário) em AMP (anti-agregante), possuindo assim um papel anti-hemostático em glândulas salivares de insetos hematófagos (Sarkis et al., 1986) e em tegumento de *Schistosoma mansoni* (Vasconcelos et al., 1993, 1996). Em mamíferos, apesar do grande número de apirases descritas, muito pouco é conhecido sobre seu exato papel fisiológico. Outro dado importante é que até o presente momento ainda não foi descrita nenhuma substância capaz de inibir especificamente as apirases o que tem sido uma grande barreira para a compreensão de suas funções e diferenciação de outras enzimas que possam ter função catalítica similar.

Durante o período de identificação e caracterização das apirases, foram descritas enzimas que hidrolisavam preferencialmente ou unicamente os nucleosídeos trifosfato. Essas enzimas foram encontradas principalmente associadas à membrana plasmática, com o sítio catalítico voltado para o espaço extracelular, sendo por esse motivo distintas das ATPases intracelulares clássicas. Tais enzimas são encontradas na literatura sob a denominação de ecto-ATPases (Plesner, 1995). A presença dessas ecto-ATPases confundia-se com as ecto-apirases, deixando dúvidas quando uma ou outra enzima era responsável pela atividade enzimática e até mesmo quando da existência das duas enzimas na mesma célula. Até que em 1997, Kegel et al., demonstraram a co-existência das duas enzimas em cérebro e em vários outros tecidos de ratos (coração, rim, baço, timo, pulmão, músculo esquelético). Concomitantemente, Lewis-Carl et al (1997) demonstraram claramente a presença de ambas as enzimas em estômago e moela de galinha. Desta forma ficou claro que essas duas ectonucleotidases são enzimas diferentes, que podem coexistir num mesmo tecido.

As ecto-apirases (que passaram a ser chamadas também de ecto-ATPDases) e as ecto-ATPases foram classificadas como ATPases do tipo E, que são enzimas que compartilham as seguintes características: (1) um sítio de hidrólise de nucleotídeos voltado para o espaço extracelular, (2) subunidade catalítica glicosilada, (3) atividade dependente de cátions divalentes (principalmente cálcio e/ou magnésio), (4) insensibilidade a inibidores específicos de ATPases do tipo P (ex. $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$), F (ex. ATPase mitocondrial), V (ex. bomba de prótons vacuolar) e (5) habilidade para hidrolisar uma ampla variedade de nucleotídeos púricos e pirimídicos tri e difosfatados (Plesner., 1995; Zimmermann et al., 1998).

A análise das sequências de diversas ecto-ATPDases e ecto-ATPases mostrou a existência de cinco regiões conservadas, as quais foram chamadas de “regiões conservadas da apirase”, ACR (ACR 1 - 5 apyrase conserved regions) (Handa e Guidotti, 1996; Vasconcelos

et al., 1996). Uma das hipóteses para a existência desses sítios conservados é o envolvimento na formação do sítio catalítico das enzimas. As regiões ACRI e ACRIV são similares aos domínios de ligação de fosfato β e γ de proteínas como a actina, HSP70 (heat shock protein) e hexoquinase, que apesar de funções e estruturas primárias diversas, têm em comum a habilidade de ligar e hidrolisar ATP (Handa e Guidotti, 1996; Nagy et al., 1998; Smith e Kirley, 1999a). Em concordância, Smith e Kirley (1999a) demonstraram que a mutação de um resíduo de ácido aspártico da região conservada ACR I e IV reduz a atividade hidrolítica da apirase de cérebro de humanos em mais de 90%.

1.2.1.1 Identidade com o antígeno CD39

CD39 é uma glicoproteína de membrana de 70 a 100 KDa, expressa principalmente em células linfóides ativadas, sendo descrita primeiramente como uma proteína marcadora de superfície de células B transformadas pelo vírus Epstein Barr (EBV) (Maliszewski, 1994).

Em 1996, Handa e Guidotti purificaram e clonaram a apirase solúvel de batata e mostraram que a sequência de aminoácidos desta proteína, tinha grande similaridade com o antígeno de ativação celular linfóide, CD39. Os autores levantaram a hipótese de que essa proteína poderia ser responsável pela atividade ecto-ATPásica em células linfóides humanas. Logo após, o mesmo laboratório (Wang e Guidotti, 1996), confirmou a hipótese de que o antígeno CD39 e a ecto-apirase são proteínas idênticas, com as seguintes evidências: a) a similaridade da sequência de aminoácidos da CD39 com várias apirases, b) a coincidência do padrão de expressão da CD39 e da ecto-apirase em células imunocompetentes, c) a presença de atividade ecto-apirásica em linfócitos B transformados por EBV (Epstein Barr virus), os quais expressavam CD39 como o maior marcador de superfície e d) a expressão de cDNA para CD39 em células COS-7 aumentava a atividade ecto-apirásica em pelo menos 5 vezes.

Concomitantemente, esses resultados foram confirmados pela clonagem e sequenciamento da enzima em células endoteliais (Kaczmarek et al., 1996).

A clonagem e o mapeamento de um gene isolado a partir de tecido humano, denominado CD39L1 (CD39-like-1) (Chadwick e Frischauf, 1997), demonstrou alta similaridade na seqüência de aminoácidos com a ecto-ATPase de músculo liso de galinha e com a CD39 de humanos (Kirley, 1997; Maliszewski et al., 1994). Smith e Kirley (1998) clonaram e sequenciaram um gene para uma ATPase do tipo E (HB6) presente em cérebro humano, com características de uma ecto-apirase. Concomitantemente, Chadwick e Frischauf (1998) identificaram três novos genes CD39L2, CD39L4 e o gene CD39L3 (que foi idêntico ao gene HB6), demonstrando assim, a existência da família CD39 (CD39-like gene family).

Após essa fase os grupos de pesquisa que se dedicam ao estudo das ecto-nucleotidases, passaram a ter uma preocupação maior com a elucidação estrutural dessas enzimas, bem como, com a identificação de qual dos membros da família é responsável pelas atividades ATPásicas e ADPásicas já descritas. Isso tem proporcionando grandes avanços, principalmente no que se refere a estrutura dos membros da família CD39, porém abriu novos desafios, como por exemplo o entendimento da relevância fisiológica de tantas enzimas com sobreposição de expressão e de especificidade por substrato (Zimmermann et al., 1998; Zimmermann, 1999, 2001).

1.2.1.2 Nova nomenclatura

Em 1999, em Diepenbeek na Bélgica, durante o Segundo Workshop Internacional sobre “Ecto-ATPases e Ecto-nucleotidases relacionadas” foi sugerida e adotada uma nova nomenclatura para as ecto-ATPases do tipo E, incluindo também os membros da família das fosfodiesterases. A nova nomenclatura teve inspiração na sistemática utilizada para os

receptores P2X e P2Y, com o intuito de prover uma ordem sistemática das várias enzimas, que indicasse a ordem de clonagem e a caracterização funcional. Assim uma nova nomenclatura mais sistemática classificou duas famílias de enzimas: a E-NTPDase (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase) e a E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) como envolvidas na degradação dos nucleotídeos extracelulares (Figura 5) (Zimmermann, 2001).

1.2.2 A família E-NTPDase

Em mamíferos até o momento, pelo menos seis membros da família E-NTPDase têm sido clonados e funcionalmente caracterizados: NTPDase 1 (CD39), NTPDase 2 (CD39L1), NTPDase 3 (CD39L3, HB6), NTPDase 4 (UDPase), NTPDase 5 (CD39L4) e NTPDase 6 (CD39L2). A Tabela 2 resume a nova nomenclatura e os nomes previamente utilizados.

Essa família de genes também tem membros em invertebrados, plantas, fungos e protozoários. As enzimas de mamíferos hidrolisam nucleosídeos di e tri fosfatados, com diferenças consideráveis na preferência pelos substratos. Os sítios catalíticos estão voltados para o meio extracelular ou para o lúmen das organelas intracelulares como Golgi e retículo endoplasmático. Os membros individuais, podem diferir na sequência de aminoácidos, porém todos compartilham as cinco regiões conservadas, sendo essa uma marca característica dessa família (Zimmermann, 2001).

Enquanto todos os membros da família catalisam a hidrólise de ambos, nucleosídeos tri-fosfato (NTP) e nucleosídeos di-fosfatos (NDP), as razões de hidrólise (NTP: NDP), variam significativamente para essas reações, resultando em enzimas que hidrolisam

preferencialmente NTPs (NTPDase 2), preferencialmente NDPs (NTPDase 5 e 6) ou ambos nucleotídeos (NTPDase 1 e 3) (Tabela 2) (Zimmermann, 2001; Grinthal e Guidotti, 2002).

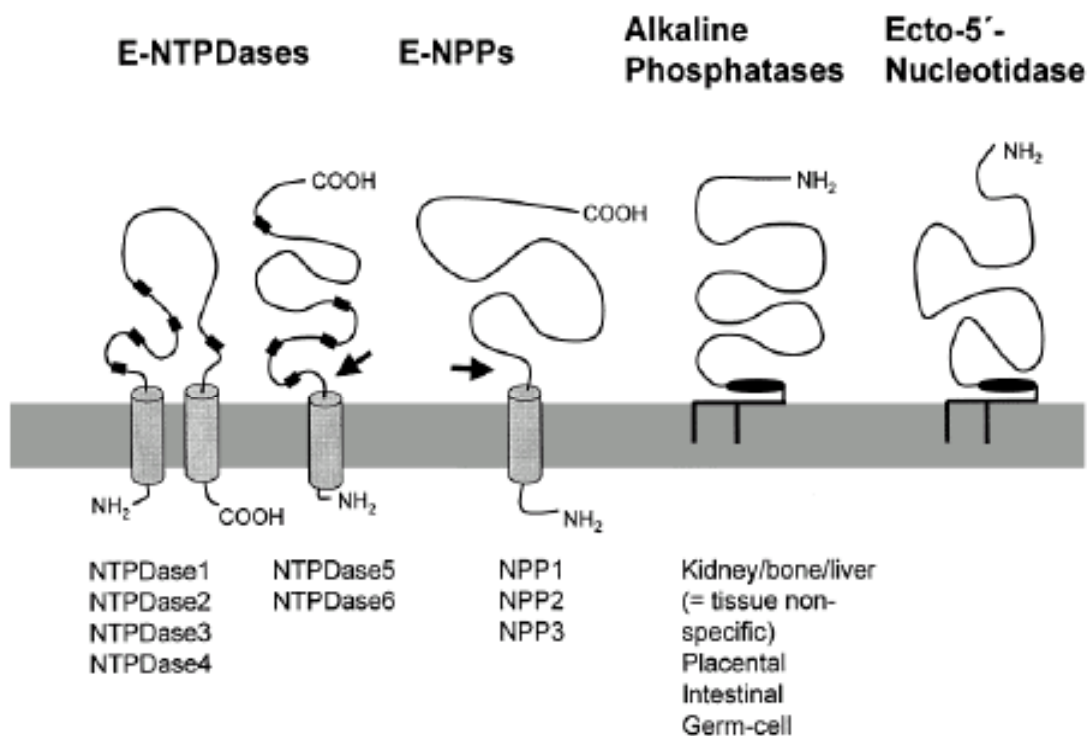


Figura 5. Topografia de membrana proposta para as ectonucleotidasas.

As NTPDases de 1 a 4 são ligadas à membrana plasmática por dois domínios transmembrana, N e C-terminal. NTPDase 5 e NTPDase 6 não possuem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas próximo ao domínio N-terminal para formar uma proteína solúvel liberada (seta). As NTPDases de 4 a 6 são localizadas intracelularmente. Os quadros escuros na sequência das NTPDase 1 a 6, representam as regiões conservadas das apirases (ACR). Todas as ectonucleotidasas representadas são glicoproteínas. Adaptado de Zimmermann, 2001.

Tabela 2. Nomenclatura e preferência de substratos dos membros da família E-NTPDase em vertebrados.

Nome Atual	Nomes previamente usados	Preferência de substrato
NTPDase 1	CD39, ecto-ATP difosfoidrolase, ecto-apirase, ecto-ATPDase	ATP=ADP (1:1)*
NTPDase 2	CD39L1, ecto-ATPase	ATP >>>>ADP (30:1)*
NTPDase 3	CD39L3, HB6	ATP>ADP (3:1)*
NTPDase 4	UDPase (hLALP70v), hLALP70	UDP>GDP,CDP
NTPDase 5	CD39L4, ER-UDPase	UDP>GDP,IDP>>>ADP, CDP
NTPDase 6	CD39L2	GDP>IDP>>UDP,CDP>>ADP

Adaptado apartir de Zimmermann (2001).

* Razão de hidrólise NTP: NDP. As NTPDases de 1 a 3 hidrolisam todos os outros nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, similarmente ao ATP e ADP.

1.2.2.1 NTPDase 1 (CD39, ecto-ATPDase, ecto-apirase, ecto-ATP-difosfoidrolase)

A NTPDase 1, que apresenta a mesma preferência pela hidrólise do ATP e do ADP (NTPase/NDPase 1:1), tem sido a mais estudada dos membros da família das E-NTPDases. Primeiramente descrita na superfície de células imune, CD39 pode ter um papel importante

nas respostas antígeno-específicas das células B ativadas (Kansas e Tedder, 1991; Maliszewski et al, 1994), onde pela atividade ATPásica (Dombrowski et al., 1997), as células imunes seriam protegidas da lise provocada pelo ATP, liberado pelas células alvo (Filippini et al., 1990).

NTPDase 1 tem sido extensivamente estudada em células endoteliais e em plaquetas, possuindo um papel bem descrito na regulação do fluxo sanguíneo e trombogênese. A enzima presente na superfície das células endoteliais e plaquetas, converte o ADP, pró-agregante plaquetário, em adenosina, anti-agregante, limitando a extensão da agregação plaquetária intravascular (Frassetto et al., 1993; Pilla et al., 1996; Kaczmarek et al., 1996; Marcus et al., 1997; Imai et al., 1999a; Koziak et al., 1999). Em concordância, NTPDase 1 solúvel recombinante, bloqueia a agregação plaquetária induzida por ADP in vitro (Gayle et al., 1998). Além disso, vetores adenovirais recombinantes, contendo a CD39 humana, foram capazes de aumentar em 40 vezes a atividade ADPásica em células endoteliais injuriadas pelo modelo de trombose induzida por balão catéter (Gangadharan et al., 2001) e de aumentar a sobrevivência de xenotransplantes cardíacos (Imai et al., 1999b; Imai et al., 2000). Esses dados tem levado a constantes estudos da CD39 como um potencial agente terapêutico nos processos trombotogênicos (Qawi e Robson, 2000; Robson et al., 2001).

A importância da NTPDase 1 na hemostasia e tromboregulação foi confirmada, pela produção do primeiro camundongo deficiente em CD39 (Enjyoji et al., 1999). A consequência esperada para a deficiência da enzima era um animal com exacerbação da agregação plaquetária estimulada por ADP. Entretanto, o camundongo deficiente apresenta inesperadamente, sangramento prolongado com mínimas alterações nos parâmetros de coagulação. Esses resultados sugerem que possa haver uma dessensibilização mediada por ATP dos receptores P2Y1 associados às plaquetas, prevenindo um aumento do estado pró-

trombótico dos animais. Em conjunto, esses dados reforçam a importância da sinalização purinérgica na hemostasia, onde a CD39 e os mediadores purinérgicos devem agir em conjunto para modular a fluidez sanguínea e a ativação plaquetária (Enjyoji et al., 1999; Seigny et al., 2002).

No sistema nervoso central, NTPDase 1 tem sido associada não somente ao sistema vascular, mas também como a principal NTPDase expressa em microglia (Braun et al., 2000a; Braun e Zimmermann, 2001). A enzima é fortemente expressa após isquemia transitória global na microglia acumulada nos sítios de morte neuronal, talvez prevenindo a super estimulação dos receptores P2 pelo ATP liberado nos sítios de injúria (Braun et al., 1998; Braun e Zimmermann, 2001).

1.2.2.2 NTPDase 2(CD39L1, ecto-ATPase)

Vários genes codificando ecto-ATPases tem sido clonados de músculo liso de galinha (Kirley, 1997), cérebro de rato (Kegel et al., 1997), células de hepatoma de camundongo (Gao et al., 1998). Mas, o primeiro gene a ser identificado para uma ecto-ATPase humana foi o CD39L1. O mapeamento genético mostrou que o gene está localizado no cromossomo 9q34.3, uma região do cromossomo 9q, que é frequentemente perdida em câncer renal. Essa é também a região definida para a desordem genética da TSC1 (tubular sclerosis I) (Chadwick e Frischauf, 1997; Becker et al., 2001).

Mateo et al., (1999) clonaram e caracterizaram funcionalmente um cDNA codificando uma ecto-ATPase humana, cuja sequência difere da CD39L1, por ser 23 aminoácidos mais longa na região extracelular, sugerindo que a CD39L1 possa ser resultante de um produto de splicing desta sequência. Além disso, outras evidências sugerem potenciais variantes de splicing, como demonstrado em cóclea de rato (Vlajkovic et al., 1999).

A característica que mais distingue a NTPDase 2 dos outros dois membros relacionados, NTPDase 1 e NTPDase 3 é a sua clara preferência pelos nucleosídeos tri-fosfatados. A enzima hidrolisa os nucleosídeos di-fosfatados apenas marginalmente, tendo uma preferência de 30 vezes pelo ATP em relação ao ADP como substrato (Kegel et al., 1997). Essa característica pode ser importante em situações patológicas e injúrias onde as células sejam expostas a elevados níveis de ATP extracelular (Mateo et al., 1999).

Considerando-se a similaridade entre as sequências e a topografia de membrana, tem sido investigado, quais características seriam responsáveis pela distinta preferência pelos substratos entre a NTPDase 1 e a NTPDase 2. Resultados obtidos com proteínas quiméricas (onde partes de uma enzima eram substituídas por partes da outra), revelaram que o domínio extracelular contém a informação que especifica as propriedades nativas destas enzimas. Entretanto, no caso da NTPDase 2, há um requerimento específico dos dois domínios transmembrana para manifestar a preferência pelos nucleosídeos tri-fosfatados. Isso sugere que a estrutura terciária das enzimas possui maior relevância na especificidade pelo substrato do que, propriamente as cinco regiões conservadas (Heine et al., 2001; Grinthal e Guidotti, 2002).

1.2.2.3 NTPDase3(CD39L3)

NTPDase 3 (CD39L3, HB6) é considerada um intermediário funcional entre a NTPDase 1 e NTPDase 2 por hidrolisar o ATP e o ADP numa razão de 3:1. Tem sido descrito que a enzima hidrolisa eficientemente os nucleosídeos tri-fosfatados, mas mais lentamente os di-fosfatados, representando assim, uma forma diferenciada de controle do tempo de permanência dos nucleotídeos no meio extracelular (Zimmermann, 2001).

Até o presente momento apenas um grupo de pesquisa tem estudado a NTPDase 3 (Dr. Kirley, Universidade do Cincinnati, Ohio USA). Esse grupo depois de ter clonado e sequenciado a HB6 (Smith e Kirley, 1998), tem dedicado-se à elucidação estrutural da enzima, proporcionando um grande avanço no entendimento da função dos resíduos de aminoácidos na preferência por nucleotídeos, papel das formas oligoméricas destas enzimas e da glicosilação na hidrólise dos nucleotídeos (Smith e Kirley, 1999b; Smith et al., 1999; Kirley et al., 2001; Yang et al., 2001; Murphy et al., 2002).

Muito do conhecimento sobre a NTPDase 3 está relacionado a sua estrutura, entretanto muito pouco é sabido a respeito do seu papel fisiológico, bem como sua distribuição na natureza. Permanece também a ser elucidado a sua exata contribuição e relação com os outros membros relacionados, NTPDase 1 e NTPDase 2 nos diversos tecidos onde há sobreposição de suas funções.

1.2.2.4 NTPDase 4 (UDPase)

As NTPDases 4 compartilham a estrutura geral das NTPDases 1 a 3 (Figura 5), porém revelam uma localização intracelular. As duas formas humanas mais relacionadas estão alocadas no aparato de Golgi (NTPDase 4 β) (Wang e Guidotti, 1998) e nos vacúolos lisossomais (NTPDase 4 α , LALP70) (Biederbick et al., 1999). As duas enzimas diferem no comprimento da cadeia de aminoácidos, sendo que a forma localizada no Golgi pode representar uma variante de “splicing” da forma lisosomal, que é 8 aminoácidos mais longa (Biederbick et al., 2000; Zimmermann, 2001).

Ambas enzimas hidrolisam nucleosídeos di e tri fosfato, NTPDase 4 α tem preferência por UTP e TTP, enquanto a NTPDase 4 β tem preferência por CTP e UDP. ATP e ADP são

hidrolisados com baixa preferência por ambas enzimas. A função da NTPDase 4 α no lisossoma pode estar relacionada a reutilização de nucleosídeos di e trifosfatados formados da hidrólise dos ácidos nucleicos. Já o papel fisiológico da NTPDase 4 β hidrolisando nucleosídeos trifosfato no Golgi permanece inexplicado. O que tem sido sugerido é que essa forma poderia ter uma função similar a descrita para a nucleotidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Ynd1/Apy1p), relacionada à NTPDase 4, nas reações de glicosilação no Golgi, hidrolisando os nucleosídeos di-fosfatos originados das reações de glicosilação das proteínas e lipídeos, que causam inibição às glicosiltransferases (Zhong e Guidotti, 1999; Braun et al., 2000b; Zimmermann, 2001).

Recentemente, três novas NTPDases intracelulares, ainda sem classificação, a LALP1 (Shi et al., 2001), a Scan 1 (Smith et al., 2002) e uma difosfatase do retículo endoplasmático (Failer et al., 2002) foram clonadas e caracterizadas. A multiplicidade de enzimas com capacidade de hidrolisar nucleosídeos tri e difosfato em vários compartimentos do citoplasma (retículo endoplasmático, Golgi, lisosomas, etc), implica na presença de nucleotídeos nesses compartimentos, desafiando a investigação da função e metabolismo dos nucleotídeos dentro do sistema de endomembranas.

1.2.2.5 NTPDase 5 (CD39L4) e NTPDase 6 (CD39L2)

CD39L2 e CD39L4 são os membros da família das E-NTPDases mais recentemente caracterizados e diferem estruturalmente da CD39, CD39L1 e CD39L3. Gráficos de hidrofobicidade mostraram que a CD39L2 e CD39L4 possuem um curto segmento transmembrana N-terminal e uma larga região C-terminal extracelular (Figura 5). A análise da sequência de aminoácidos mostrou que as duas proteínas possuem uma maior homologia entre elas do que com os outros componentes do grupo. Divergindo significativamente depois

da região conservada 4 (ACRIV) e possuindo a região C-terminal consideravelmente mais curta do que CD39, CD39L1 e CD39L3 .

A topografia de membrana da CD39L2 e CD39L4 é muito similar com a descrita para as NTPDases de levedura, batata, ervilha e *D. melanogaster* e o alinhamento das sequências de aminoácidos, mostra que a CD39L2 e CD39L4 são muito mais relacionadas com as proteínas de plantas e invertebrados do que com os outros membros do grupo (NTPDases 1 – NTPDases 3) (Figura 5). Como as NTPDases de plantas e invertebrados têm sido mostradas como apirases solúveis, acredita-se que o domínio transmembrana da CD39L2 e CD39L4, poderia ser uma sequência sinalizadora ausente na proteína madura (Chadwick e Frischauf, 1998).

1.2.2.5.1 NTPDase 5 (CD39L4)

Até o presente momento existem somente dois trabalhos na literatura, descrevendo a CD39L4 (Mulero et al., 1999 e 2000). Mulero et al. (1999) mostraram pela primeira vez que a CD39L4 é secretada de células de mamíferos. Os autores usaram duas evidências para essa demonstração, a primeira foi o acúmulo da proteína no meio de cultivo de células transfectadas com vetor expressando CD39L4; e a segunda foi o acúmulo massivo intracelular da CD39L4 causado pelo bloqueio da secreção com brefeldina A (um inibidor da translocação de proteínas secretórias do retículo endoplasmático para o aparato de Golgi). Com isso os autores mostraram que a enzima é secretada através de padrões secretórios tradicionais em mamíferos. Os dois experimentos sugerem, que o domínio hidrofóbico amino terminal da CD39L4 codifique uma sequência sinalizadora para a clivagem da proteína, imediatamente depois da alanina 20.

A caracterização cinética mostrou que a atividade ADPásica é 20 vezes maior do que a ATPásica, com o KM para ADP na faixa de mM (12.7 mM). A enzima tem maior afinidade por todos os nucleosídeos difosfatos do que pelos trifosfatos (UDP>GDP>CDP>ADP>ATP), sendo essa uma das características que a coloca juntamente com a CD39L2 numa nova classe das apirases tipo E (Mulero et al., 1999; Mulero et al., 2000; Zimmermann, 2001).

A recente identificação e caracterização bioquímica, não permitiram ainda o completo entendimento da função fisiológica da CD39L4. Devido a sua clara preferência por nucleosídeos di-fosfatados, acredita-se que o seu papel fisiológico seja reduzir os níveis circulantes do ADP e não do ATP. Uma das propostas, seria um modelo, onde em sítios de injúria vascular, os macrófagos secretariam a CD39L4, a qual degradaria os excessivos níveis de ADP, atenuando a agregação plaquetária. Assim, por esse modelo, níveis diminuídos da enzima ou atividade enzimática reduzida poderiam causar oclusões vasculares, acidente vascular cerebral ou outras formas de doenças cardiovasculares (Mulero et al., 1999). Além disso, recentemente, foi demonstrada a identidade funcional e estrutural entre a CD39L4 e o proto oncogene PCPH (Páez et al., 2001).

1.2.2.5.2 *NTPDase 6 (CD39L2)*

A sequência da CD39L2 codifica 455 aminoácidos, contendo dois sítios potenciais de N-glicosilalção (Asn 192 e Asn 256), seis resíduos de cisteína e sítios de fosforilação para proteína quinase C e caseína quinase II. A massa molecular calculada da proteína codificada é de 49,971 kDa, sendo que a banda imunoreativa foi encontrada em torno de 50 kDa

(Chadwick e Frischauf, 1998; Hicks-Berger et al., 2000; Braun et al., 2000b; Yeung et al., 2000).

CD39L2 apresenta muitas similaridades com a CD39L4, tanto estruturais quanto funcionais. Como descrito para CD39L4, CD39L2 também é descrita como uma proteína solúvel e ligada à membrana. Acredita-se que a sinalização de clivagem esteja no N-terminal do único domínio transmembrana, possibilitando a liberação da enzima da membrana via proteólise (Mulero et al., 2000). CD39L2 também apresenta preferência pelos nucleosídeos difosfatados, sendo que a atividade máxima foi encontrada com GDP e IDP como substratos (Hicks-Berger et al., 2000; Braun et al., 2000b; Yeung et al., 2000).

A investigação da localização celular de células transfectadas com CD39L2 recombinante, mostrou que a enzima possui uma localização intracelular, sendo detectada nas proximidades do núcleo, em pequenos domínios citoplasmáticos e no aparato de Golgi. A localização intracelular da CD39L2 pode sugerir um papel nas reações de glicosilação do retículo endoplasmático e do aparato de golgi, como tem sido relatado para NTPDase 4 (UDPase) e para a NTPDase 5 (ER-UDPase) (Braun et al., 2000b).

Embora a expressão da CD39L2 tenha sido demonstrada em tecidos de diversos órgãos (cérebro, fígado, rim, pulmão, placenta, músculo esquelético, pâncreas, etc) (Chadwick e Frischauf, 1998) é consenso que sua maior expressão é em coração, principalmente em células do músculo cardíaco e em células endotéliais capilares (Hicks-Berger et al., 2000; Braun et al., 2000b; Yeung et al., 2000). A alta expressão da CD39L2 em tecido cardíaco, aumenta sua similaridade com a CD39L4, sugerindo uma sobreposição de funções, onde se desconhece a contribuição funcional e fisiológica de cada uma das enzimas.

1.2.3 A família E-NPP

Os membros da família E-NPP possuem uma ampla distribuição tecidual e incluem os antígenos de diferenciação celular NPP1, NPP2 (PD-I α , autotaxina) e NPP3 (PD-I β , B10, gp130^{RB13-6}). Todos os membros são ligados à membrana por um único domínio transmembrana N-terminal e apresentam um domínio para clivagem proteolítica, sugerindo que possam ocorrer como enzimas solúveis (Zimmermann 1999, 2001).

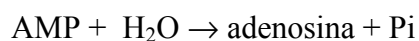
Essas enzimas apresentam atividade de fosfodiesterase alcalina bem como atividade nucleotídeo pirofosfatase, hidrolisando uma grande variedade de substratos, entre eles purinas e pirimidinas. O p-nitrofenil-5'-timidina-monofosfato (*p*-nitrophenyl-TMP) tem sido usado como um substrato artificial, específico para as E-NPPs (Sakura et al., 1998). O K_M para ATP está na faixa de 20-50 μ M e o pH ótimo é o alcalino (Zimmermann 1999, 2001).

O desenvolvimento do camundongo deficiente em NPP1 sugere que pela produção de Ppi a enzima desempenhe um papel essencial no controle da mineralização óssea. A NPP2 é abundantemente expressa em cérebro e uma forma de splice é expressa em oligodendrócitos, podendo ser envolvida na produção de mielina ou na diferenciação do oligodendrócito. Possui também uma atividade estimulante de motilidade em diversas linhagens tumorais (Lee et al., 1996). NPP3 é expressa em um conjunto de células gliais imaturas e sua super-expressão induz o aparecimento dos marcadores de astrócitos (Andoh et al., 1999). Além disso uma atividade ecto-nucleotídeo pirofosfatase foi caracterizada em linhagens de glioma C6, hidrolisando o ATP direto a AMP com produção de Ppi (Grobben et al., 1999).

1.2.4 Ecto-5'-Nucleotidase (EC 3.1.3.5)

A participação da ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'N) na cascata enzimática juntamente com as NTPDases, constitui uma via altamente sofisticada, capaz de controlar os níveis extracelulares de ATP e adenosina, que modulam uma série de processos fundamentais a nível celular em muitos órgãos e tecidos. Em sistema nervoso, o principal papel atribuído a ecto-5'N é a formação de adenosina, a partir do AMP extracelular e a subsequente ativação dos receptores de adenosina P1 (Figura 4). Tem sido proposto, que em sistema nervoso, a conversão extracelular de ATP até adenosina é catalisada pela ação conjugada de uma ecto-ATP difosfohidrolase e uma ecto-5'N (Sarkis e Saltó, 1991; Zimmermann, 1992; Battastini et al., 1995). Essa mesma associação tem sido também proposta em outros sistemas, como por exemplo no sistema circulatório, onde a ATPDase em cooperação com a ecto-5'N regulariam a agregação plaquetária, pela remoção do pró-agregante plaquetário, ADP e formação do anti-agregante plaquetário, adenosina (Kawashima et al., 2000; Kas-Deelen et al., 2001).

A ecto-5'N ("lymphocyte surface protein CD73") é uma enzima ancorada à membrana plasmática por glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Figura 5), que representa um marcador de maturação para os linfócitos T e B, sendo ausente nas células imaturas (Airas et al. 1997). O ancoramento da enzima pode ser clivado por uma fosfolipase C específica para GPI, dando origem às formas solúveis da enzima. Embora uma atividade 5'-nucleotidásica esteja também associada com as estruturas de algumas organelas citoplasmáticas, trata-se de uma proteína diferente das 5'-nucleotidases solúveis intracelulares (Zimmermann, 1992, 1996a, 2001). A ecto-5'N encontra-se presente na maioria dos tecidos e sua principal função é a hidrólise de nucleosídeos monofosfatados extracelulares, tais como AMP, GMP ou UMP, a seus respectivos nucleosídeos:



O AMP é geralmente, o nucleosídeo hidrolisado com maior eficiência, sendo que os valores de K_M estão na faixa de micromolar. ATP e ADP são inibidores competitivos da 5'-nucleotidase com valores de K_i também na faixa de micromolar (Zimmermann, 1996a, 1996b; 2001). Esta enzima apresenta uma massa molecular aparente de 62 a 74 kDa, apresentando-se como um dímero com pontes dissulfeto entre as cadeias. O conhecimento de sua estrutura permitiu a preparação de uma forma solúvel da enzima com o objetivo de ser usada para testes de novas drogas (Servos et al., 1998).

Em sistema nervoso central, ecto-5'N está predominantemente associada às células gliais, tendo sido identificada na membrana plasmática de astrócitos, oligodendrócitos, microglia e astrocitomas. Os processos da glia de Bergmann, astrócitos especializados do cerebelo, são os elementos celulares com maior imunoreatividade para 5'-nucleotidase na camada molecular do cerebelo. Similarmente, as células de Muller, astrócitos especializados da retina, são as células que possuem a maior expressão desta enzima na retina (Schoen et al., 1988; Zimmermann, 1996a).

Vários estudos têm demonstrado atividade ecto-5'-nucleotidásica associada a neurônios (Maienschein e Zimmermann, 1996; Zimmermann, 1996a; Zimmermann et al., 1998). A enzima é transitoriamente expressa na superfície de células neuronais e nas sinapses durante o desenvolvimento sináptico (Schoen e Kreutzberg, 1994; Braun et al., 1995). Desempenha um papel crítico na diferenciação neurítica e na sobrevivência de células PC12 e células granulares de cerebelo de rato em cultura (Maienschein e Zimmermann, 1996; Heilbronn et al., 1995; Heilbronn e Zimmermann, 1995). Sua atividade encontra-se aumentada em astrócitos, células microgliais (Braun et al., 1997) e em sinaptossomas de hipocampo após isquemia focal e reperfusão (Schetinger et al., 1998). Além disso, estudos têm demonstrado

que a ecto-5'-nucleotidase, CD73, tem características de uma molécula de adesão (Airas et al., 1995).

1.2.5 Adenosina deaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4)

Adenosina deaminase é uma enzima de 41 kDa que catalisa a conversão da adenosina e da deoxiadenosina a inosina e a deoxiinosina, respectivamente. Possui uma ampla distribuição tecidual, sendo encontrada em todas as células estudadas, incluindo neurônios. É altamente expressa em linfócitos e pacientes com deficiência congênita em ADA apresentam severa imunodeficiência (SCID) caracterizada por diminuição no número de linfócitos T e B circulantes. O pH ótimo é de aproximadamente 7.4 e o Km para adenosina é na ordem de 50-150 µM (Zimmermann, 1996b; Franco et al., 1997, 1998).

A ADA é encontrada como uma enzima citosólica e também como uma ecto-enzima, ligada à superfície celular, ecto-adenosina deaminase (ecto-ADA). A ecto-ADA é associada a uma proteína de ligação específica, identificada como uma ecto-peptidase (dipeptidil peptidase IV/CD26, 110 kDa). CD26 foi a primeira molécula de superfície identificada como “proteína ancoradora” para a ecto-ADA. Depois, o receptor A1 de adenosina foi identificado como outra molécula capaz de interagir com a ecto-ADA. A capacidade de interação da ecto-ADA com outras proteínas de superfície, pode indicar que além de atuar como uma ecto-enzima, diminuindo os níveis extracelulares de adenosina, possa também estar envolvida em mecanismos de transdução de sinal (Franco et al., 1997, 1998)

No sistema nervoso há evidências para a deaminação da adenosina. Altos níveis de inosina tem sido encontrados em todos os tipos fluidos examinados. Em estriado, a concentração de inosina medida por microdiálise é muito maior (110 nM) do que a

concentração de adenosina (40 nM), sugerindo a deaminação extracelular da adenosina no SNC (Franco et al.,1998). Tem sido sugerido também que em condições basais a adenosina seria removida do espaço extracelular através da recaptação pelos transportadores de adenosina, enquanto que sob condições patológicas, como hipóxia e isquemia, o principal mecanismo para remoção dos altos níveis de adenosina seria a ecto-ADA (Dunwiddie e Masino, 2001).

1.3 Células Gliais

O sistema nervoso central (CNS) compõe-se de uma intrincada rede composta por neurônios e células gliais. Os neurônios conduzem potenciais de ação e tradicionalmente foram considerados como os protagonistas do CNS, enquanto que as células gliais foram tidas como meros coadjuvantes. Mas, atualmente as células gliais estão em destaque nas neurociências.

A existência das células gliais foi reconhecida pela primeira vez em 1846, quando Virchow observou a presença de uma substância “macia, medular e de natureza frágil”, contrastando com o tecido fibroso dos neurônios, a qual chamou neuroglia (“nerve-glue”). Durante várias décadas a neuroglia foi vista como sendo um mero suporte estrutural para os neurônios. Na década de 50 foi observado que as células gliais também atuavam sobre o metabolismo dos neurotransmissores glutamato e GABA, sobre íons como o K^+ e sobre o metabolismo energético, regulando a quantidade de glicose cerebral. Na década de 70, a descoberta de receptores β -adrenérgicos nos astrócitos, mostrou que apesar de não excitáveis,

as células da glia podiam responder as mudanças do meio extracelular (Kimelberg e Norenberg, 1989). Apartir de então, as células da glia passaram a ser vistas não apenas como suporte mecânico e metabólico, mas como atuantes no sistema nervoso central.

Mais da metade do volume e do número de células do CNS é composta por células de origem glial. Comparações entre diferentes espécies provêm a interessante observação de que as células gliais podem ter um papel na cognição, pois a razão de 10:1 de glia para neurônio em humanos, diminui para 1:1 em roedores e é invertida em nematodos com 6 neurônios para cada glia. Assim numa escala filogenética ascendente, alcançando o pico nos humanos, quanto maior a complexidade do SNC (Sistema Nervoso Central) e quanto maior a capacidade cognitiva, maior a razão de glia para neurônio (Kast, 2001).

Existem duas classes gerais de células gliais, a macroglia composta por astrócitos e oligodendrócitos e a microglia, as menores células gliais conhecidas (James e Butt, 2002) . Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação da mielina no sistema nervoso central, sendo equivalentes as células de Schwann, que são as mielinizadoras do sistema nervoso periférico. Já as microglias possuem uma função imunoprotetora, quando expostas a estímulos capazes de gerar inflamação, ou outros insultos, transformam-se de um estado passivo para uma forma ativa na qual possuem capacidade de fagocitose semelhante ao macrófago (Haydon, 2001).

1.3.1 Astrócitos

Na embriogênese, os astrócitos se desenvolvem das células glias radiais, que transversalmente compartimentalizam o tubo neural. As células glias radiais servem como um suporte estrutural para a migração dos neurônios e possuem um papel fundamental na definição da citoarquitetura do SNC (Figura 6). Quando o SNC amadurece, a glia radial tem seus processos retraídos e serve como progenitora dos astrócitos. No cérebro adulto ainda são encontrados alguns astrócitos radiais especializados no cerebelo e na retina os quais são chamados de glia de Bergmann e células de Müller, respectivamente (Zigmond et al., 1999).

Os astrócitos são os mais abundantes e os maiores representantes das células glias, constituindo de 20 a 50 % do volume da maioria das regiões cerebrais, sendo conseqüentemente muito estudados. Os astrócitos se dividem quanto ao formato em dois principais tipos, protoplasmático e fibroso. Na substância cinzenta predominam os astrócitos protoplasmáticos, enquanto que os astrócitos fibrosos ocorrem na substância branca, sendo caracterizados pela grande quantidade de processos fibrosos e pela alta concentração de proteínas do filamento intermediário (IF), como a Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) (Bradford, 1985; Zigmond et al., 1999).

Várias funções são atribuídas aos astrócitos, entre elas: tamponar os níveis de íons extracelulares como o K^+ , Na^+ e lactato; captar neurotransmissores como glutamato e GABA; participar do metabolismo do CO_2 e do íon amônio (NH_4^+), regular o pH extracelular; captar e liberar compostos neurotróficos; estocar glicogênio como reserva energética do cérebro; guiar os neurônios em sua migração e os axônios no seu crescimento; participar da resposta imune do cérebro; formar tecido cicatrizante em resposta à perda neuronal; participar na

formação da barreira hemato-encefálica, intermediando o transporte de substâncias entre o sangue e os neurônios.

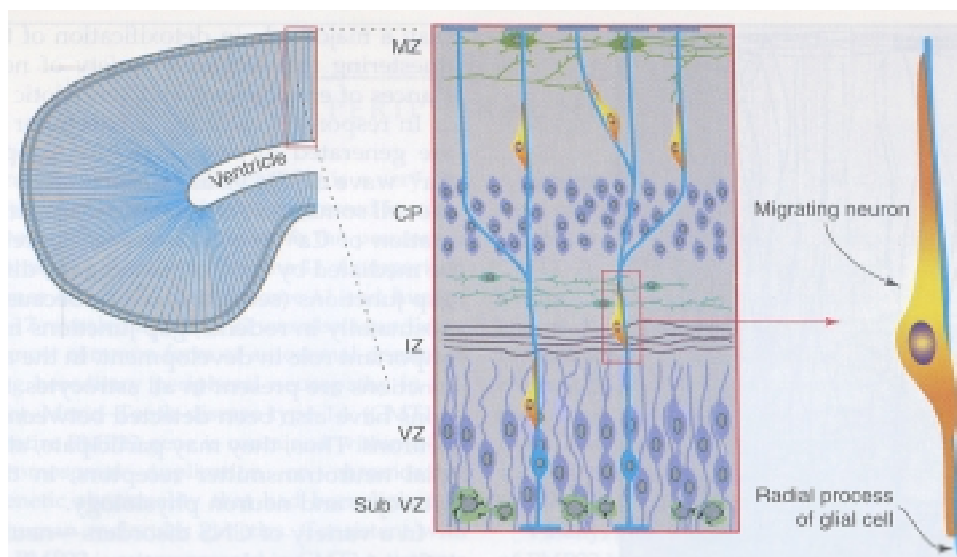


Figura 6. Glia radial fornece suporte e direcionamento para a migração neuronal.

No desenvolvimento, a glia radial atravessa o parênquima cerebral em expansão. O detalhe mostra as camadas definidas do tubo neural do ventrículo para a face externa: VZ, zona ventricular; IZ, zona intermediária; CP, camada cortical; MZ, zona marginal. O processo radial das células gliais é indicado em azul e um único neurônio em migração é esquematizado à direita. Adaptado Zigmond et al., Fundamental Neuroscience, 1999.

Dentre estas funções, algumas são mais importantes na resposta astrogliar à excitotoxicidade, como o transporte de glutamato. Este neurotransmissor precisa ser mantido em concentrações baixas (1 a 3 μM) a fim de amplificar a relação “sinal/ruído” nas transmissões sinápticas e também para evitar a excitotoxicidade. O glutamato captado pelas

células gliais é transformado em glutamina, que tanto pode ser liberada para a circulação como pode difundir para os terminais nervosos, onde pode ser retransformada em glutamato fechando o ciclo. Como a síntese de glutamina a partir do glutamato requer amônia, este ciclo é essencial para a homeostase da amônia (Figura 7) (Bradford, 1985).

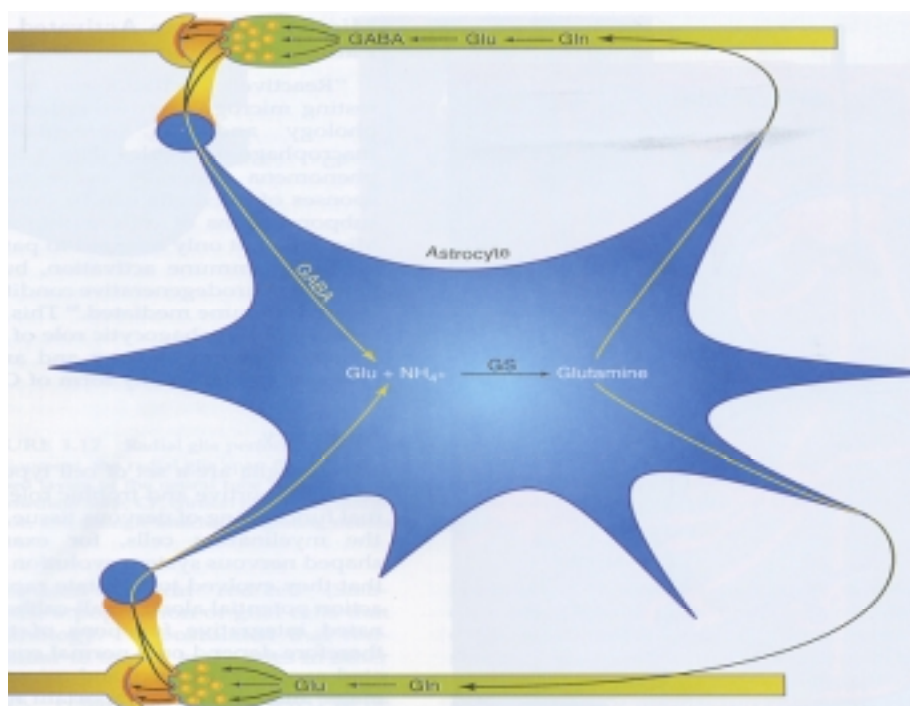


Figura 7. O ciclo glutamato-glutamina.

O ciclo glutamato-glutamina é um exemplo do complexo mecanismo que envolve uma ativa interação entre os neurônios e astrócitos no metabolismo de neurotransmissores. O sistema de troca de glutamina, glutamato, GABA e amônia entre neurônios e astrócitos é altamente integrada. A postulada detoxificação da amônia e a inativação do glutamato e GABA (ácido γ -aminobutírico) pelos astrócitos é consistente com a exclusiva localização da glutamina sintetase no compartimento astrogliar. Adaptado Zigmond et al., *Fundamental Neuroscience* (1999).

1.3.2 Interrelação Glia-glia e Glia-neurônio

Os astrócitos estão posicionados de tal forma que possuem potencial para serem uma via de sinalização entre os neurônios, entre os neurônios e os capilares e entre os próprios astrócitos. Análises morfológicas mostram que os astrócitos estão intimamente associados com os neurônios, de forma que podem envolver os terminais sinápticos, como mostrado esquematizado na Figura 8. Isso levou a idéia da “sinapse tripartida”, onde além da pré e pós-sinapse, os astrócitos também fariam parte da sinapse (Araque et al., 1999). Além disso possuem contatos extensos com as células endoteliais dos capilares e são interconectados uns com os outros através das junções “gap” (gap junctions) (Haydon, 2001).

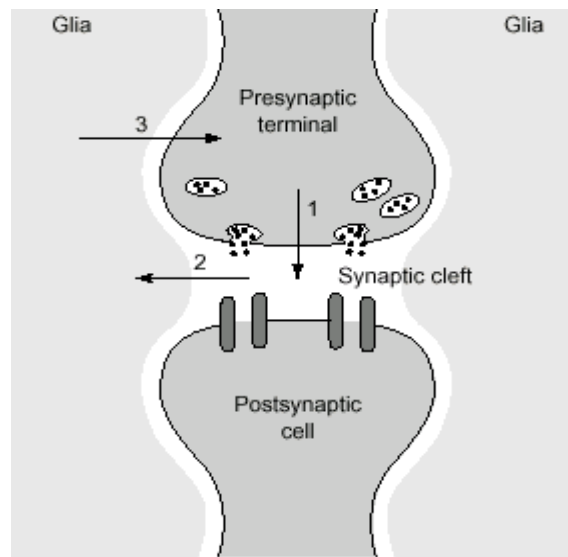


Figura 8. Via de sinalização da sinapse tripartida.

Durante a transmissão sináptica, os neurônios liberam neurotransmissores dos terminais nervosos na fenda sináptica para comunicarem-se com outros neurônios ou células efetoras tais como fibras musculares (1). O neurotransmissor liberado (ou co-liberado) da sinapse, pode em algumas circunstâncias, deixar a fenda sináptica e alcançar os receptores de neurotransmissores em células gliais adjacentes (astrócitos ou células de Schwann perisinápticas), elevando os níveis intracelulares de cálcio nas células gliais (2). A elevação na concentração de cálcio nas células gliais, faz com que liberem neurotransmissores, que na maioria das vezes é o glutamato (3), o glutamato por feed back a pré-sinapse pode modular a neurotransmissão. Adaptado de Araque et al. (1999).

1.3.3 Gliose reativa

Uma das mais remarcáveis características dos astrócitos é sua vigorosa capacidade de resposta a diversas injúrias neurológicas. Normalmente, sob condições não patológicas, os astrócitos são identificados imunohistoquimicamente por métodos de imunodeteção para GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Depois de injúrias, ou sob eventos patológicos como doenças neoplásicas, isquemia, certos tipos de epilepsia e doenças degenerativas (como por exemplo, mal de Alzheimer), os astrócitos proliferam e/ou mudam suas características morfológicas e funcionais, originando um conjunto de características que inclui hiperplasia e hipertrofia dos corpos celulares e processos citoplasmáticos, as quais resultam na formação do tecido gliótico ou cicatriz glial (Lenz et al., 1997; Audouy et al., 1999). Essas mudanças em número e morfologia dos astrócitos são acompanhadas por um aumento nos níveis de expressão do mRNA para GFAP bem como nos níveis de expressão da proteína, que são detectados no sítio de injúria e a distância do local inicial da lesão ou em áreas de projeção da região lesionada. Assim o uso de anticorpos para a detecção da GFAP, além de ser útil para a identificação dos astrócitos também é utilizado para monitorar o grau de resposta a injúrias ou degeneração no SNC (Eng et al., 2000).

A gliose reativa parece ter duas principais funções, quais são, isolar e ocupar o local lesionado e assim permitir o crescimento e o estabelecimento funcional das sinapses. Entretanto, vários estudos têm descrito que cicatrizes gliais representam o maior impedimento para o recrescimento axonal depois de injúrias, o que também é visto como uma vantagem, pois a cicatriz glial isola o sítio da lesão do tecido íntegro do SNC, protegendo contra danos secundários (Vázquez-Chona e Geisert Jr., 1999; James e Butt, 2002).

Estudos em astrócitos tem demonstrado que os nucleotídeos e nucleosídeos em adição a outros fatores de crescimento, exercem um papel importante nos mecanismos de reparo do sistema nervoso (Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2001). Em concordância foi demonstrado que a adição de ATP ou análogos do ATP em culturas de astrócitos, reproduz o conjunto de reações que caracterizam a gliose reativa (Neary e Zhu, 1994; Neary et al., 1996).

1.3.4 As purinas e os astrócitos

A grande maioria dos dados disponíveis sobre o efeito dos nucleotídeos e nucleosídeos em astrócitos se refere a diferenciação e proliferação (Rathbone et al., 1999). Neary et al. (1994), observaram que o tratamento de culturas primárias de astrócitos com ATP e FGF-2 induz um significativo aumento na incorporação de [³H]-timidina (2 e 14 vezes, respectivamente). Surpreendentemente, o co-tratamento destes dois fatores, induziu um aumento de 52 vezes, revelando um expressivo sinergismo entre os efeitos do ATP e FGF-2. A liberação de fatores de crescimento pela microglia, que poderia mediar esse sinergismo foi descartada pela quantidade desprezível dessas células contaminando a cultura de astrócitos (Neary et al., 1994)

Os análogos hidrolisáveis do ATP como a 2metiltioadenosina trifosfato (2MeSATP) e análogos hidrólise resistentes como a 5' adenosina $\beta\gamma$ -imidotrifosfato (AMP-PNP) ou o $\alpha\beta$ metilenoATP, aumentam a razão de proliferação em culturas de astrócitos (Abbracchio et al., 1994; Ciccarelli et al., 1994). Este efeito é mediado pela ativação de purinoreceptores P2Y metabotrópicos, pois é inibido pela suramina, um antagonista não seletivo para P2, ou pelo reactive blue 2 (RB2), um antagonista de receptor P2Y mais seletivo (Ciccarelli et al.,

1995). Além disso o ATP extracelular, através de mais de um tipo de receptores P2, ativa a cascata da ERK em astrócitos que tem uma função importante no controle da proliferação celular ou diferenciação (Lenz et al., 2000), uma vez que a inibição dessa via inibe a proliferação (Neary et al., 1999).

1.4 Gliomas

Os tumores cerebrais representam um grande desafio para aqueles que recebem e para aqueles que fornecem o diagnóstico. Localizados em região de difícil acesso, resistentes a radiação, a quimioterapia e a cirurgia para remoção, oferecendo grande risco as funções desempenhadas pelo cérebro, os tumores do SNC são um apelo constante a novas estratégias terapêuticas.

Dentre os vários tipos de tumores do SNC, os mais frequentes são os gliomas. Originados das células da glia ou neuroglia, os gliomas são caracterizados conforme sua hipotética linha de diferenciação, ou seja, se apresentam características astrocíticas, oligodendroglial ou ependimal. Diferentemente dos outros tumores sólidos, os gliomas raramente formam metástases fora do SNC, assim a classificação do grau do tumor é determinada clinicamente (Maher et al., 2001).

Os gliomas são classificados e graduados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), conforme a malignidade através das características histológicas determinadas empiricamente, tais como: morfologia celular, atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose. De acordo com o comportamento biológico dos tumores individuais, os graus de malignidade variam de I (os menos agressivos biologicamente) até o grau IV (os mais malignos), sendo que os tumores podem apresentar mais de um grau (Maher et al., 2001; Collins, 2002).

1.4.1 Astrocitomas

Os astrocitomas são os tipos mais comuns de gliomas, constituindo 65 – 70% de todos os tumores cerebrais primários, sendo classificados pela OMS em: astrocitomas pilocíticos (grau I), astrocitomas (grau II), astrocitomas anaplásticos (grau III) e glioblastomas (IV).

Os astrocitomas pilocíticos, classificados como gliomas de grau I, são biologicamente benignos e podem ser cirurgicamente curados se forem resectáveis no momento do diagnóstico. Ocorrem principalmente em crianças, raramente progridem para tumores malignos e geralmente são de bom prognóstico (Collins, 2002).

Os astrocitomas de grau II possuem ocorrência generalizada no cérebro, afetando principalmente adultos jovens. As informações sobre as características citogenéticas e moleculares destes tumores são ainda limitadas (Collins, 2002). São caracterizados por um alto grau de diferenciação, crescimento lento, e geralmente não possuem alta atividade proliferativa ou mitótica, não existindo necrose ou proliferação endotelial (Laws et al., 1999). Diferentemente dos astrocitomas pilocíticos, os astrocitomas de grau II podem apresentar transformação maligna, sendo que 70% progridem para tumores de grau III e IV dentro de 5-10 anos depois do diagnóstico (Maher et al., 2001). A média de sobrevida de pacientes com esse tipo de tumor é de aproximadamente 7 anos (Collins, 2002).

O astrocitoma anaplástico, grau III é assim denominado por apresentar áreas de anaplasia, onde o tumor perde a sua textura homogênea. Em geral nas zonas profundas, formam-se hemorragias, áreas de necrose e outras áreas opacas e granulosas (Duarte et al., 1994). Ao microscópio observam-se regiões que são mais densamente povoadas de células, possuindo número variável de células gigantes uni e multinucleares, figuras de mitose e proliferação endotelial vascular (Girolami et al. , 2000; Duarte et al., 1994). São tumores altamente invasivos e multifocais, com bordas irregulares que invadem o tecido normal que

os rodeia. Grande número destes tumores progridem e se tornam glioblastomas (Laws et al., 1999). A média de sobrevida é de 3 a 4 anos (Collins, 2002).

1.4.1.1 Glioblastoma multiforme

Os glioblastomas pertencem aos gliomas de grau IV, os quais são altamente malignos, usualmente resistentes a quimioterapia e radioterapia (Maher et al., 2001) e sem tratamento, 95% dos pacientes morrem dentro de 3 meses depois do diagnóstico (Bredel e Pollack, 1999).

Os critérios histológicos para glioblastomas são bem definidos e se esses tumores forem adequadamente amostrados, são geralmente fáceis de diferenciar dos astrocitomas de baixo grau de malignidade (Maher, 2001). As principais características histológicas são o polimorfismo celular, com células gliais imaturas e aberrantes, apresentando imagens de mitose; e a hipercelularidade, traduzida pela proliferação de células imaturas, pequenas, arredondadas, com citoplasma de limites imprecisos. Devido ao rápido crescimento, provoca extensas áreas de destruição do tecido nervoso, causando edema e necrose, caracterizada por um padrão sinuoso nas áreas de hipercelularidade, com células tumorais altamente malignas, posicionadas ao longo das bordas necróticas. A microscopia eletrônica mostra lesões infiltrativas no tecido cerebral que rodeia o tumor, característica sempre presente nos glioblastomas (Laws et al., 1999).

Os glioblastomas se dividem em dois subtipos, primários e secundários (Figura 9). Os glioblastomas primários, tipicamente surgem em pacientes idosos, como um tumor agressivo e altamente invasivo, usualmente sem qualquer evidência clínica prévia da doença. Já os glioblastomas secundários, são observados em pacientes mais jovens, que inicialmente apresentaram astrocitomas de baixo grau (Maher, 2001). Nestes casos, apesar dos tratamentos, a transformação em glioblastoma ocorre, geralmente, dentro de 5 a 10 anos do início do diagnóstico, sendo que podem ser observadas, nas populações celulares primárias,

as características dos diferentes estágios do tumor durante a progressão (Maher, 2001; Collins, 2002). Uma vez estabelecidos, glioblastomas primários e secundários são indistinguíveis clinicamente, possuindo taxas de proliferação e invasão equivalentes, bem como resistência a todas as modalidades terapêuticas (Maher, 2001).

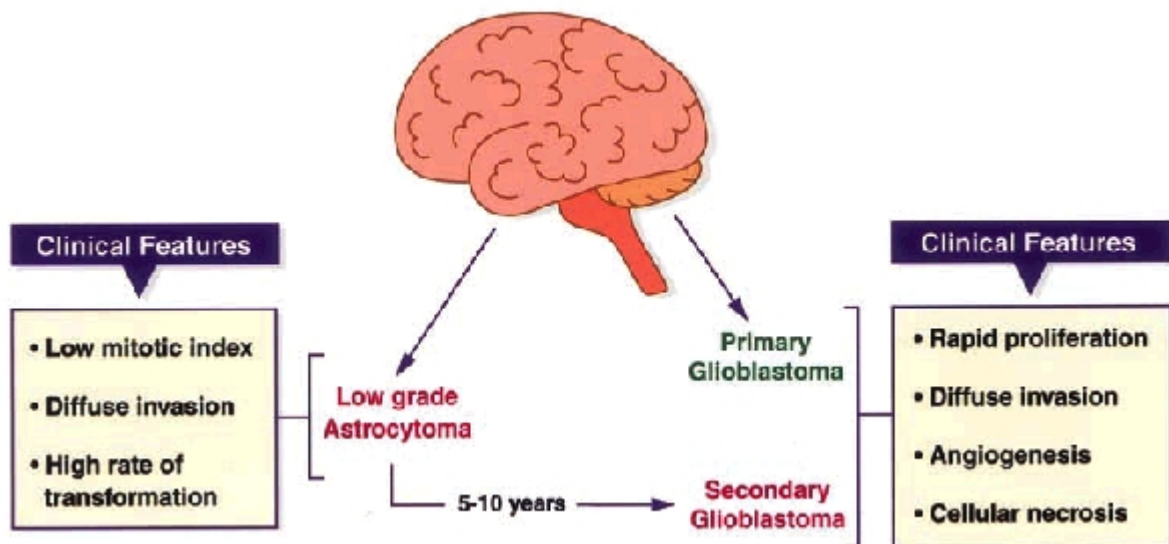


Figura 9. Os dois tipos de glioblastoma.

Adaptado de Maher, 2001.

O processo de transformação de uma célula normal em uma célula tumoral é extenso e pode prosseguir por diversos caminhos, sendo que somente alguns dos processos moleculares são compartilhados por um determinado tipo de neoplasia. Desta forma, acredita-se que cada novo tumor originado possui uma característica genética e epigenética única.

Glioblastomas apresentam o maior número de anormalidades genéticas entre os tumores astrocíticos. Embora a frequência das mutações genéticas específicas, possa variar entre glioblastomas primários e secundários, os mesmos tipos de alterações genéticas são encontradas em ambos subtipos (Maher, 2001).

Como exemplificado na Figura 10, os eventos celulares que levam a gliomagenese são diversos. Entre eles, um dos processos mais frequentes que os tumores possuem em comum, é a deleção do gene supressor tumoral, p53, um fator de transcrição, que regula a progressão do ciclo celular e apoptose em resposta a vários fatores extracelulares, como por exemplo dano ao DNA e mutações oncogênicas (Bogler et al., 1999). Outra alteração comum é a amplificação ou mutação do receptor de EGF (epidermal growth factor), sendo encontrada em 30 a 50% de todos os glioblastomas multiformes (Dai e Holland, 2001).

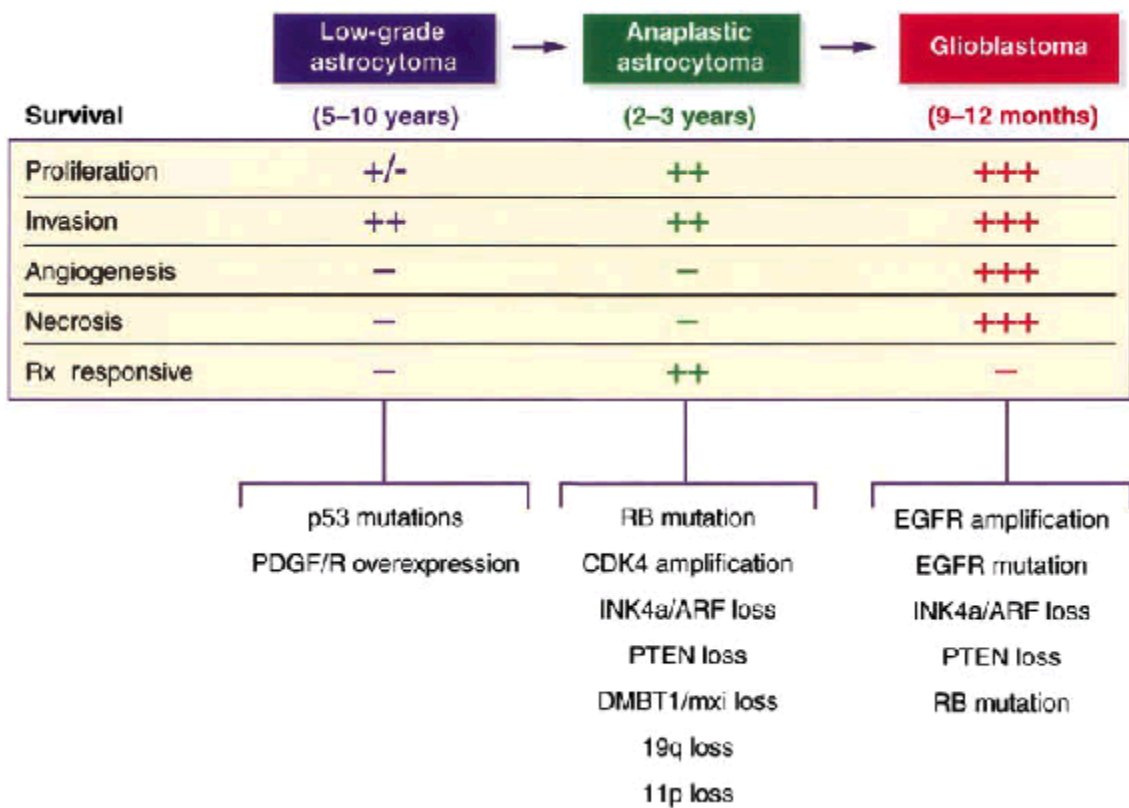


Figura 10. Relação entre sobrevivência média, características histológicas e maiores lesões genéticas associadas com cada tipo de tumor.

Adaptado de Maher et al. (2001).

Outra via de sinalização muito importante para a gliomagenese é a via da PI3K/Akt (Figura 11). Esta via é ativada por diversos fatores de crescimento e está principalmente envolvida na regulação da sobrevivência celular, isto é, a sua ativação produz um efeito anti-apoptótico. Essa via é controlada pela atividade de uma proteína citoplasmática, PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10), que apresenta atividade proteínica e lipídica fosfatase. Assim, PTEN diminui a quantidade de PIP₃ (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) dentro das células, antagonizando as cascatas de sinalização celulares mediadas pela PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), que estão envolvidas na proliferação, regulação transcripcional, metabolismo da glicose, migração celular, síntese de proteína e apoptose (Penninger e Woodgett, 2001) (Figura 11).

Tem sido observado que o cromossomo 10 foi parcialmente ou inteiramente deletado em aproximadamente 90% dos glioblastomas. A região 10q23-24 foi postulada por conter pelo menos um gene de supressão tumoral e experimentos de transferência de minicromossomos mostrou uma habilidade de supressão tumoral. Com diferentes técnicas, três grupos isolaram independentemente o gene de supressão tumoral do cromossomo 10q23 que foi chamado PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10), MMAC1 (mutated in multiple advanced cancer) e TEP1 (TGF β regulated and epithelial cell enriched phosphatase 1). Acredita-se que o cromossomo 10 possua outros genes supressores, devido ao fato de que foram observadas frequentes perdas do cromossomo 10p14-15 durante desenvolvimento de gliomas. Análises citogenéticas de diversos gliomas, demonstram que PTEN está mutado somente em gliomas de alto grau (astrocitoma anaplástico e glioblastoma multiforme) (Besson et al., 1999).

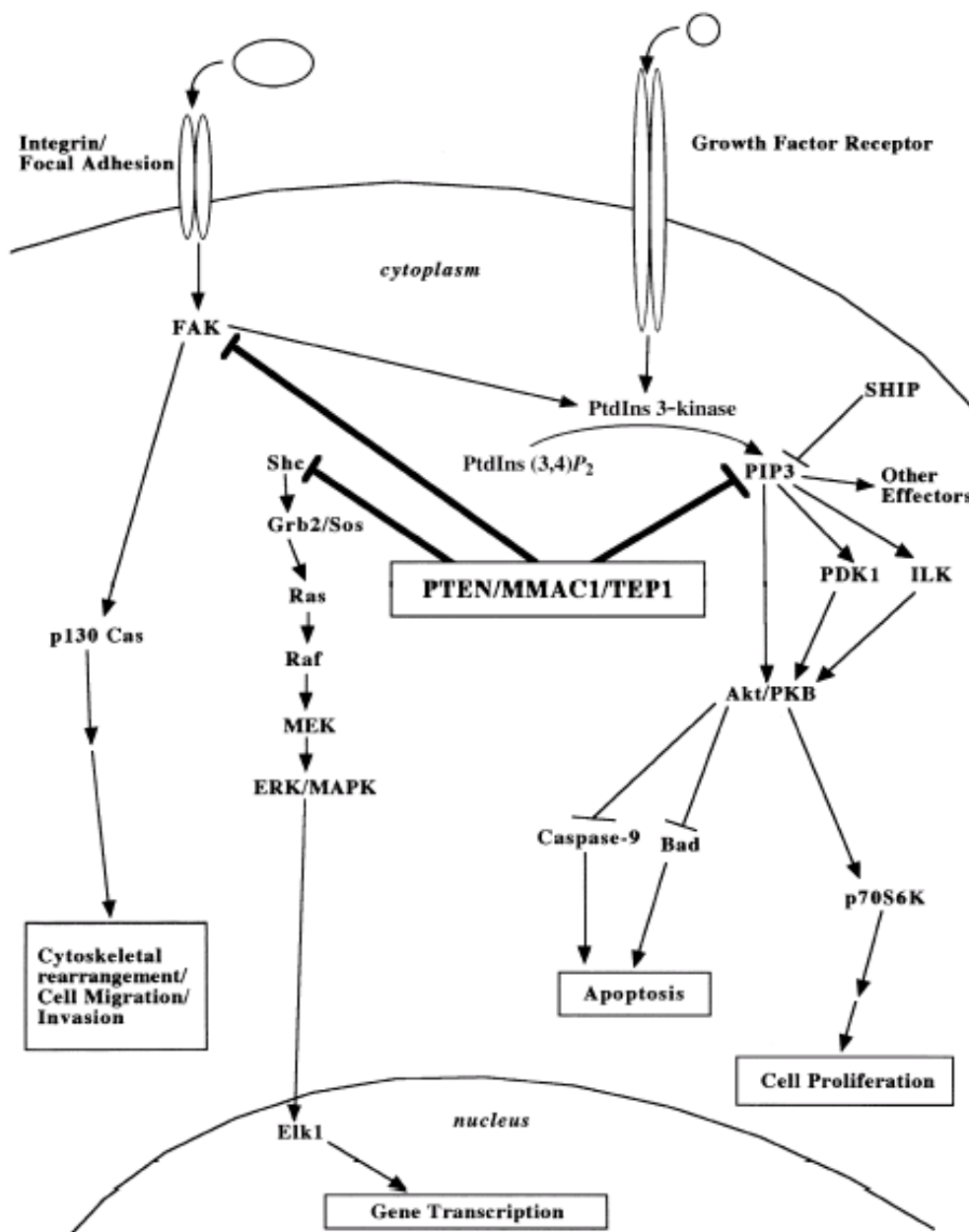


Figura 11. Modo de ação da PTEN/MMAC1/TEP1 via sua regulação pela atividade proteína tirosina fosfatase ou fosfatidilinositol 3-fosfatase.

Adaptado de Besson et al (1999).

2 Objetivos

Este trabalho será apresentado na forma de capítulos, constituídos por artigos científicos publicados e/ou submetidos, que visaram cumprir os seguintes objetivos:

Capítulo 1- conhecer e caracterizar cineticamente o metabolismo do ATP em culturas de astrócitos de diferentes regiões cerebrais.

Capítulo 2- comparar o metabolismo do ATP observado em cultura de astrócitos, com diferentes linhagens de gliomas humanos e de ratos.

Capítulo 3- identificar os membros da família das E-NTPDases responsáveis pelo metabolismo do ATP e ADP, observado em culturas de astrócitos;

Anexo do capítulo 3- constitui-se de dados preliminares de um manuscrito em preparação, onde o objetivo é estudar a expressão e localização das E-NTPDases em gliomas, como perspectiva de um novo trabalho, onde se investigará o envolvimento das E-NTPDases na gliomagênese.

3 Capítulos - artigos científicos

3.1 Capítulo 1

Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte
cultures from different brain regions

Paper *in press* na *Neurochemistry International*.



Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions

Márcia R. Wink^a, Elizandra Braganhol^a, Alessandra S.K. Tamajusuku^a, Emerson A. Casali^a,
Juliana Karl^a, Maria L. Barreto-Chaves^b, João J.F. Sarkis^a, Ana M.O. Battastini^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600-avena,
CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, SP, Brazil

Received 29 November 2002; received in revised form 3 February 2003; accepted 10 February 2003

Abstract

Primary astrocyte cultures from hippocampus, cortex and cerebellum presented different extracellular pattern of adenine nucleotide hydrolysis. The ATP/ADP hydrolysis ratio was 8:1 for hippocampal and cortical astrocytes and 5:1 for cerebellar astrocytes. The AMP hydrolysis in cerebellar astrocytes was seven-fold higher than in cortical or hippocampal cells. No accumulation of extracellular adenosine in all structures studied was observed. Dipyridamol increased significantly inosine levels in the extracellular medium of hippocampal and cortical, but not in cerebellar astrocytes medium. A higher expression of ecto-5'-nucleotidase was identified by RT-PCR in cerebellum. The differences observed may indicate functional heterogeneity of nucleotides in the brain.

© 2003 Published by Elsevier Science Ltd.

Keywords: Astrocyte culture; Brain region; Ecto-5'-nucleotidase; E-NTPDase; ATP; Adenosine

1. Introduction

Besides their energetic function, nucleotides represent an important and ubiquitous class of extracellular molecules that interacts with specific receptors, activating signaling pathways that are crucial for normal functioning of the nervous system (Ralevic and Burnstock, 1998). ATP is a fast excitatory synaptic transmitter in both central nervous systems (CNS) and peripheral nervous systems (PNS), acting via two types of purinergic receptors, the ligand-gated ion channels (P2X purinoceptors) and the G protein-coupled receptors (P2Y purinoceptors) (Ralevic and Burnstock, 1998; Edwards et al., 1992; Evans et al., 1992; Bean, 1992; Hles and Norenberg, 1993). Studies have shown that ATP is an important molecule, which promotes association between neurons and glial cells and is directly involved in astrocytic calcium wave propagation (Scemes et al., 2000), regulation of blood flow and homeostasis (Enyoji et al., 1999) and inflammatory reactions in the brain (Ferrari et al., 1997). In cultured astrocytes, ATP induces long-term trophic effects including morphological differentiation and proliferation, reactive astrogliosis as observed in tissue injury and repair (Neary

et al., 1999). Finally, extracellular ATP demonstrates to be a co-substrate for ectoprotein kinases, resulting in the production of phosphoproteins and ADP (Zimmermann, 2001).

The events induced by extracellular adenine nucleotides are controlled by the action of ecto-enzymes, which represent a general and important mode of modulating neurotransmission. E-NTPDases are enzymes that hydrolyze adenosine tri- and diphosphates (Zimmermann, 2001), anchored to the plasma membrane via hydrophobic domains at the carboxy and/or amino termini, positioning its enzymatic activity outside of the cell. E-NTPDase 1 (CD39, ecto-apyrase or ecto-ATP diphosphohydrolase) hydrolyses nucleoside tri- and diphosphates equally well, E-NTPDase 2 (ecto-ATPase) hydrolyses nucleoside diphosphates only to a marginal extent and E-NTPDase 3 (HB6) has a three-fold preference for nucleoside triphosphates over diphosphates (Zimmermann, 2001). Ecto-5'-nucleotidase/CD73 hydrolyses nucleoside monophosphates such as AMP to the respective nucleoside and is a key enzyme in the nucleotide degradation pathway (Zimmermann, 1992). Adenosine, the end product of the ATP hydrolysis, is an important neuromodulator, activates its own family of receptors, eliciting physiological responses and extending the range of signaling properties of ATP (James and Richardson, 1993).

* Corresponding author. Fax: +55-51-3316-5535.

E-mail address: batas@terra.com.br (A.M.O. Battastini).

Several functions have been considered for astrocytes, such as regulation of the ionic milieu of neurons, control of level of neurotransmitters through the ability to uptake amino acids, biogenic amines and adenosine (Schousboe, 1981) and substrate available for protein synthesis (Hamberger, 1971). Intact astrocytes cultured were able to convert extracellular ATP to ADP via ecto-5'-nucleotidase pathway (Lai and Wong, 1991). The distribution and the physiological role of both purinergic receptors and ecto-5'-nucleotidase activities vary from tissue to tissue and the specific cell types, which produce the enzymes, are of diverse origin and function (Thompson et al., 1990). For example, in the hippocampus, the role of ecto-5'-nucleotidase as a source of neuromodulatory adenosine is well established (Cunha et al., 1996) and alterations of ecto-5'-nucleotidase activities have been found under pathological conditions, such as ischaemia and epilepsy (Zimmermann, 1996; Nagy et al., 1990). In synaptosomes of cerebral cortex, ATP metabolism appears similar to hippocampus (Richardson et al., 1987; Terrian et al., 1989). Moreover, in cerebellum, adenosine could be involved in regulatory events, which might be essential for the maintenance of body fluid-brain barriers (Kalaria and Harik, 1986). In the present work, we studied the ability of astrocytes cultured from rat cerebral cortex, hippocampus and cerebellum to metabolize extracellular ATP, in order to contribute for the understanding of the physiological effects of nucleotides in these distinct areas of the brain.

2. Materials and methods

2.1. Astrocyte culture

Primary astrocyte cultures were prepared as previously described (Pinto et al., 2000). Briefly, hippocampus, cortex and cerebellum of newborn Wistar rats (1–2 days old) were removed, and dissociated mechanically in a Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free balanced salt solution (CMF-BSS) pH 7.4, containing 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.27 mM Na_2HPO_4 , 1.1 mM KH_2PO_4 , 6.1 mM glucose. After centrifugation at 1000 rpm for 5 min the pellet was resuspended in culture medium (pH 7.6) containing 1% DMEM, 8.39 mM HEPES (pH 7.6), 23.8 mM NaHCO_3 , 0.1% fungizone, 0.032% garamicine and 10% fetal calf serum (FCS) from Gibco. The cells were plated at a density of 1.5×10^5 cells/cm² onto 24 multiwell plates pre-treated with poly-L-lysine. Cultures were maintained in 5% CO_2 /95% air at 37 °C and allowed to grow to confluence and used at 21–28 days in vitro. Medium was changed every 3–4 days.

2.2. Ecto-5'-nucleotidases assays

To determine the ATP, ADP and AMP hydrolysis, the 24 multiwell plates containing astrocytes were washed three times with incubation medium in absence of nucleotides. The reaction was started by the addition of 200 μl the in-

cubation medium containing 2 mM CaCl_2 , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM Hepes, pH 7.4 and 3 mM of ATP or ADP at 37 °C. For AMP hydrolysis the same incubation medium was used with exception that the 2 mM MgCl_2 was used instead of CaCl_2 and 1 mM was the nucleotide final concentration. After 10 min of incubation, the reaction was stopped by taking an aliquot of the incubation medium was withdrawn and transferred to a tube containing TCA (5% (w/v)) previously placed on ice. The release of inorganic phosphate (Pi) was measured by the malachite green method (Chan et al., 1986), using KH_2PO_4 as a Pi standard. The non-enzymatic Pi released from nucleotide into assay medium without cells and Pi released from cells incubated without nucleotide was subtracted from the total Pi released during incubation, giving net values for enzymatic activity. All samples were run in triplicate. Specific activity is expressed as nmol Pi released/(min mg) of protein.

2.3. Analysis of extracellular ATP metabolism by HPLC

After 21–28 days of culture, the cellular monolayers were washed three times with incubation containing 2 mM CaCl_2 , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM Hepes, pH 7.4. The reaction was started by adding ATP at final concentration of 100 μM and, when indicated, in presence of 40 μM dipyridamol (final concentration) to the same incubation medium described above. The final volume was 300 μl and the incubation was carried out at 37 °C. After different times of incubation (0, 10, 30, 60, 90 and 180 min), the supernatant was taken and maintained on ice. The supernatant was centrifuged at 1 °C for 30 min at $16,000 \times g$ and aliquots of 50 μl were applied to a reversed-phase HPLC system (Shimadzu, Japan) using a C_{18} Shimadzu column of 12 cm (Shimadzu, Japan) at 254 nm with a mobile phase containing 60 mM KH_2PO_4 , 5 mM tetrabutylammonium chloride, pH 6.0, in 30% methanol according to a previously described method (Voelter et al., 1980). All peaks were identified by its retention time and by comparison with standards. The results were expressed in order to estimate the difference in the percentage of the controls and different compounds in the incubation time. All incubations were carried out in triplicate and the controls to correct for non-enzymatic hydrolysis of nucleotides were done by measuring the peaks presents into the same reaction medium incubated without cells. Controls for cellular purine secretion were done incubating the cells without substrate in the same condition described above. The levels of secreted adenosine, inosine and hypoxanthine were 0.11 ± 0.006 , 1.06 ± 0.15 and 0.037 ± 0.002 nmol, respectively. The values were similar in the tree structures studied and they were discounted off on incubations with ATP.

2.4. Protein determination

Cells in the 24 multiwell plates were dried and solubilized with 100 μl of NaOH 1N and frozen overnight. Then,

169 an aliquot was taken and the protein was measured by the
170 Coomassie blue method (Bradford, 1976), using bovine
171 serum albumin as standard.

172 2.5. Immunocytochemistry

173 Confluent hippocampal, cortical and cerebellar astrocyte
174 cultures were fixed in 70% acetone for 3 min and washed
175 with cold PBS. Non-specific binding sites were blocked
176 for 30 min with 7% normal goat serum/PBS and exposed
177 overnight at 4 °C to primary polyclonal antibodies for
178 anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (sigma) (1:500)
179 as a marker for astrocytes. After three washes with PBS,
180 cells were treated with 0.15% hydrogen peroxidase (Sigma)
181 to inactivate endogenous peroxidase and then incubated
182 with biotinylated secondary anti-rabbit IgG (2 µg/ml) for
183 1 h at room temperature. Following the incubation with
184 avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC,
185 DAKO, Denmark), the staining was visualized by reacting
186 with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloriden (DAB) and
187 hydrogen peroxide using a DAB reagent set (Vector lab,
188 Burlingame, CA).

189 2.6. RT-PCR analysis

190 Total RNA from astrocytes cell cultures was isolated with
191 Trizol LS reagent (Life Technologies) in accordance with
192 the manufacturer's instructions. The cDNA species were
193 synthesized with SuperScript II (Life Technologies) from
194 2 µg of total RNA in a total volume of 20 µl with an oligo
195 (dT) primer in accordance with the manufacturer's instruc-
196 tions. cDNA reactions were performed for 1 h at 42 °C and
197 stopped by boiling for 5 min. Two microliters of cDNA was
198 used as a template for PCR with primers specific for CD73.
199 As a control for cDNA synthesis, β-actin-PCR was per-
200 formed. 2 µl of the RT reaction mix was used for PCR in
201 a total volume of 25 µl using a concentration of 0.5 µM
202 of each primer indicated below and 50 µM of dNTP, 1 U
203 Taq polymerase (Life Technologies) in the supplied reaction
204 buffer.

205 The PCR cycling conditions were as follows: for CD73
206 45 s at 94 °C, 45 s at 64 °C, 1 min 30 s at 72 °C (amplifi-
207 cation product 403 bp) and the same conditions for β-actin
208 (amplification product 210 bp). All PCRs were carried out
209 for 35 cycles and included an initial 3 min denaturation
210 step at 94 °C and a final 10 min extension at 72 °C. Ten
211 microliters of the PCR reaction was analyzed on a 1.5%
212 agarose gel. The following set of primers were used: CD73:
213 5'CCC GGG GGC CAC TAG CAC CTC A3' and 5'GCC
214 TGG ACC ACG GGA ACC TT 3' and for β-actin: 5'TAT
215 GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG 3' and 5' TAC TCC
216 TGC TTC CTG ATC CAC AT 3'. Oligonucleotides were
217 obtained from Invitrogen, Brazil. CD73 mRNA expression
218 was determined as the ratio of the CD73 to β-actin band
219 density.

220 2.7. Statistics

221 The mean ± S.E.M. data for groups of three or four ex-
222 periments were analyzed by ANOVA and, when necessary,
223 a post hoc Student–Newman–Keuls test was done using the
224 statistical program SPSS 6.0 for Windows. The values ob-
225 tained in the assays were considered statically differed from
226 control group with a $P < 0.05$.

227 3. Results

228 3.1. ATP, ADP and AMP hydrolysis

229 The purity of astrocytes cultures prepared from hippocam-
230 pus, cortex and cerebellum were confirmed by immunocy-
231 tochemistry to GFAP, as shown in Fig. 1.

232 In a first set of experiments, we investigated the hy-
233 drolysis of adenine nucleotides in astrocyte cultures. Astro-
234 cyte cultures obtained from hippocampus, cortex and cere-
235 bellum were able to hydrolyze ATP, ADP and AMP (Fig.
236 2A–C). All conditions for nucleotide hydrolysis such as
237 cation dependence, substrate saturation and incubation time
238 were previously determined in order to ensure the linear-
239 ity of reaction (data not shown). The rate of ATP hydroly-
240 sis in hippocampal and cortical astrocytes is similar, with
241 values of 897 ± 108 and 670 ± 62 nmol Pi/(min mg) pro-
242 tein, respectively (Fig. 2A). In contrast, ATPase activity
243 (492 ± 28) in astrocytes from cerebellum was significantly
244 less in relation to hippocampus (Fig. 2A). Fig. 2B shows
245 the ADP hydrolysis in astrocytes cultures. The specific ac-
246 tivities for ADP hydrolysis in astrocytes from hippocam-
247 pus, cortex and cerebellum were very similar: 111 ± 14 ;
248 94 ± 8 and 114 ± 14 nmol Pi/(min mg) protein, respectively.
249 On the other hand, the AMP hydrolysis in cerebellar astro-
250 cytes (108 ± 12) was significantly higher when compar-
251 ed with hippocampal and cortical astrocytes (16 ± 3 and
252 12 ± 3 , respectively) (Fig. 2C). The AMP hydrolysis is not
253 significantly different in hippocampus and cortex astrocytes
254 cultures.

255 3.2. Analysis of extracellular ATP metabolism

256 The extracellular products of ATP hydrolysis by astro-
257 cytes from hippocampus, cortex and cerebellum were ana-
258 lyzed by HPLC. Within 30 min, virtually all the extracellu-
259 lar ATP was metabolized in the presence of intact astrocytes
260 with a subsequent ADP production (Fig. 3). The hippocam-
261 pal and cortical astrocytes demonstrated a similar pattern
262 of extracellular ATP metabolism. Both cellular types could
263 quickly metabolize the extracellular ATP leading to an ADP
264 accumulation (60 and 40% for hippocampus and cortex as-
265 trocytes, respectively) (Fig. 3A and B). The extracellular
266 ATP was also rapidly metabolized by cerebellar astrocytes,
267 but the ADP level was significantly lower (20%) (Fig. 3C).
268 For all astrocyte cultures studied, the level of extracellu-

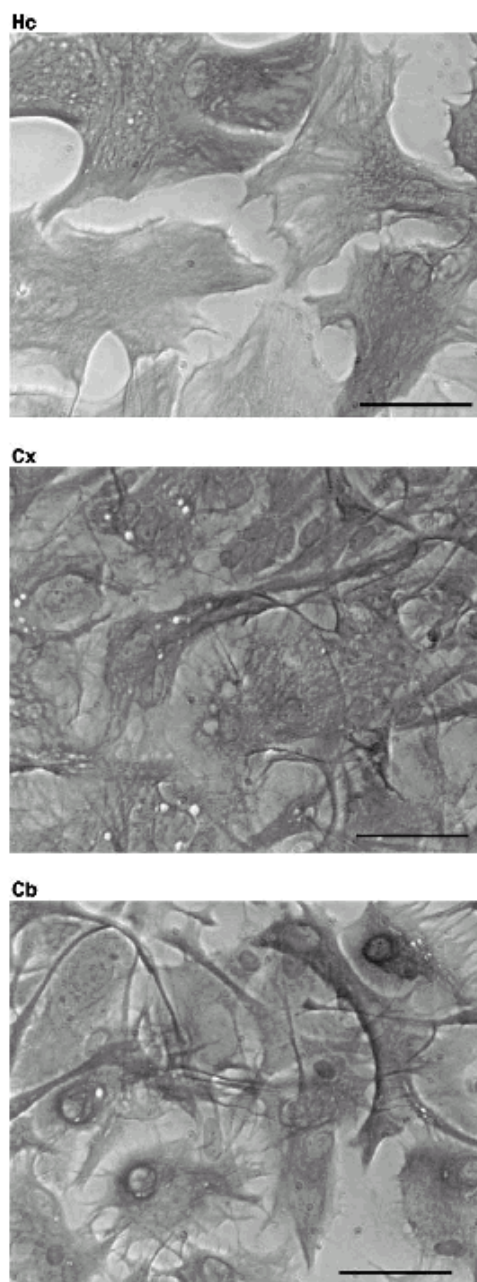


Fig. 1. Representative photomicrographs of GFAP immunoreactivity in astrocyte cultures from different brain regions. Astrocytes from hippocampus (Hc), cortex (Cx) and cerebellum (Cb) were fixed in acetone and immuno-stained with polyclonal antibodies for GFAP as described in Section 2. Scale bar 50 μ m.

lar ADP only started to decrease when the ATP level was already reduced to around 20% (Fig. 3A–C), suggesting a very active ATPase activity in these cells. In hippocampal and cortical astrocytes the ADP was completely catabolized in 180 min (Fig. 3A and B) and in cerebellar astrocytes in 60 min.

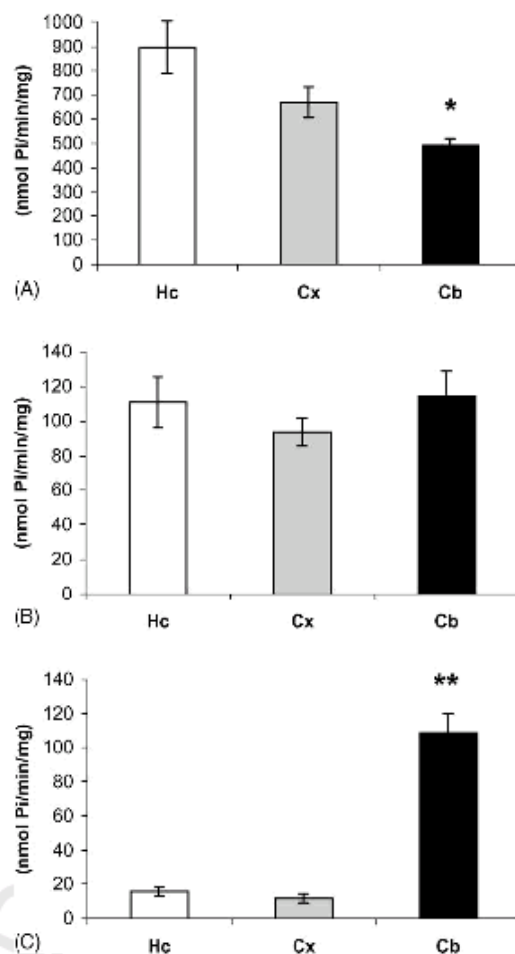


Fig. 2. ATPase, ADPase and AMPase activities in the astrocyte cultures. Hippocampal (Hc), cortical (Cx) and cerebellar (Cb) astrocytes were assayed for the presence of nucleotidases as described in Section 2 using 3.0 mM ATP/ADP and 2.0 mM Ca^{+2} or 1.0 mM AMP and 2.0 mM Mg^{2+} . (A) ATP hydrolysis. (B) ADP hydrolysis. (C) AMP hydrolysis. Bars represent means \pm S.E.M. of at least three different experiments. (*) ATPase activity in cerebellum is significantly different from hippocampus and (**) AMPase activity in cerebellum is significantly different from cortex and hippocampus (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

In this way, there was a gradual increase in AMP amount until a maximal of 70% in 30 min for cerebellar astrocytes (Fig. 3C) and in 60 min for hippocampal and cortical astrocytes (Fig. 3A and B). In contrast to hippocampus and cortex, astrocytes from cerebellum hydrolyzed the extracellular AMP very rapidly and the AMP levels after 180 min of incubation were virtually zero (Fig. 3C). The higher rate of AMP metabolism in cerebellar astrocytes than in hippocampal and cortical astrocytes is in agreement with the results obtained with the AMPase activity measured by Pi released (Fig. 2C).

At the end of incubation time (180 min) the compounds that accumulate in the incubation medium of hippocampal and cortical astrocytes were AMP (60%), inosine (20%) and

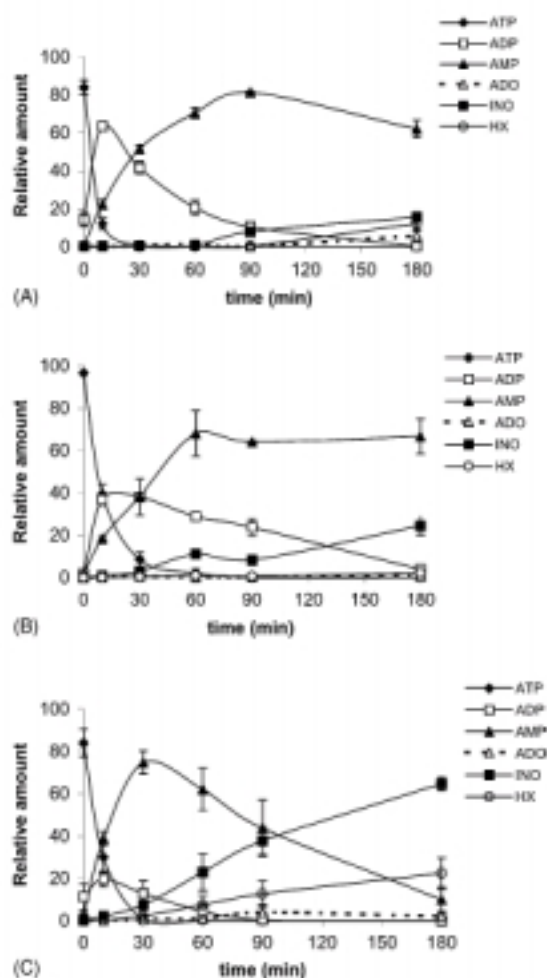


Fig. 3. Extracellular ATP metabolism on hippocampal, cortical and cerebellar astrocytes. The astrocyte cultures from hippocampus (A), cortex (B) and cerebellum (C) were incubated with ATP 100 μ M and an aliquot of the supernatant was withdrawn at 0, 10, 30, 60, 90 and 180 min and the presence of ATP, ADP, AMP, adenosine (ADO), inosine (INO) and hypoxanthine (HX) were determined after separation by HPLC. The compounds of the purine cascade were identified and measured by comparison with standards. The data are mean \pm S.E.M. of at least three different experiments.

289 hypoxanthine (10 and 5%, respectively) (Fig. 3A and B). In
 290 cerebellar astrocytes, the compounds that are present at the
 291 end of incubation time (180 min) were AMP (10%), inosine
 292 (60%) and hypoxanthine (20%) (Fig. 3C). Very low adeno-
 293 sine levels were detected at this time of even in hippocampal
 294 astrocytes where its concentration reaches 5% of the total
 295 amount of purines in the medium (Fig. 3A).

296 3.3. Effect of dipyridamol on extracellular ATP metabolism

297 Although astrocyte cultures present a high rate of extra-
 298 cellular ATP degradation, it was not observed any adenosine

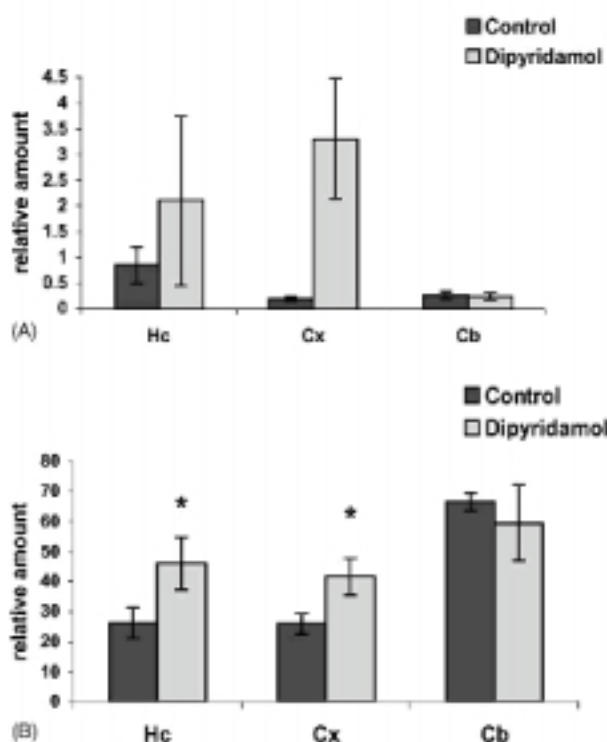


Fig. 4. The effect of dipyridamol on the concentration of extracellular nucleosides in hippocampal (Hc), cortical (Cx) and cerebellar (Cb) astrocytes. The astrocyte cultures were incubated with ATP 100 μ M without (black) or with dipyridamol (40 μ M) (gray). The relative amounts of adenosine (A) and inosine (B) were measured by HPLC as described in Section 2. The compounds were identified and measured by comparison with standards. The data are mean \pm S.E.M. of at least three different experiments. Significantly different from control (* $P < 0.01$).

299 accumulation in the medium of incubation. Thus, to better
 300 investigate the fate of adenosine generated by AMP hydroly-
 301 sis, the products of ATP degradation was followed by HPLC
 302 in the presence of dipyridamol, a classical blocker of nucleo-
 303 side transporters, in the incubation medium. Although the
 304 relative adenosine levels were increased in the presence of
 305 40 μ M dipyridamol in hippocampal and cortical astrocytes
 306 (Fig. 4A), the absolute amount of this metabolite was almost
 307 insignificant when compared to inosine level. Moreover, in-
 308 cubation with dipyridamol increased significantly the ino-
 309 sine amount in these cellular types (Fig. 4B). Differently
 310 from hippocampal and cortical astrocytes, dipyridamol had
 311 no significant effect on the extracellular adenosine and ino-
 312 sine amounts on incubation medium from cerebellar astro-
 313 cytes (Fig. 4A and B).

314 3.4. Expression of the ecto-5'-nucleotidase in astrocyte 315 culture cells from hippocampus, cortex and cerebellum

316 The pattern of AMP hydrolysis was higher in cere-
 317 bellar astrocytes, when compared to hippocampal and

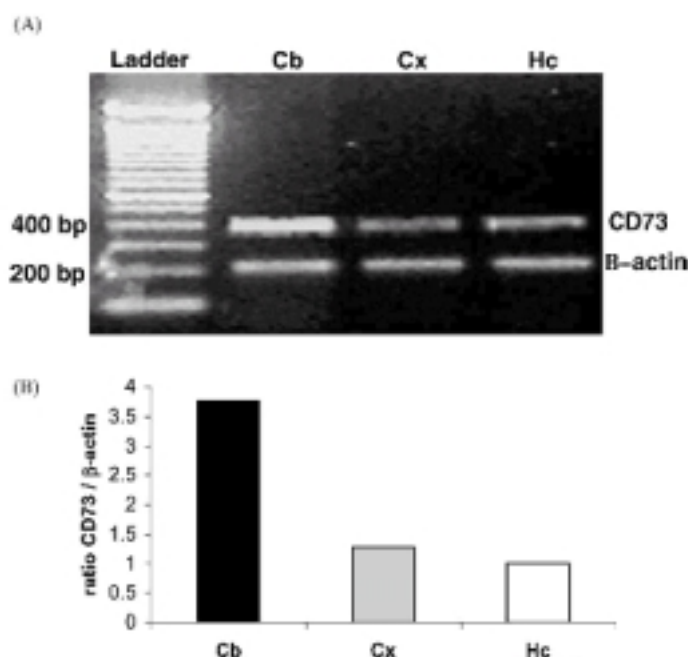


Fig. 5. Expression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cerebellar (Cb), cortical (Cx) and hippocampal (Hc) astrocytes by RT-PCR. (A) Total RNA was extracted from astrocyte cultures and the cDNA was analyzed using specific primers for CD73. PCR products were analyzed by size and sequence. β -Actin-mRNA was used as an internal standard for cDNA synthesis. (B) Quantitative analysis of CD73 mRNA expression in astrocytes from Cb, Cx and Hc by densitometry. The results are presented as ratio of CD73/ β -actin.

318 cortical cells. Therefore, to verify if this increase on the
 319 AMP hydrolysis is a result of a higher expression of
 320 ecto-5'-nucleotidase, the mRNA levels were measured on
 321 hippocampal, cortical and cerebellar astrocyte cultures.
 322 All cell cultures revealed specific signal (403 bp fragment)
 323 corresponding to mRNA for ecto-5'-nucleotidase (Fig. 5).
 324 The intensity of the bands obtained with hippocampal and
 325 cortical astrocytes were similar (Fig. 5A and B). How-
 326 ever, a stronger signal was produced by cerebellar astro-
 327 cytes, which is in agreement with the specific activities
 328 and with the analysis of extracellular ATP metabolism by
 329 HPLC.

330 4. Discussion

331 Astrocytes represent the major cellular population in the
 332 CNS. It has been shown that they are not merely supportive
 333 brain cells, but are indispensable partners of neurons, either
 334 in physiological or in pathological conditions.

335 Among the cerebral cells, astrocytes are the main source
 336 of extracellular adenine-based purines and an important tar-
 337 get for the actions of purines (Ciccarelli et al., 2001). After
 338 elicit their function, extracellular nucleotides, e.g. ATP, are
 339 regulated by the activity of a cascade of cell surface-bound
 340 enzymes such as E-NTPDases, ecto-5'-nucleotidase and
 341 ecto-adenosine deaminase. These enzymatic activities can

342 regulate the extracellular concentration of adenine nu-
 343 cleotides and nucleosides modulating its local effects.

344 In the present study, the extracellular ATP, ADP, AMP
 345 and adenosine degradation and metabolism were examined
 346 in astrocytes cultures obtained of rat hippocampus, cortex
 347 and cerebellum. These cultures have been previously charac-
 348 terized and express morphological and biochemical hetero-
 349 geneity with distinct secretion of proteins (Pinto et al., 2000).
 350 The ATP, ADP and AMP hydrolysis profile was similar in
 351 hippocampus and cortex astrocytes, with an ATP/ADP hy-
 352 drolytic ratio of 8:1. In contrast, the ATPase activity in cere-
 353 bellar astrocytes was significantly lower (around 1.5-fold)
 354 than hippocampal astrocytes, with the ATP/ADP hydrolytic
 355 ratio of 5:1. These catalytic ratios suggest a heterogeneous
 356 distribution of the members of E-NTPDase family in the as-
 357 trocytes from different brain regions (Zimmermann, 2001;
 358 Kegel et al., 1997).

359 The analysis of extracellular ATP metabolism by HPLC
 360 demonstrated that it is completely hydrolyzed in 30 min by
 361 all astrocyte cultures examined, while ADP accumulates
 362 more in the medium of cortical and hippocampal than in
 363 cerebellar astrocytes. The increase in AMP amount in 30 min
 364 for cerebellar astrocytes (Fig. 3C) with a lower ATPase ac-
 365 tivity (Fig. 2A) may suggest the presence of an apyrase-like
 366 enzyme and/or an ATP pyrophosphatase on ATP degrada-
 367 tion cascade, in astrocytes from this structure (Heine et al.,
 368 1999). At the end of the incubation time, adenosine was not

369 detected in significant levels and the maximal level was 5%
 370 in hippocampal astrocytes. The lack of adenosine accumula-
 371 tion could be the result of extracellular mechanisms that are
 372 responsible for the control of its concentration, such as the
 373 adenosine uptake by a specialized transport system or the ac-
 374 tion of the ecto-adenosine deaminase activity (Franco et al.,
 375 1997; Geiger et al., 1988; Cunha et al., 2000) with a conse-
 376 quent inosine production. To evaluate the adenosine fate, we
 377 performed experiments adding dipyridamol that can block
 378 more than 90% the adenosine up-take in astrocyte cells in
 379 culture (Lai and Wong, 1991; Frizzo et al., 2001). Dipyri-
 380 damol increased significantly the inosine levels in the ex-
 381 tracellular medium of hippocampal and cortical astrocytes,
 382 indicating the participation of nucleoside transporters in the
 383 control of extracellular levels of this compound. However,
 384 there was not a parallel increase in the extracellular amount
 385 of adenosine. Therefore, we can conclude that adenosine is
 386 rapidly metabolized extracellularly, by the ecto-ADA, to in-
 387 osine which is the main nonphosphorylated product detected
 388 at 180 min in the medium. In contrast, in cerebellar astro-
 389 cytes, dipyridamol did not affect the concentration of the nu-
 390 cleosides despite the high AMP hydrolysis, indicating that
 391 ecto-adenosine deaminase activity is considerably higher in
 392 cerebellar than in hippocampal and cortical astrocytes. Taken
 393 together, these results point to the presence of a very active
 394 ecto-adenosine deaminase in astrocytes from hippocam-
 395 pus, cortex and cerebellum that may be the most important
 396 mechanism for the control of extracellular adenosine levels
 397 in intact astrocyte cultured from these brain regions brain.

398 The main finding of the present study is the elevated
 399 ecto-5'-nucleotidase activity that was seven fold higher in
 400 cerebellar astrocytes. This high ecto-5'-nucleotidase activ-
 401 ity in cerebellum astrocytes is in accordance with the strong
 402 expression of its mRNA when compared with hippocampal
 403 and cortical astrocytes.

404 What is the biological meaning of this difference in the
 405 AMP metabolism found in cerebellar astrocytes? At the
 406 present, this is an open question about which we can just
 407 raise some suggestions. Previous studies performed in cere-
 408 bellum indicate that the ecto-5'-nucleotidase may serve as a
 409 marker for migratory nerve cells, and its widespread local-
 410 ization in developing cerebellum suggest that this enzyme
 411 plays a role in neuro-glial interactions (Schoen et al., 1988).
 412 There are evidences that enzymatic activity for hydrolysis of
 413 AMP is related with an important function in neural devel-
 414 opment and regeneration (Maienschein and Zimmermann,
 415 1996), which is generally more rapid in cerebellum than in
 416 other brain structures (Marangos et al., 1982). Moreover, the
 417 products of AMP catabolism, adenosine and inosine, may act
 418 as trophic agents on the CNS, inducing functional changes,
 419 which modulate neuronal differentia (Rathbone et al.,
 420 1992; Rathbone et al., 1999).

421 In summary, the results obtained here demonstrate that
 422 astrocytes from cerebellum exhibited distinct nucleotide hy-
 423 drolysis when compared with hippocampus and cortex indi-
 424 cating differences in ATP metabolism in the brain areas.

Acknowledgements

425 We are especially grateful to Dr. Carmem Gottfried for
 426 the kind and helpful assistance with astrocyte cultures. This
 427 work was supported by the Conselho de Desenvolvimento
 428 Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil), and Fundação de
 429 Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). M.R.
 430 Wink and E. Braganhol were recipient of CNPq-Brasil fel-
 431 lowship.
 432

References

- 433
 434 Bean, B.P., 1992. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated
 435 ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 87–90.
 436 Bradford, M.M.A., 1976. A rapid and sensitive method for the
 437 quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle
 438 of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 218–251.
 439 Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay
 440 for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380.
 441 Ciccarelli, R., Ballerini, P., Sabatino, G., Rathbone, M.P., D'Onofrio,
 442 M., Caciagli, F., Di Iorio, P., 2001. Involvement of astrocytes in
 443 purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*
 444 19, 395–414.
 445 Cunha, R.A., Correia-de-Sá, P., Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., 1996.
 446 Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat
 447 hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from
 448 released adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* 119, 253–260.
 449 Cunha, R.A., Almeida, T., Ribeiro, J.A., 2000. Modification by arachidonic
 450 acid of extracellular adenosine metabolism and neuromodulatory action
 451 in the rat hippocampus. *J. Biol. Chem.* 275, 37572–37581.
 452 Edwards, F.A., Gibb, A.J., Colquhoun, D., 1992. ATP receptor-mediated
 453 synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359, 144–147.
 454 Enjyoji, K., Sévigny, J., Lin, Y., Frenette, P., Christie, P.D., Schulte am
 455 Esch, J., Imai, M., Edelberger, J.M., Rayburn, H., Lech, M., Beeler,
 456 D.M., Cszizmadia, E., Wagner, D.D., Robson, S.C., Rosenberg, R.D.,
 457 1999. Targeted disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase results in
 458 disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature Med.* 5, 1010–
 459 1017.
 460 Evans, R.J., Derkach, V., Surprenant, A., 1992. ATP mediates fast synaptic
 461 transmission in mammalian neurons. *Nature* 357, 503–505.
 462 Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Collo, G., Buell, G.,
 463 Di Virgilio, F., 1997. ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells.
 464 *Neuropharmacology* 36, 1295–1301.
 465 Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Saura, C., Mollol, J., Lluís, C., 1997.
 466 Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme.
 467 *Prog. Neurobiol.* 52, 283–294.
 468 Frizzo, M.E.S., Lara, D.R., Dahm, K.C.S., Prokopiuk, A.S., Swanson,
 469 R.A., Souza, D.O., 2001. Activation of glutamate uptake by guanosine
 470 in primary astrocyte cultures. *NeuroReport* 12, 879–881.
 471 Geiger, J.D., Johnston, M.E., Yago, V., 1988. Pharmacological
 472 characterization of rapidly accumulated adenosine by dissociated brain
 473 cells from adult rat. *J. Neurochem.* 51, 283–291.
 474 Hamberger, A., 1971. Amino acid uptake in neuronal and glial cell
 475 fractions from rabbit cerebral cortex. *Brain Res.* 31, 169–178.
 476 Heine, P., Braun, N., Heilbronn, A., Zimmermann, H., 1999. Functional
 477 characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase
 478 after heterologous expression in CHO cells. *Eur. J. Biochem.* 262,
 479 102–107.
 480 Illes, P., Norenberg, W., 1993. Neuronal ATP receptors and their
 481 mechanism of action. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 50–54.
 482 James, S., Richardson, P.J., 1993. Production of adenosine from
 483 extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J. Neurochem.*
 484 60, 219–227.

- 485 Kalaria, R.N., Harik, S.I., 1986. Adenosine receptors of cerebral
486 microvessels and choroid plexus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 6, 463–
487 470.
- 488 Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C.R., Zimmermann,
489 H., 1997. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are
490 expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36, 1189–1200.
- 491 Lai, K., Wong, P.C.L., 1991. Metabolism of extracellular adenosine
492 nucleotides by cultured rat brain astrocytes. *J. Neurochem.* 57, 1510–
493 1515.
- 494 Maienschein, V., Zimmermann, H., 1996. Immunocytochemical locali-
495 zation of ecto-5'-nucleotidase in cultures of cerebellar granule cells.
496 *Neuroscience* 70, 429–438.
- 497 Marangos, P.J., Patel, J., Stivers, J., 1982. Ontogeny of adenosine binding
498 sites in rat forebrain and cerebellum. *J. Neurochem.* 39, 25–30.
- 499 Nagy, A.K., Houser, C.R., Delgado-Escueta, A.V., 1990. Synaptosomal
500 ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of
501 humans with focal epilepsy. *Brain Res.* 529, 192–201.
- 502 Neary, J.T., Kang, Y., Bu, Y., Yu, E., Akong, K., Peters, C.M.,
503 1999. Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in
504 astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C,
505 extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from
506 the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J.*
507 *Neurosci.* 19, 4211–4220.
- 508 Pinto, S.S., Gottfried, C., Mendez, A., Gonçalves, D., Karl, J., Gonçalves,
509 C.A., Wofchuk, S., Rodnight, R., 2000. Immunocontent and secretion
510 of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation
511 to morphology. *FEBS Lett.* 486, 203–207.
- 512 Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines.
513 *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492.
- 514 Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Kim, J.K., Gysbers, J.W., DeForge,
515 S.P., Smith, R.W., Hughes, D.W., 1992. Adenosine and nucleotides
516 stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells.
517 *Neurosci. Res.* 13, 1–17.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, 518
M.A.R., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F., 1999. Trophic effects 519
of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59, 663–690. 520
- Richardson, P.J., Brown, S.J., Bailyes, E.M., Luzio, J.P., 1987. 521
Ecto-enzymes control adenosine modulation of immunoisolated 522
cholinergic synapses. *Nature* 327, 232–234. 523
- Scemes, E., Suadicani, S.O., Spray, D.C., 2000. Intercellular commu- 524
nication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions 525
and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. *J. Neurosci.* 526
20, 1435–1445. 527
- Schoen, S.W., Graeber, M.B., Tóth, L., Kreutzberg, G.W., 1988. 528
5'-Nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for 529
migrating nerve cells? *Dev. Brain Res.* 39, 125–136. 530
- Schousboe, A., 1981. Transport and metabolism of glutamate and GABA 531
in neurons and glial cells. *Int. Rev. Neurobiol.* 22, 1–45. 532
- Terrian, D.M., Hernandez, P.G., Rea, M.A., Peters, R.I., 1989. ATP release, 533
adenosine formation, and modulation of dynorphin and glutamic 534
acid release by adenosine analogues in rat hippocampal mossy fiber 535
synaptosomes. *J. Neurochem.* 53, 1390–1399. 536
- Thompson, L.F., Ruedi, J.M., Glass, A., Moldenhauer, G., Moller, 537
P., Low, M.G., Klemens, M.R., Massaia, M., Lucas, A.H., 1990. 538
Production and characterization of monoclonal antibodies to the 539
glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation 540
antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Tissue Antigens* 35, 9–19. 541
- Voelter, W., Zech, K., Arnold, P., Ludwig, G., 1980. Determination of 542
selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine 543
by reversed-phase ion-pair. *J. Chromatogr.* 199, 345–354. 544
- Zimmermann, H., 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and 545
functional aspects. *Biochem. J.* 285, 345–365. 546
- Zimmermann, H., 1996. Biochemistry, localization and functional roles of 547
ectonucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49, 589–618. 548
- Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some developments and a note 549
on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52, 44–56. 550

3.2 Capítulo 2

Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines

Paper aceito para publicação na Cancer Letter.

Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines

**Márcia R. Wink¹, Guido Lenz², Elizandra Braganhol¹, Alessandra S.K.Tamajusuku¹,
Gilberto Schwartsmann³, João J.F. Sarkis¹ and Ana M.O. Battastini^{1*}**

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ²Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS, ³South-American Office for Anticancer Drug Development (SOAD), HCPA. Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Dr. A.M.O. Battastini

Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo

CEP 90035-003

Porto Alegre, RS, BRASIL

FAX +55 51 3316 5535

e-mail: batas@terra.com.br

Abstract

In order to characterize the enzymes involved in the purine nucleotide catabolism as indicators of invasiveness and aggressiveness of malignant gliomas, the degradation of extracellular nucleotides by five different glioma cell lines was investigated and compared with primary astrocytes. Rapid hydrolysis of extracellular ATP and ADP by astrocytes was observed, whereas all glioma cell lines examined presented low rates of ATP hydrolysis. In contrast, ecto-5'-nucleotidase activity was increased in glioma cell lines when compared to astrocytes. Considering that ATP is recognized as a mitogenic factor that induces proliferation in human glioma cells, the substantial decrease in ATP and ADP hydrolysis observed in gliomas leads us to suggest that alterations in the ecto-nucleotidases pathway may represent an important mechanism associated with malignant transformation of glioma cell lines.

Key words: ATP; NTPDases; Ecto-5'-nucleotidase; Astrocytes; Gliomas; Proliferation.

1. Introduction

Nucleotides, a ubiquitous class of signaling molecules, are known to regulate many pathophysiological functions in the extracellular space. Extracellular ATP is recognized as an agonist that mediates a wide variety of biological responses in the central and peripheral nervous systems, largely by binding to either G protein-coupled P2Y or ligand-gated P2X receptors [1]. There are important mechanisms that control external concentration of ATP and hence regulate these P2- mediated effects. Ectonucleotidases constitute a highly organized system for the regulation of nucleotide-mediated signaling, controlling the rate, amount and timing of nucleotide (e.g. ATP) degradation and nucleoside (e.g. adenosine) formation. The hydrolysis of ATP to AMP is catalyzed either by ecto-ATPDases or ecto-apyrases [2-7] and the AMP formed by this enzyme is hydrolyzed to adenosine by the action of an ecto-5'-nucleotidase [8].

In mammals, at least six related enzymes that hydrolyze extracellular tri- and diphosphonucleosides (named NTPDase 1 to 6) have been cloned and characterized by the presence of “apyrase conserved regions” (ACR). The molecular properties, functional roles and nomenclature of ectonucleotidases have been recently reviewed [9,10]. Changes in the NTPDase activities have been shown in different pathological conditions. For instance, altered expression of these enzymes has been described in tumor cells from different origins [11,12].

Ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT, CD73), the final enzyme in the extracellular pathway for the complete hydrolysis of ATP to adenosine, is expressed in many different tissues [8]. Although in some studies, this enzyme was found to be decreased in cancer tissues [13-15], other studies showed high 5'-NT activities in cancerous tissue with respect

to surrounding normal tissues [16,17]. In addition, involvement of ecto-5'-NT in drug resistance and tumor-promoting functions has been proposed [18,19].

Astroglial cells perform a variety of roles in the nervous system, including ion and neurotransmitter homeostasis, growth factor synthesis and mechanical support [20,21]. Astrocytes undergo profound functional changes following trauma and ischemia in a process called reactive astrogliosis, and extracellular ATP seems to be an important factor in this process [22]. Malignant glioma is a highly invasive neoplasm that infiltrates diffusely into regions of normal brain [23] and is the most common type of primary central nervous system (CNS) tumor. Other forms of benign and malignant intrinsic brain tumors also arise from cells of astrocytic lineage [24]. Despite many therapeutic strategies, survival rate for patients with malignant gliomas remains low [25] and other therapeutic strategies are urgently needed.

Extracellular nucleotides and nucleosides have been implicated as trophic agents on glial cells. The action of nucleotides and nucleosides on astrocytic proliferation indicates that multiple P2-subtypes exist on those cells, inducing proliferation through the ERK cascade [26]. Since it is known that ATP induces human astrocytoma cell proliferation [27] and that ectonucleotidases play a key role in purinergic signaling regulation [28], the aim of the present study was to examine and compare the degradation of adenine nucleotides in selected human glioma lines. A possible involvement of ecto-nucleotidases as indicators of invasiveness and aggressiveness of malignant gliomas is suggested.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fungizone were purchased from Gibco BRL. Fetal calf serum (FCS) was from Cultilab, Brazil. All chemicals and other reagents were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Cell culture

Astrocyte cultures. Primary astrocyte cultures from rat were a generous gift from C. Gottfried. The culture medium (DMEM, 8.39 mM HEPES, (pH 7.6), 23.8 mM NaHCO₃, 0.1% fungizone, 0.032% garamicine and 10% fetal calf serum) was changed every 3-4 days. Cultures were maintained in 5% CO₂/95% air at 37°C and allowed to grow to confluence [29].

Human glioma cell lines. U-87 MG, U-373 MG, U-251, U-138 human glioma cell lines were obtained from South-American Office for Anticancer Drug Development (SOAD). Cells were maintained in complete medium consisting of DMEM containing 2% (w/v) L-glutamine and 15% (v/v) FCS under the same conditions described below. For experiments, exponentially growing cells were detached from the culture flasks with EDTA-trypsin, inoculated in complete medium into 24-well microplates and allowed to grow to confluence (3-4 days). Medium was changed every day [30].

Rat glioma cell line. C6 glioma cell line was a generous gift from Dr. A.G. Trentin. This cell line was maintained the same way as human glioma, except for the FCS, which was 5% (v/v).

2.3. Ecto-nucleotidases assay

NTPDase activity. To determine the 5'-tri and di-phosphate nucleoside activities, the 24-well microplates containing astrocytes or glioma cells were washed three times with incubation medium in absence of nucleotides/ PO_4 . The reaction was started by the addition of 200 μL of the incubation medium containing (final concentration) 2 mM CaCl_2 , 120 mM NaCl , 5 mM KCl , 10 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4 and nucleotides (ATP, GTP, CTP, ITP, ADP, GDP, CDP or IDP) at 37°C. The nucleotide concentrations were chosen from substrate curves to assure the enzyme saturation (1 mM for gliomas and 3 mM for astrocytes) and the incubation time was chosen from time courses (5 min for astrocytes and 30 min for glioma cell lines) to assure the linearity of the reaction (data not shown). To stop the reaction, an aliquot of the cell incubation medium was withdrawn and transferred to an Eppendorf tube containing trichloroacetic acid (TCA) to a final concentration of 5 % (w/v). The production of inorganic phosphate (P_i) was measured using the malachite green method [31], with KH_2PO_4 as the P_i standard. The non-enzymatic P_i released from nucleotide into the assay medium without cells and P_i released from cells incubated without nucleotide were subtracted from the total P_i released during incubation, giving net values for enzymatic activity. All samples were run in triplicate. Specific activity was then expressed as nmol P_i released/min/mg of protein.

5'-Nucleotidase activity. The incubation medium was the same as that used for ecto-apyrase activity, except that the 2 mM MgCl_2 was used instead of CaCl_2 and AMP as substrate. The AMP concentration was 2 mM to gliomas and 1 mM to astrocytes.

Nucleotide and nucleoside analysis using HPLC: The cells were incubated as described above, except that ATP concentration was 100 μM . To stop the reaction, an aliquot of the incubation medium was transferred to an Eppendorf tube on ice and

centrifuged at 4°C for 30 min at 16,000 g. Aliquots of 40 µl were applied to a reverse phase HPLC system using a C18 Shimadzu column (Shimadzu, Japan) with absorbance measured at 260 nm. The mobile phase was 60 mM KH₂PO₄, 5 mM tetrabutylammonium chloride, pH 6.0, in 30% methanol as described [32]. Retention times were assessed using standard samples of nucleotide. The non-enzymatic hydrolysis of ATP was consistently less than 5% and cells incubated without the addition of nucleotides did not present any detectable peak.

2.4. Protein determination

Astrocyte and glioma cells in the 24-well microplates were solubilized with 100 µL of NaOH 1N and then frozen overnight at -20 °C. An aliquot from thawed material was taken and the protein was measured by the Coomassie blue method [33], using bovine serum albumin as standard.

2.5. Measurement of LDH release. The cell integrity was estimated by measuring the activity of the cytosolic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) present in supernatants after incubation at 37°C, and comparing it to the total enzyme activity in cells lysed with 1% Triton X-100 [34].

3. Results

3.1. Metabolism of extracellular ATP of intact astrocytes and glioma cell lines

Astrocytes, in a manner comparable to several cell types and tissues, exhibited hydrolysis rate for extracellular nucleotides in the order AMP<ADP<ATP (2-4,35), with one order of magnitude increase in the rate of hydrolysis for each additional phosphate present at the adenosine molecule. The specific activities were 873, 107 and 14

nmol/min/mg for ATP, ADP and AMP, respectively, confirming high ATPDase activities, and low AMPase activities (Table 1). This degradation rate led to a metabolization of 20 nmoles of ATP (100 μ M in 200 μ l) in less than 30 min, accumulating AMP over the next minutes, as measured by HPLC (1 A). Surprisingly, the five glioma cell lines examined presented a marked difference in the degradation of extracellular nucleotides, when compared as a group to primary astrocytes, mainly with respect to an extremely low ATP metabolizing activity. The amount of Pi produced from ATP by gliomas was 0-6 nmol/min/mg (Table 1). The mean ratio of ATP to ADP hydrolysis was 8:1 for astrocytes and 0.5:1 for gliomas.

The other striking difference observed was in the degradation of AMP. While astrocytes accumulated more than 50% of the degradation product as AMP at 3 h, this nucleotide did not accumulate in glioma cell lines U138 and U251, representing less than 5% in the U87 and C6 cell lines at 3h. This difference can also be seen in the AMP degradation rate, much higher in the U138, U87 and U373 glioma cell lines, when compared to astrocytes, U251 and C6 cells (Table 1). However, due to the extremely low degradation rate of ATP in U251 and C6 cells, even with the low degradation of AMP, this nucleotide does not accumulate.

Among the non-phosphorylated degradation products, normal astrocyte cultures produced twice as much inosine and hypoxanthine (14 and 15% respectively) when compared to adenosine (7%). U138, U87 and C6 glioma cell lines had almost undetectable levels of adenosine, producing inosine as the main non-phosphorylated degradation product (Figure 1).

3.2. Substrate specificity of ecto-ATPDase in glioma cell lines and astrocytes.

The degradation rate of other tri- and diphosphonucleosides (CTP, GTP, ITP, UTP, CDP, GDP, IDP, UDP) was similar among three glioma cell lines examined, and were similar to the degradation rate of the adenine nucleotides in these cell lines. As for ATP and ADP, in astrocytes the specific activities for all tri- and diphosphonucleosides are much higher when compared to the glioma cell lines. Furthermore, all nucleoside-5'-diphosphates were hydrolyzed by glioma cell lines with higher catalytic activity than nucleoside-5'-triphosphates (Figure 2). In contrast, astrocytes degraded all tri-phosphate nucleosides faster than di-phosphate nucleosides.

3.4. LDH activity

Internal nucleotidase release and consequent activity had no significant participation in our nucleotidase measurements, since LDH assays showed a cell lysis of 4-6%, and did not change over the incubation time with ATP, ADP or AMP (data not shown).

4. Discussion

Extracellular nucleotides are important messengers both in physiological as well as in pathological conditions. ATP is liberated together with several neurotransmitters and lysis of injured cells allows intracellular ATP to leak into the extracellular medium, mediating several inflammatory responses, such as astrogliosis in the central nervous system [22]. ATP can be degraded to ADP, AMP and finally to adenosine, which is taken up by the cell. Adenosine has strong neuroprotective effects, contrasting with the stimulatory or even cytotoxic effect of ATP [1,36,37]. The regulation of the degradation

cascade from ATP to adenosine is therefore fundamental for the regulation of extracellular nucleotides and the effect that these molecules have on cells.

The growth of a glioma tumor induces liberation of glutamate causing necrosis of neighboring healthy tissue [38,39], injured or necrotic CNS tissue is known to liberate nucleotides [22]. Additionally, astrocytoma cells in culture have been shown to liberate ATP and UTP, which could be an additional source of these nucleotides [40]. Our results show that glioma cell lines present an extremely decreased capacity to hydrolyze all tri- and di-phosphate nucleosides (Figure 2). Therefore, glioma tumors and their interfaces with healthy tissue are likely sites of high concentration of extracellular nucleotides.

What is the fate of these nucleotides? The data presented here indicated that in the case of gliomas, the extracellular ATP and ADP will experience an extremely low degradation rate, two orders of magnitude lower for ATP, and one order of magnitude lower for ADP, when compared to normal astrocytes. The fact that these results were found in four independently isolated human glioma cell lines and one rat cell line, that are representative models of extremely aggressive cancer cells [41,42], strongly suggests that this is a feature shared by several gliomas. This may indicate that the presence of ATP is a positive factor for one or more characteristics that are important for the abnormal growth and survival of these cells, which include proliferation, survival (blockage of apoptosis), angiogenesis and invasion. Among these features, ATP was described to induce proliferation of these glioma cell lines [27,43].

The product of 5'-nucleotidase is adenosine that has neuroprotector properties and can also induce angiogenesis [19] and proliferation [43]. The source of AMP at the gliomas, in light of the low degradation rates of ATP and ADP, is dubious, although in glucose deprivation condition, as in the case of fast-growing tumors, the intracellular concentration

of AMP can rise [44] and cellular lysis under these conditions would liberate a substantial amount of this nucleotide. Additionally, in the glioma tissue interface, the high degradation of ATP and ADP by normal astrocytes (Figure 1 and Table 1) can be the source of AMP. In those conditions, a high degradation rate of AMP may represent an important step for the production of adenosine and inosine. A recent report has shown that the effect of adenosine on chemical-induced ischemia on C6 gliomas was protective only if adenosine were transformed to inosine, suggesting that the accumulation of this nucleoside, rather than adenosine, assures protection against ischemia of the gliomas [45]. Accordingly, all glioma cell lines examined showed the presence of inosine rather than adenosine as the major non-phosphorylated degradation product (Figure 1).

In our hands, C6 gliomas, a cell line that was originated from N-nitrosomethylurea treated rats [46], exhibited almost undetectable ATP- and ADP-degrading activity, when measured with the Pi production method for 30 min. There was also a report showing that these cells degrade extracellular ATP and ADP [47], as we could also observe with HPLC analysis. This discrepancy may be due to the presence of phosphodiesterase in this cells that release PPi instead of Pi [47].

Extracellular nucleotides can be hydrolyzed by a group of enzymes located on the cell surface, the ectonucleotidases (named NTPDases 1-6) [2,10]. These enzymes are clearly distinguished from intracellular ATPases and among the several characteristics in common, they hydrolyze a wide range of purine and pyrimidine nucleosides tri- and diphosphates [4]. The low LDH activity and the ability of the cells to degrade not only ATP but also all purine and pyrimidine nucleosides, indicate the cell integrity and that the ATP-degrading activity is not due to intracellular ATPases. Our results suggest that astrocyte and glioma cells express one or more NTPDases hydrolyzing both 5'-tri and di-phosphate

nucleosides (Figures 1 and 2, and Table 1). However, the results shown here do not allow the identification of which members of the NTPDase family are expressed by astrocytes and glioma cell lines.

Recently, it was shown that another kind of tumor, cancerous human pancreas, presents a decreased expression of NTPDase 1 when compared with normal tissue [12]. Consequently, these authors observed a diminished E-ATPDase activity in the newly formed regions of cancerous tissue, proposing that this could contribute with the process of malignant transformation. Therefore, the origin of the variations observed in nucleotides hydrolysis in glioma cells lines could be due to a different expression pattern or decreased expression of the NTPDase(s) in comparison with the normal astrocytes. However, whether or not the altered nucleotides hydrolysis pattern is the cause or consequence of malignant transformation is open for investigation.

Here we described a striking difference in the extracellular nucleotide degradation rates between glioma cell lines and normal astrocyte cultures. Considering the similarity among four human glioma cell lines and one rat cell line examined, we hypothesized that changes in the ATP degradation could be a characteristic of this kind of tumor and possibly represent an important mechanism to facilitate high proliferation and invasion as well as low death of these cells. Further studies are underway in our laboratory to identify which NTPDases are expressed by astrocytes and glioma cell lines and the prognostic value of these enzymes for new approaches in therapy of brain tumors.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. C. Gottfried and J. Karl for astrocyte cultures, Dr. A. G. Trentin for C6 gliomas and Dr. A. B. Rocha for assistance with glioma cell lines. We thank Dr. S. C. Robson for discussing this manuscript. Marcia R. Wink was recipient of a Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil) fellowship. This work was supported by the Brazilian funding agencies: CNPq, PROPESQ-UFRGS, FAPERGS.

References

- [1] V. Ralevic, G. Burnstock, Receptors for purines and pyrimidines, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 413-492.
- [2] H. Zimmermann, Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system, *Prog. Neurobiol.* 49 (1996) 589-618.
- [3] A.M.O. Battastini, J.B.T. Rocha, C.K. Barcellos, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats, *Neurochem. Res.* 16 (1991) 1303-1310.
- [4] L. Plesner, Ecto-ATPases: identities and functions, *Int. Rev. Cytol.* 158 (1995) 141-214.
- [5] B. Kegel, N. Braun, P. Heine, C.R. Maliszewski, H. Zimmermann, An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain, *Neuropharmacology* 36 (1997) 1189-1200.
- [6] T.F. Wang, P.A. Rosemberg, G. Guidotti, Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene, *Mol. Brain Res.* 47 (1997) 295-302.
- [7] T.M. Smith, T.L. Kirley, Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases, *Biochim. Biophys. Acta* 1386 (1998) 65-78.

- [8] H. Zimmermann, 5'-Nucleotidase-molecular structure and functional aspects, *Biochem. J.* 285 (1992) 345-365.
- [9] H. Zimmermann, Two novel families of ecto-nucleotidases: molecular structures catalytic properties, and a search for function, *Trends Pharm. Sci.* 20 (1999) 231-236.
- [10] H. Zimmermann, Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature, *Drug Dev. Res.* 52 (2001) 44-56.
- [11] K.N. Dzhandzhugazyan, A.F. Kirkin, P.T. Straten, J. Zeuthen, Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas, *FEBS Letters* 430 (1998) 227-230.
- [12] A. Kittel, M. Garrido, G. vargas, Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas, *J. Histochem. Cytochem.* 50 (2002) 549-555.
- [13] J. Dornand, J.C. Bonnafous, J. Favero, J.C. Mani, Ecto-5'nucleotidase and adenosine deaminase activities of lymphoid cells, *Biochem. Med.* 28 (1982) 144-156.
- [14] M. Camici, M.G. Tozzi, S. Allegrini, A. Del Corso, O. Sanfilippo, M.G. Daidone, C. De Marco, P.L. Ipata, Purine salvage enzyme activities in normal and neoplastic human tissues, *Cancer Biochem. Biophys.* 11 (1990) 201-209.
- [15] I. Durak, A.C. Isik, O. Canbolat, O. Akyol, M. Kavutcu, Adenosine deaminase, 5' nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human laryngeal tissues, *Free Radic. Biol. Med.* 15 (1993) 681-684.
- [16] I. Durak, H. Perk, M. Kavutcu, O. Canbolat, O. Akyol, Y. Beduk, Adenosine deaminase, 5'nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues, *Free Radic. Biol. Med.* 16 (1994) 825-831.

- [17] O. Canbolat, I. Durak, R. Cetin, M. Kavutcu, S. Demirci, S. Ozturk, Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues, *Breast Cancer Res. Treat.* 37 (1996) 189-93.
- [18] P. Ujhazy, E.S. Berleth, J.M. Pietkiewicz, H. Kitano, J.R. Skaar, M.J. Ehrke, E. Mihich, Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance, *Int. J. Cancer* 68 (1996) 493-500.
- [19] J. Spychala, Tumor-promoting functions of adenosine, *Pharmacol. Ther.* 87 (2000) 161-173.
- [20] G. James, A.M. Butt, P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca²⁺ signalling in glial cell pathology in the central nervous system, *Eur. J. Pharmacol.* 447 (2002) 247-260.
- [21] A. Araque, V. Parpura, R.P. Sanzgiri, P.G. Haydon, Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner, *Trends Neurosci.* 22 (1999) 208–215.
- [22] J.T. Neary, M.P. Rathbone, F. Cattabeni, M.P. Abbracchio, G. Burnstock, Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells, *Trends Neurosci.* 19 (1996) 13-18.
- [23] J.T. Rutka, S. Ivanchuk, S. Mondal, M. Taylor, K. Sakai, P. Dirks, P. Jun, S. Jung, L.E. Becker, C. Ackerley, Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells, *Int. J. Devl. Neurosci.* 17 (1999) 503-515.
- [24] J.G. Cairncross, in: *Astrocytes* (Federoff, S. and Vernadakis, A., Eds.) Cell Biology and Pathology of Astrocytes, Academic Press Inc., Orlando, 1986, pp. 337-356.
- [25] N.G. Avgeropoulos, T.T. Batchelor, New treatment strategies for malignant gliomas, *The Oncologist* 4 (1999) 209-224.

- [26] G. Lenz, C. Gottfried, Z. Luo, J. Avruch, R. Rodnight, W.J. Nie, Y. Kang, T.J. Neary, P(2Y) purinoceptor subtypes recruit different mek activators in astrocytes, *Br. J. Pharmacol.* 129 (2000) 927-936.
- [27] M.P. Rathbone, P.J. Middlemiss, J.K. Kim, J.W. Gysbers, S.P. DeForge, R.W. Smith, D.W. Hughes, Adenosine and its nucleotides stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells, *Neurosc. Res.* 13 (1992) 1-17.
- [28] M.A. Komoszynski, A. Wojtczak, Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases, *B. B. acta* 1310 (1996) 233-241.
- [29] C. Gottfried, L. Valentim, C. Salbego, J. Karl, S.T. Wofchuk, R. Rodnight, Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27), *Brain Res.* 833 (1999) 142-149.
- [30] A.B. Rocha, D.R.A. Mans, G. Lenz, A.K. Fernandes, C. Lima, V.F. Monteiro, D. Gonçalves, J.C.F. Moreira, A.L. Brunetto, R. Rodnight, G. Schwartzmann, Protein kinase C-mediated in vitro invasion of human glioma cells through extracellular-signal-regulated kinase and ornithine decarboxylase, *Pathobiol.* 68 (2000) 113-123.
- [31] K. M. Chan, D. Delfert, K. D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375-380.
- [32] W. Voelter, K. Zech, P. Arnold, G. Ludwig, Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography, *J. Chromat.* 199 (1980) 345-354.
- [33] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.

- [34] S.B. Meroni, D.F. Cánepa, E.H. Pellizari, H.F. Schteingart, S.B. Cigorraga, Effects of purinergic agonists on aromatase and gamma-glutamyl transpeptidase activities and on transferrin secretion in cultured Sertoli cells, *J. Endocrinol.* 157 (1998), 275
- [35] K.M. Lai, C.L. Wong, Metabolism of extracellular adenine nucleotides by cultured rat brain astrocytes, *J. Neurochem.* 57 (1991) 1510-1515.
- [36] A. Reshef, O. Sperling, E. Zoref-Shani, The adenosine-induced mechanism for the acquisition of ischemic tolerance in primary rat neuronal cultures, *Pharmacol. Ther.* 87 (2000) 151–159.
- [37] F. Di Virgilio, Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP, *J. Autonomic Nervous System.* 81 (2000) 59–63.
- [38] Z. Ye, J.D. Rothstein, H. Sontheimer, Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange, *J. Neurosci.* 19 (1999) 10767–10777.
- [39] T. Takano, J.C. Lin, G. Arcuino, Q. Gao, J. Yang, M. Nedergaard, Glutamate release promotes growth of malignant gliomas, *Nature Med.* 7 (2001) 1010-1015.
- [40] T.K. Harden, E.R. Lazarowski, Release of ATP and UTP from astrocytoma cells, *Prog. Brain Res.* 120 (1999) 135-143.
- [41] J.R.W. Masters, Human cancer cell lines: fact and fantasy, *Nature Rev. Molec. Cell Biol.* 1 (2000) 233-236.
- [42] B. Grobden, P.P. De Deyn, H. Slegers, Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, *Cell Tissue Res.* 310 (2002) 257-270.

- [43] F.B. Morrone, M.C. Jacques-Silva, A.P. Horn, A. Bernardi, G. Schwartzmann, R. Rodnighi, G. Lenz, Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines, *J. Neuro-oncology*. (2003) In press.
- [44] J. Folbergrova, Q. Zhao, K. Katsura, B.K. Siesjo, N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 5057-5061.
- [45] T. Imura, S. Shimohama, Opposing effects of adenosine on the survival of glial cells exposed to chemical ischemia, *J. Neurosci. Res.* 62 (2000) 539-546.
- [46] P. Benda, J. Lightbody, G. Sato, L. Levine, W.P. Sweet, Differentiated rat glial cell strain in tissue culture, *Science* 161 (1968) 370-371.
- [47] B. Grobбен, K. Anciaux, D. Roymans, C. Stefan, M. Bollen, E.L. Esmans, H. Slegers, An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma, *J. Neurochem.* 72 (1999) 826-834.

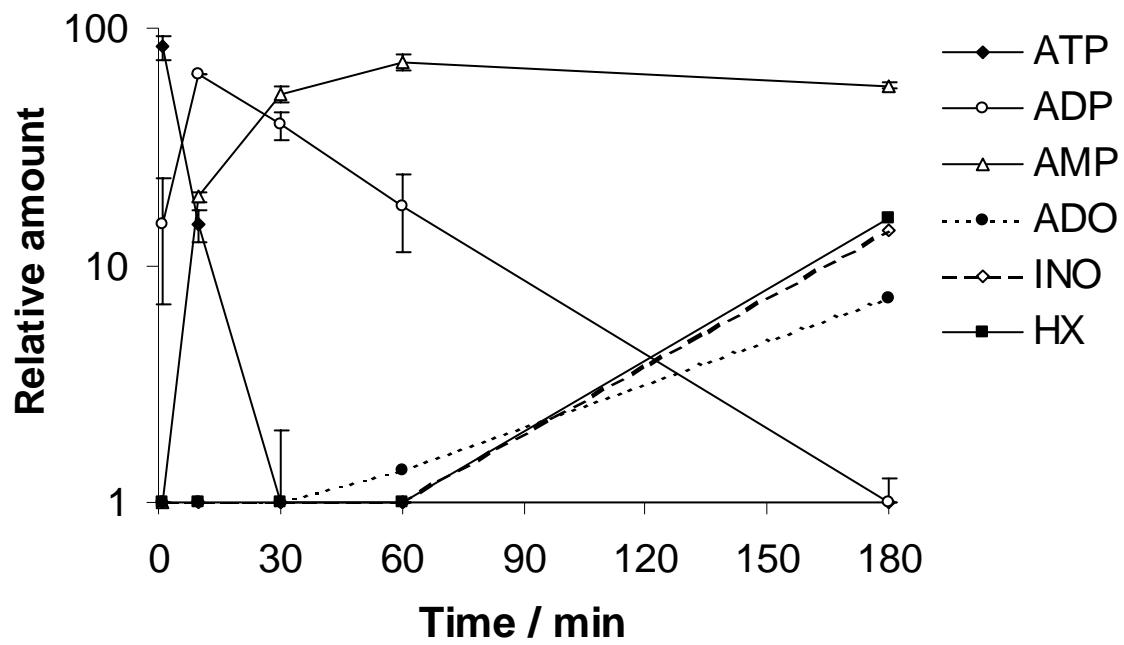
Legends

Figure 1. Metabolism of extracellular ATP by primary astrocyte cultures and glioma cell lines. Astrocytes (A) and glioma cell lines C6 (B), U138 (C), U251 (D) and U87 (E) in 24 well plates were incubated with 100 μ M of ATP in 200 μ l of incubation medium as described in material and methods. An aliquot of the supernatant was withdrawn at 0, 10, 30, 60 and 180 min and the presence of ATP, ADP, AMP, adenosine (ADO), inosine (INO) and hypoxanthine (HX) were determined after separation by HPLC. Data are mean \pm SE (bars) values from two experiments in triplicates.

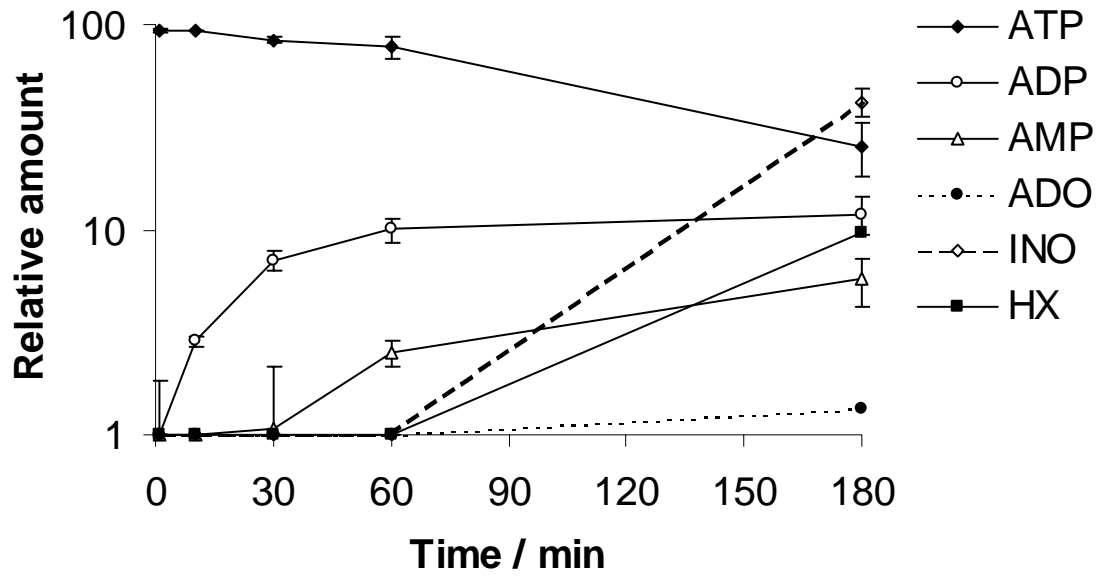
Figure 2. Substrate specificity of ecto-ATPDase in glioma cell lines and astrocytes. Ecto-nucleotidase activity of glioma cell lines and astrocytes with different nucleosides tri- or di-phosphate was determined as described to ecto-nucleotidases assay under Material and Methods. The activities were determined in at least three independent experiments, in triplicates. Specific activity values are expressed as nmol Pi/min/mg protein.

Figures

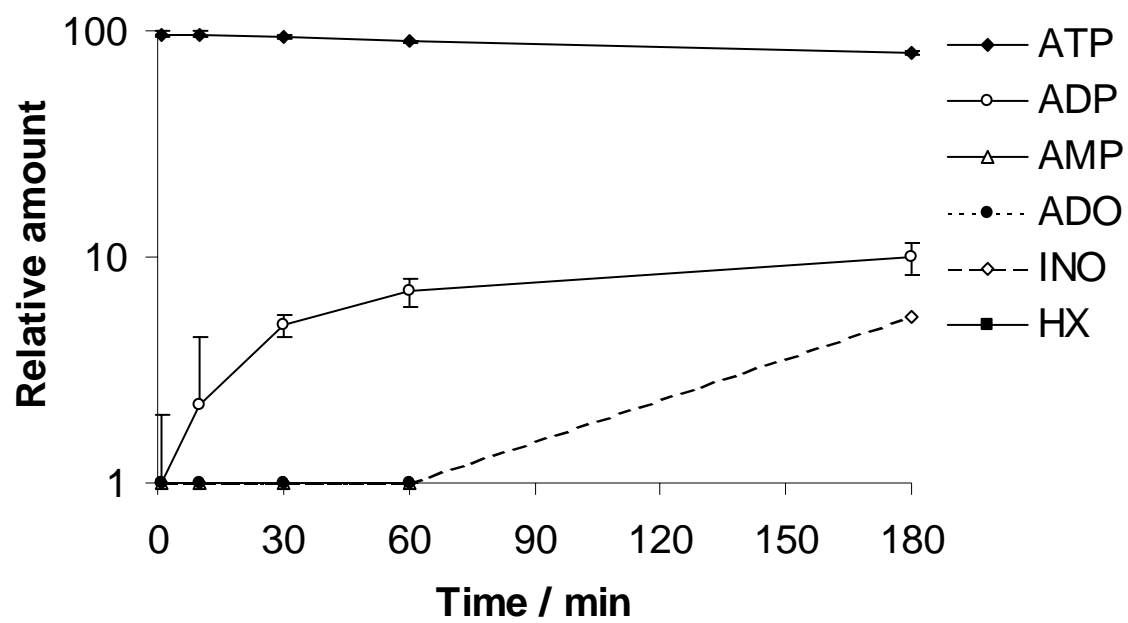
1.A (Astrocytes)



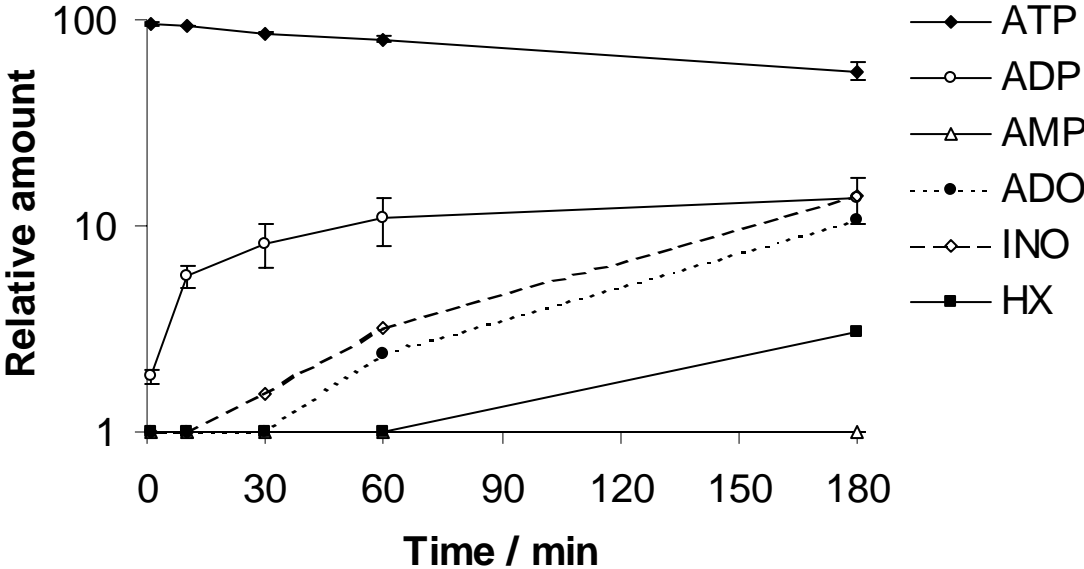
1.B (C6)



1.C (U138)



1.D (U251)



1.E (U87)

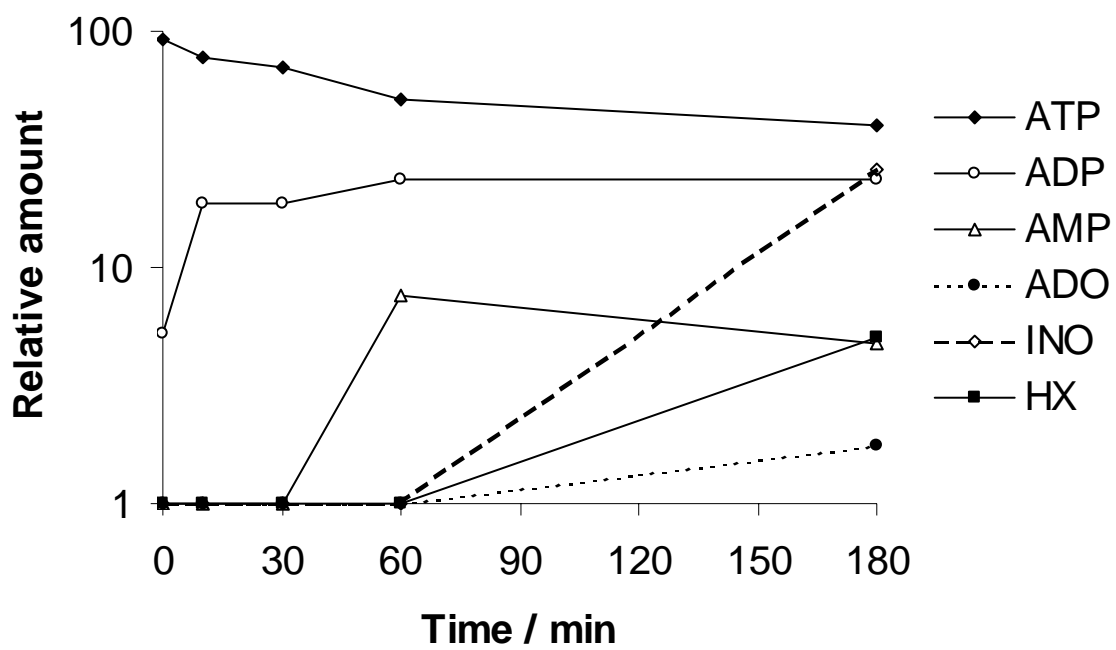


Figure 2

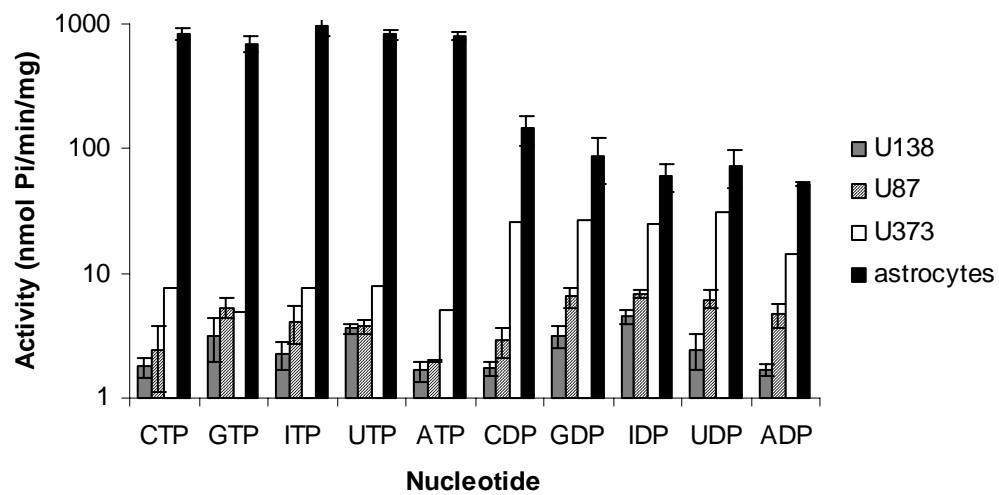


Table 1. Nucleotide hydrolysis in astrocytes and glioma cell lines

Cell	ATP	ADP	AMP
U87	6 ± 0.7	14 ± 1.3	169 ± 15
U138	5 ± 1.4	4.3 ± 1	109 ± 20
U373	4 ± 0.5	11 ± 1.9	67 ± 9
U251	3.4 ± 0.2	9.3 ± 1.7	11 ± 0.9
C6	ND	ND	9 ± 1.6
Astrocytes	873 ± 34	107 ± 15	14 ± 4

ATP, ADP and AMP hydrolysis were measured in human glioma cell lines (U251, U373, U138, U87), in a rat glioma cell line (C6) and in primary astrocytes from rat. Ecto-nucleotidase activities of intact cells were determined at 37°C with 1 mM ATP or ADP for gliomas and 3 mM ATP or ADP for astrocytes. For ecto-5'-nucleotidase activity measurements, MgCl₂ was used instead of CaCl₂ and 1mM of AMP was used for astrocytes and 2 mM for gliomas. The activities were determined in at least four independent experiments, in triplicates. Mean values ± S.E. are expressed in specific activity (nmol of Pi liberated /min/mg of protein).

ND – not detected

3.3 Capítulo 3

**Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2
(CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed
by astrocytes.**

Paper a ser submetido ao Journal of Neurochemistry

**(Esse paper foi produzido durante o “doutorado-sanduiche” no Beth Israel
Hospital - Harvard Medical Scholl, sob orientação do Dr. Simon C. Robson.)**

Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 (CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by astrocytes.

Márcia R. Wink^{1,2}, Elizandra Braganhol¹, Alessandra S. K. Tamajusuku¹, Eva Csizmadia², Luiz F. Zerbini³, Joao J. F. Sarkis¹, Ana M. O. Battastini^{1*} and Simon C. Robson^{2*}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Medicine and ³BIDMC Genomics Center and New England Baptist Bone and Joint Institute, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215, USA

* Corresponding authors: Dr. Simon C. Robson

Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center,
Harvard Medical School
99 Brookline Ave.
Boston, Massachusetts 02215, USA
Tel. (617) 632-0881
FAX (617) 632-0880
E-mail: srobson@caregroup.harvard.edu

and

Dr. A.M.O. Battastini
Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS
Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo
CEP 90035-003
Porto Alegre, RS, BRASIL
FAX +55 51 3316 5535

e-mail: batas@terra.com.br

Abstract

Extracellular nucleotides have been implicated in diverse pathophysiological processes within the nervous system. Astrocytes are the major source of extracellular adenine-based nucleotides in the brain and are in turn an important target for the actions of nucleotides mediated via type-2 purinergic receptors (P_2). The actions induced by purinergic signaling are regulated by ecto-nucleotidases, including members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (E-NTPDase family), that hydrolyze extracellular nucleotides. Intact rat astrocytes cultured from different brain regions were able to rapidly convert extracellular ATP to ADP, that was in turn hydrolyzed to AMP. Tri-phosphonucleosides were hydrolyzed preferentially over di- and mono-phosphonucleosides; kinetics analyses suggest that several ecto-enzymes are involved in this cascade. Preliminary mRNA analysis by PCR indicated that astrocytes express multiple NTPDase family members (NTPDase1 to NTPDase3 and NTPDase5/6). By quantitative real-time PCR, we identified NTPDase2 (CD39L1) as a predominant NTPDase expressed by astrocytes from hippocampus, cortex and cerebellum. These data in combination with the elevated ecto-ATPase activity observed in these brain regions, suggest that NTPDase2 is the major astrocyte-associated ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase.

Keywords: ATP, ecto-ATPase, E-NTPDase family, NTPDase 2, CD39L1, astrocytes.

Introduction

Astrocytes are the dominant glial cell population in the brain. Traditionally astrocytes were thought to provide structural and trophic support to neurons. However, astrocytes may be an integral component of the signaling process in the nervous system. These cells have the capacity to modulate the pericellular environment around neurons, release neuronal growth factors, control the production of synapses and maintain the cellular barrier between blood and brain (Araque et al., 1999; Kast, 2001; Haydon, 2001; Svendsen, 2002). Adult astrocytes from hippocampus are also capable of regulating neurogenesis by directing the stem cells to become neurons (Song, 2002).

Nucleotides, an ubiquitous class of intracellular signaling molecules, may also regulate pathophysiological functions in the extracellular environment. Extracellular ATP is recognized as an agonist that mediates a wide variety of biological responses in the central and peripheral nervous systems, largely by binding to either G protein-coupled P2Y or ligand-gated P2X receptors (Ralevic and Burnstock, 1998). Amongst cerebral cells, astrocytes appear to be the main source of extracellular adenine-based nucleotides and an important target for the actions of nucleotides (Rathbone, et al., 1999; Ciccarelli et al., 2001). Studies have been shown that extracellular ATP promotes association between neurons and glial cells and is directly involved in astrocytic calcium wave propagation (Scemes et al., 2000). In cultured astrocytes, ATP induces long-term trophic effects including their morphological differentiation and proliferation (Neary et al., 1996).

There are important mechanisms that control external concentration of nucleotides and hence regulate P2- mediated effects. Functions induced by extracellular

adenine nucleotides are controlled by the action of ectonucleotidases (NTPDases and ecto-5'nucleotidase) that constitute a highly organized enzymatic cascade for the regulation of nucleotide-mediated signaling, controlling the rate, amount and timing of nucleotide (e.g. ATP) degradation and ultimately nucleoside (e.g. adenosine) formation (Zimmermann, 1996).

Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases), previously classified as E-type ATPases, are a class of ecto-enzymes characterized by capacity to hydrolyze nucleoside tri- and diphosphates, strict dependence upon divalent cations and insensitivity to the classical inhibitors of the P-, F-, and V-type ATPases (Plesner, 1995). In mammals, at least six related and homologous enzymes that hydrolyze tri- and diphosphonucleosides (named NTPDase1 to 6) with different specificity and specific activities, have been cloned and characterized (Zimmermann, 2001). Three related family members NTPDase1 to NTPDase3 are expressed on the cell surface and share a common membrane topography with N- and C-terminal transmembrane domains. These enzymes differ regarding their preferences for nucleotides. For example, E-NTPDase1 (CD39, ecto-apyrase or ecto-ATPdiphosphohydrolase) hydrolyses nucleoside tri- and diphosphates equally well; E-NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) hydrolyses nucleoside diphosphates only to a marginal extent with a 30-fold preference for ATP over ADP whereas E-NTPDase3 (CD39L3, HB6) has a threefold preference for nucleoside triphosphates over diphosphates (Zimmermann, 2001). NTPDase5 (CD39L4) and NTPDase6 (CD39L2) are more closely related to the plant and invertebrate proteins and present higher amino acid homology to one another than with the other NTPDase members (Chadwick and Frischauf, 1998). These latter NTPDases lack the C-terminal

transmembrane domain and are expressed as secreted enzymes with specificity for the hydrolysis of nucleoside diphosphates (Hicks-Berger et al., 2000; Yeung et al., 2000; Braun et al., 2000; Mulero et al., 1999; Mulero et al., 2000).

Although, several studies have been shown the presence of the NTPDases in the nervous system, the cellular distribution, expression pattern and physiological role remain unclear. Several studies suggest the expression of multiple ectonucleotidases in the mammalian brain. In microglia and vasculature the NTPDase 1 is the major ectonucleotidase (Braun et al., 2000), in neurons an apyrase-like enzyme has been characterized (Boecker et al., 2002) and multiple ectonucleotidase expression has been described in PC12 cells (Vollmayer et al., 2001). Intact cultured astrocytes were able to convert extracellular ATP to ADP via ectonucleotidase pathway (Lai and Wong, 1991; Wink et al., 2003a). However, which members of the NTPDase family are expressed remains undetermined.

In order to further identify the ectonucleotidases associated with astrocytes and elucidate an understanding of the control of nucleotide levels in the brain, we have identified the NTPDase family members that are expressed in astrocytes and elucidated the kinetics of nucleotide hydrolysis by these cells.

Materials and methods

Cell culture

Primary astrocyte cultures were prepared exactly, as previously described (Pinto et al., 2000; Wink et al., 2003a; Wink et al., 2003b). Briefly, hippocampus, cortex and cerebellum of newborn Wistar rats (1-2 days old) were removed, and dissociated mechanically. The cells were plated at a density of 1.5×10^5 cells/cm² in DMEM plus 10% fetal calf serum onto 24 multiwell plates pre-treated with poly-L-lysine. Cultures were maintained for 21-28 days in vitro.

NTPDase activity assay and inhibitor studies

To determine the 5'-tri and di-phosphate nucleoside activities, 24-well microplates containing astrocytes cells were incubated for 5 minutes, as described (Wink et al., 2003a; Wink et al., 2003b) in the incubation medium, containing (final concentration) 2 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4 and 3 mM of nucleotides ATP, GTP, CTP, ITP, ADP, GDP, CDP and IDP at 37°C. The release of inorganic phosphate (Pi) was measured by the malachite green method (Chan et al., 1986).

To test classical ATPase and P2 receptors inhibitors, cells were preincubated for 30 min in the presence or absence of sodium azide (1, 5 and 20 mM), oligomycin (2 µ/ml), ouabain (1 mM), ortho-vanadate (0.1 mM), levamisole (1 mM), lanthanum (0.1 mM), N-ethylmaleimide (NEM) (1 mM), diethyl pyrocarbonate (DEPC) (1 mM), suramin (0.1 and 0.3 mM) and evans blue (0.1 mM). Then the cells were incubated for 5 min in the incubation medium with 3 mM ATP and ADP as described above.

All samples were then performed in triplicate. Specific activity was then expressed as nmol Pi released/mg of protein/min. Protein measurements were determined by the Comassie blue method, using bovine serum albumin (BSA) as standard (Bradford, 1976).

Phosphatase assays

The pyrophosphatase and alkaline phosphatase activities were determined as described above, except that ATP was replaced by 1 mM of inorganic pyrophosphate (PPi) or p-nitrophenyl phosphate (pNPP), respectively. The ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity was determined as described (Bruno et al., 2002) using 1 mM of p-nitrophenyl-5'-thymidine-monophosphate (p-nitrophenyl-TMP) as a substrate.

Nucleotides hydrolysis analysis using HPLC

The cells were incubated the same way as described above, except that the substrate was 100 μ M ATP or ADP. To stop the reaction, an aliquot of the incubation medium was transferred to an Eppendorf tube on ice and centrifuged at 4°C for 30 min at 16,000 g. Aliquots of 40 μ l were applied to a reverse phase HPLC system using a C18 Shimadzu column (Shimadzu, Japan) with absorbance measured at 260 nm. The mobile phase was 60 mM KH_2PO_4 , 5 mM tetrabutylammonium chloride, pH 6.0, in 30% methanol as described (Voelter et al., 1980). Retention times were assessed using standard samples of nucleotides. The non-enzymatic hydrolysis of the nucleotides were consistently less than 5% and cells incubated without the addition of nucleotides did not present any detectable peak.

RT-PCR analysis

Total RNA from rat astrocytes cultured until confluence was isolated with RNeasy Mini Kit reagents (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA species were synthesized with SuperScript II (Life Technologies) from 5 µg of total RNA in a total volume of 20 µl with both, oligo (dT) primer and random hexamers in accordance with the manufacturer's instructions. 0,5 µl of the RT reaction mix was used as a template for PCR in a total volume of 20 µl using a concentration of 0.5 µM of each primer indicated below and 0.5 units of Ex Taq DNA polymerase (Takara BIO INC, Japan). The annealing temperature was 60°C. The PCR was run for 35 cycles and the cycling conditions were as follows: 1 min at 95 °C, 1 min at 94 °C, 1 min at the annealing temperatures, 1 min at 72 °C and a final 10 min extension at 72°C. 10µl of the PCR reaction was analyzed on a 1.3% agarose gel. The following set of primers were used (Vollmayer et al, 2001): CD39: upper 5`-GATCATCACTGGGCAGGAGGAAGG-3` and lower 5`-AAGACACCGTTGAAGGCACACTGG -3`; CD39L1: upper 5`-GCTGGGTGGG CCGGTGGATACG -3` and lower 5`-ATTGAAGGCCCGGGACGCTGAC -3`; CD39L2: upper 5`-GAATTCCTTGTCGGGGATGACTGTGTT-3` and lower 5`-ATCTGAGTGGATCCTCCGCCCAA-3`; CD39L3: upper 5`-CGGGATCCTTGCTGTGCGTGGCATT-3` and lower: 5`-TCTTTCTAGAGGTGCTCTGGCAGGAATCAGT -3`; CD39L4: upper 5`-GGGATCCTTTGAGATGTTTAACAGCACT-3` and lower: 5`-GAATTCTTGGTTACCACCATACTGGTA-3`. Oligonucleotides were obtained from Invitrogen, Life Technologies. Negative controls were performed with templates substituted by DNase, RNase free distilled water (Gibco) for each PCR reaction.

Plasmids with cDNA sequences for rat CD39L1, and human CD39, CD39L2, CD39L3 and CD39L4 were diluted 100 times and used as a positive control.

Real time PCR

Total RNA and cDNA were generated as described in RT-PCR analysis. SYBR Green I-based real-time PCR was carried out on MJ Research DNA Engine Opticon™ Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research Inc., Waltham, MA). All PCR mixtures contained: PCR buffer (final concentration 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, and 0.1% Triton X-100), 250 μM deoxy-NTP (Roche), 0.5μM of each PCR primer, 0.5X SYBR Green I (Molecular Probes), 5% DMSO, and 1U taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI) with 2μl cDNA in a 25μl final volume reaction mix. The samples were loaded into wells of Low Profile 96-well microplates. After an initial denaturation step of 1 min at 94°C, conditions for cycling were 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 56°C, 1 min at 72°C. The fluorescence signal was measured right after incubation for 5 sec at 79°C following the extension step, which eliminates possible primer dimer detection. At the end of the PCR cycles, a melting curve was generated to identify specificity of the PCR product. For each run, serial dilutions of human GAPDH plasmids were used as standards for quantitative measurement of the amount of amplified DNA. Also, for normalization of each sample, hGAPDH primers were used to measure the amount of hGAPDH cDNA. All samples were run in triplicates and the data were presented as ratio of enzymes/GAPDH. The primers used for real time PCR are described in RT-PCR analysis.

Immunocytochemistry

Confluent hippocampal astrocyte cultures were fixed in 75% acetone/0.5% buffered formaline for 3 min and washed with cold PBS. Non-specific binding sites were blocked for 30 min with 7% normal goat serum/PBS and exposed overnight at 4°C to primary polyclonal antibodies: BZ3-4f, anti-rat CD39L1 (NTPDase2) (Sevigny et al., 2002) (1:1000); anti-human L3 (NTPDase 3 or HB6) (Smith and Kirley, 1998) (1:1000); anti-human CD39L2 (NTPDase 6) (1:1000) and CD39L4 (NTPDase 5) (1:1000) generated by peptide immunization of rabbits with: PEP002A TRAAPGARWGQQAHAH (Yeung et al., 2000) and 246-A2 N-terminus 19aa (Mulero et al., 2000), respectively (prepared by Hyseq, Sunnyvale CA); and anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Sigma) (1:500) as a marker for astrocytes. After three washes with PBS, cells were treated with 0.15% hydrogen peroxidase (Sigma) to inactivate endogenous peroxidase and then incubated with biotinylated secondary anti-rabbit IgG (2ug/ml) (ABC, Vector lab, Burlingame, CA) for one hour at room temperature. Following the incubation with avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC, DAKO, Denmark), the staining was visualized by reacting with 3,3 -diaminobenzidine tetrahydrochloriden (DAB) and hydrogen peroxide using a DAB reagent set (Vector lab, Burlingame, CA).

RESULTS

Hydrolysis of ATP and ADP by astrocytes

Membrane-bound NTPDase activities were determined in hippocampal rat astrocytes by measuring the hydrolysis of extracellular nucleotides and by product formation by HPLC. Cells cultured in 24 well plates were washed and incubated with 100 μ M of ATP or ADP.

Samples were withdrawn in 0, 10, 30, 60 and 180 min and levels of nucleotides were determined. Intact astrocytes rapidly hydrolyzed extracellular ATP with formation of free ADP, which was subsequently hydrolyzed to AMP (Fig. 1A). Within 10 min, virtually all ATP was metabolized with an accumulation of 60% of ADP (Fig.1A). When ADP was used as substrate, the pattern for AMP formation was similar with that obtained from ATP metabolism. The ADP was hydrolyzed in the next 60 min with production of AMP (Fig. 1B). The complete formation of nucleosides following AMP hydrolysis in astrocytes has been demonstrated (Wink et al., 2003a). The primary product pattern obtained with ATP hydrolysis suggests hydrolysis by a very active ecto-ATPase (Heine et al., 1999).

Substrate specificity of NTPDases in astrocytes

The degradation rate of tri- and diphosphonucleosides (ATP, CTP, GTP, ITP, UTP, ADP, CDP, GDP, IDP and UDP) was determined in rat hippocampal astrocyte cultures by measuring the amount of liberated inorganic phosphate hydrolyzed from exogenous extracellular nucleotides. The triphosphonucleosides were hydrolyzed with similar rate by astrocytes. Among the diphosphonucleosides, the CDP and UDP were the preferred substrates (Table 1).

Astrocytes presented a strong preference for NTPs (nucleoside triphosphate). All triphosphonucleosides were degraded faster than the diphosphonucleosides, with hydrolysis ratios of NTP/NDP varying between 8 and 14 (Table 1).

The ecto-nucleotide pyrophosphatase (E-NPP) activity obtained at alkaline pH using the specific substrate, *p*-nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate (*p*-nitrophenyl-TMP), was negligible when compared with the ATPase activity (Table 1).

The association of an ATP pyrophosphohydrolase (EC 3.6.1.8) and an inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) was excluded as no Pi was released when 1 mM pyrophosphate (PPi) was used as substrate in astrocytes from hippocampus (Table 1), cortex and cerebellum (data not shown).

Effect of inhibitors on ATPase and ADPase activities

The classical ATPases inhibitors of Na⁺, K⁺-ATPase, ouabain and orthovanadate; Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase, NEM and lanthanum; mitochondrial ATPase, oligomycin and sodium azide; and alkaline phosphatase inhibitor, levamisole (Plesner, 1995; Oliveira et al., 1997) were ineffective as inhibitors of ATP hydrolysis by rat hippocampal astrocytes (Table 2). The same chemicals caused a slightly bigger inhibition on ADP hydrolysis when compared with ATP hydrolysis. Similarly, the antagonists of P₂ purinoceptors, suramin and Evans blue that have been used as ectonucleotidase inhibitors, caused a different inhibition on the ATP and ADP hydrolysis.

Evans blue was the most effective inhibitor. At a concentration of 100 μM, it completely abolished the ADPase activity, while the ATPase activity was inhibited by 70%. Suramin did not affect the ADPase activity, but inhibit the ATPase activity by 50%.

Competition kinetics

To investigate if ATP and ADP hydrolysis occurs due to only one active site able to hydrolyze both substrates or by independent catalytic sites, the competition plot described by Chevillard et al. (1993) was performed. To assay the different combination of substrates in the competition plot, we chose a concentration at which the rate of hydrolysis was the same when either ATP or ADP was used as substrate (65 nmol

Pi/mg/min). These concentrations were 0.130 mM for ATP and 2.0 mM for ADP. Then a sequence of mixtures with different concentrations of ATP (0.130 to 0 mM) and ADP (0 to 2 mM) on $P = 0$ and $P = 1$, respectively, was used as substrates in the assay. The pattern of the curve obtained in the competition plot (Fig. 2) shows a concave upward profile indicating the possibility of two independent reactions for the hydrolysis of ATP and ADP.

NTPDase mRNAs expression in astrocytes

The expression of ectonucleotidases responsible for the extracellular hydrolysis of ATP and ADP was examined by PCR in astrocytes obtained from three different brain regions. As ATP and ADP may be metabolized by different members of the recently identified E-NTPDases family (Zimmerman, 2001), we investigated the presence of NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3, NTPDase5 and NTPDase6 in astrocytes. mRNA was isolated from confluent hippocampal, cortical and cerebellar astrocyte cultures and the cDNA was synthesized. Using specific primers, oligonucleotide fragments were amplified and analyzed on agarose gels. Astrocytes from three different brain regions synthesize mRNA for all members of the E-NTPDase family investigated (Fig. 3). The length of the oligonucleotide fragments obtained for the samples was the same obtained for the positive controls and corresponded to expected size.

Quantitative real-time PCR analysis

The expression of NTPDase gene members in hippocampal, cortical and cerebellar rat astrocytes was quantitatively analyzed by real-time PCR analysis. To investigate if the high membrane-bound ATPase activity observed in astrocytes from different brain regions was due to a higher expression of the NTPDase genes with potential to hydrolyze

ATP (NTPDase1, NTPDase2 or NTPDase3), we performed quantitative real-time PCR analysis. Astrocytes from all brain regions investigated showed the NTPDase2 or CD39L1 (ecto-ATPase), as the major NTPDase gene expressed (Fig. 4). This result is in accordance with the elevated ATPase activity observed in these cells with all triphosphonucleosides (Figure 1 and Table 1).

Considering the expression of all members of NTPDase family, the relative amount of NTPDase 2 mRNA was 80% in astrocytes from hippocampus, cortex and cerebellum, while the other four members together represented 20%, with a distinct pattern in each brain region.

Astrocytes from hippocampus are the cells that presented the most elevated expression of NTPDases 2, whereas the astrocytes from cerebellum presented the lowest expression (Fig. 4). These results are in accordance with our previous studies (Wink et al., 2003a).

The closely related members NTPDase 1 and NTPDase 3 were expressed at low levels by astrocytes (4-16% and 0.3-1.4%, respectively), when compared with NTPDase 2. NTPDase 5 and NTPDase 6 genes that are primarily nucleoside diphosphates, were expressed with similar pattern in astrocytes from hippocampus and cortex, whereas astrocytes from cerebellum presented the lowest expression of both enzymes.

Cellular distribution of NTPDases in astrocytes

We performed immunocytochemistry to validate the coexpression and cellular localization of NTPDase members detected by PCR in astrocytes. Cells were fixed with acetone and incubated overnight with polyclonal antibodies for GFAP, NTPDase2, NTPDase3, NTPDase5 and NTPDase6. A widespread strong immunostaining was detected using anti-GFAP antibody, a marker for astrocytes. The anti-NTPDase2

antibodies revealed a broad cellular distribution over the entire surface of the cell. The anti-NTPDase5 and 6 showed an intracellular distribution pattern. The NTPDase5 was distributed in a granular pattern around the nucleus and over the cytoplasm. The NTPDase6 was distributed in the form of fine punctuation in the cytoplasm and the nucleus. No significant immunostaining was observed using anti-NTPDase3 antibodies. The presence of NTPDase1 was not probed because recently it was shown that no reaction was detected with anti-mouse NTPDase1 antibodies in astrocytes (Braun et al., 2000).

Discussion

In brain, astrocytes are the main source of nucleotides and an important target for the actions of this compounds, evidenced by the large number of P₂ receptors expressed on their surface (Neary et al., 1996; Rathbone, et al., 1999; Lenz et al., 2000; Ciccarelli et al., 2001). The effective extracellular concentration of purines is dependent on several factors including metabolism by surface-located enzymes, the ectonucleotidases, and the uptake of nucleosides by cells. Our results demonstrate that astrocytes from hippocampus, cortex and cerebellum express different repertoires of members of the E-NTPDase family. In addition, previously we have shown that astrocytes express mRNA for ecto-5'-nucleotidase and exhibit catalytic activity for AMP (Wink et al., 2003a). This demonstrates that these cells contain all components of the enzymatic cascade, necessary to complete metabolism of extracellular nucleotides to nucleosides.

Astrocytes are able to efficiently hydrolyze all tri-phosphonucleosides. Following ATP hydrolysis there was transient accumulation of ADP, indicating that ATP is not

hydrolyzed directly to AMP. This pattern of product formation is the pattern observed for a rat ecto-ATPase and is contrary to that observed for an ecto-apyrase (Heine et al., 1999).

According, quantitative real-time PCR analysis indicated that astrocytes express NTPDase 2 as a major NTPDase. The levels of mRNA expression for NTPDase 2 are 80% of total amounts for members of E-NTPDase family. Our data suggest that NTPDase 2 is likely the major ectonucleotidase responsible for the ATPase activity in astrocytes. However, the pattern obtained with ADP hydrolysis, when ADP was used as a substrate or following ATP metabolism, does not resemble that pattern obtained for an ecto-ATPase, as the ADP hydrolysis and AMP formation are extremely low (Lai and Wong, 1991; Kegel et al., 1997; Heine et al., 1999). Astrocytes hydrolyzed all di-phosphonucleosides and when incubated in the presence of ADP, the nucleotide was almost completely hydrolyzed within 90 min, with conversion to AMP. The ADP metabolism pattern obtained was similar with that obtained by Heine et al. (1999) when ADP was incubated in the presence of cells transfected with an ecto-apyrase. Nevertheless the profile obtained with ATP metabolism in astrocytes differs from that obtained by these authors when ATP was incubated in the presence of cells transfected with an ecto-ATPase and an ecto-apyrase together. This observation suggests that the enzymatic combination present in astrocytes is not 50% NTPDase 1 /50% NTPDase2. Therefore, it seems that astrocytes hydrolyze ATP mainly by the activity of NTPDase2 (ecto-ATPase) and ADP by other NTPDase or by a set of NTPDases. Several lines of evidence supported this hypothesis: 1) the hydrolysis rate of all di-phosphonucleosides higher than described for NTPDase2 and consequently, the smaller NTP/NDP ratio; 2)

the result obtained with the competition plot (Chevillard et al, 1993), which suggested that ATP and ADP are being hydrolyzed at more than one catalytic site; 3) the expression of the other members of E-NTPDase family with capacity to hydrolyze nucleosides diphosphates, among them NTPDase 5 and NTPDase 6, that exclusively hydrolyze NDPs. Thus, the hydrolyze pattern observed with ADP might be a contribution of the activities of all E-NTPDase members together or by a combination.

The distribution and the physiological role of both purinergic receptors and ectonucleotidase activities vary from specific cell types in the brain. In neurons an apyrase-like enzyme has been localized around the soma and on neurites, with an ATP/ADP ratio between that described for NTPDase 1 and NTPDase 3 (Boeck et al., 2002). In brain vasculature and in microglia surface the NTPDase 1 is the prevalent enzyme (Braun et al., 2000).

The ATP/ADP ratio found in astrocytes is around 10, while for other NTP/NDP varied from 8 to 14. This ratio is similar to that described for a human CD39L1 (Grinthal and Guidotti, 2002) but is lower than that described for a rat ecto-ATPase (Kegel et al., 1997). Probably the presence of a set of NTPDases with potential to hydrolyze NDPs in astrocytes surface is responsible for the lower hydrolysis rate found, when compared with NTPDase2 alone. The enzymatic profile observed with ATP and ADP in astrocytes is very similar to that shown by sarcolemmal membranes from rat heart (Oliveira et al., 1997). Interestingly, the NTPDase2 is highly expressed in brain and heart (Chadwick and Frischauf, 1998).

The distribution of the NTPDase members in astrocytes revealed by immunocytochemistry, showed a distinct pattern. The NTPDase2 was localized on all

cell surfaces, while the NTPDase5 and 6 presented an intracellular localization. No immunolabeling was detected using anti-NTPDase3 antibodies. This was not surprising, considering that the mRNA expression of this member was the lowest (around 0.5%). The presence of NTPDase 1 mRNA in astrocytes is in accordance with data showing the expression of the enzyme by RT-PCR and immunoblotting in these cells in culture (Wang et al., 1997). Nevertheless it is contradictory with the fact that no reaction was found for this member with immunocytochemistry (Braun et al., 2000). This could be explained by the low level of mRNA expression detected by real time PCR, reflecting low levels of protein that could be insufficient for detection with antibodies; or due the high sensitivity of PCR, the mRNA detected could be due a small contamination in the culture by other cell, such as microglia that express NTPDase 1 as the major NTPDase (Braun et al., 2000).

The co- expression of enzymes hydrolyzing either ATP or ATP and ADP in brain (Kegel et al., 1997; Chadwick and Frischauf, 1998; Smith and Kirley, 1998), demonstrates that the extracellular metabolism of nucleotides is regulated by very complex pathways. In C6 gliomas that are used as a model for astrocytes, it seems that the metabolism of extracellular ATP is differently affected by the ATP concentration. When the ATP concentration range used was 1-10 μM , the ATP was mainly degraded by the ecto-nucleotide pyrophosphatase. However when the ATP concentration was increased to 100 μM , the ATP started to be hydrolyzed by an ecto-ATPase activity (Grobber et al., 1999). It is known that under pathological conditions such as seizure, brain trauma, ischemia and hypoxia, that cells are exposed to significantly elevated concentrations of ATP, GTP and adenosine that arise from injured dying cells (Neary et

al., 1996). The released ATP acts as an efficient signal of cell and tissue damage as well as a stimulus for regenerative responses (Di Virgilio, 2000). At this point the presence of NTPDase 2 at the astrocyte surface may be essential to control these events by decreasing the elevated cytotoxic concentration of nucleotides (Braun et al., 1998) and increasing the concentration of nucleosides that have been shown to exert important trophic effects under these circumstances (Neary et al., 1996; Braun et al, 1997; Schetinger et al., 1998; Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2001).

In summary, our results demonstrate that astrocytes in culture are able to hydrolyze ATP and ADP to AMP with a clear preference for nucleosides triphosphates. Although mRNAs encoding all members of E-NTPDase family were identified, probably the main contribution for the hydrolysis of extracellular ATP comes from NTPDase 2. The elevated expression and catalytic activity of this enzyme on the surface of astrocytes, reflects an important role in termination of purinergic signaling as well as functional importance in decreasing high levels of extracellular ATP under certain conditions. We suggest that the major ectonucleotidase expressed by rat astrocytes from different brain regions is the NTPDase 2.

Acknowledgments

Márcia R. Wink was recipient of a Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil) fellowship. This work was supported by the Brazilian funding agencies: CNPq, PROPESQ-UFRGS, FAPERGS and by NIH grants to HL-57307 and HL-63972 (Dr S.C.Robson).

References

- Ahmed S. M., Rzigalinski B. A., Willoughby K. A., Sitterding H. A. and Ellis E. F. (2000) Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons, *J. Neurochem.* **74**, 1951-1960.
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R. P. and Haydon P. G. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner, *Trends Neurosci.* **22**, 208-215.
- Battastini A. M. O., Rocha J. B. T., Barcellos C. K., Dias R. D. and Sarkis J. J. F. (1991) Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats, *Neurochem. Res.* **16**, 1303-1310.
- Boeck C. R., Sarkis J. J. F. and Vendite D. (2002) Kinetic characterization and immunodetection of ecto-ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int.* **40**, 449-453.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** 248-254.
- Braun N., Lenz C., Gillardon F., Zimmermann M., Zimmermann H. (1997) Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res.* **766**, 213-226.
- Braun N., Zhu Y., Kriegelstein J., Culmsee C., Zimmermann H. (1998) Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.* **18**, 4891-4900.

- Braun N., Fengler S., Ebeling, C., Servos, J. and Zimmermann H. (2000) Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem. J.* **351**, 639-647.
- Braun N., Sevigny J., Robson S.C., Enyoji K., Guckelberger O., Hammer K., Di Virgilio F. and Zimmermann H. (2000) Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/CD39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur. J. Neuros.* **12**, 4357-4366.
- Bruno A.N., Oses J.P., Bonan C.D., Walz R., Battastini A..M.O. and Sarkis J.J.F. (2002) Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol. *Neurosci. Res.* **43**, 283-288.
- Chadwick B.P. and Frischauf A.M. (1998) The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39 L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* **50**, 357-367.
- Chan K. M., Delfert D. and Junger K. D. (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺ - stimulated ATPase activity, *Anal. Biochem.* **157**, 375-380.
- Chevillard C., Cardenas M.L. and Cornish-Bowden A. (1993) The competition plot: a simple test of whether two reactions occur at the same active site. *Biochem J.* **289**, 599-604.
- Ciccarelli R., Ballerini P., Sabatino G., Rathbone M. P., D'Onofrio M., Caciagli F. and Di Iorio P. (2001) Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **19**, 395-414.

Di Virgilio F. Dr. Jekyll / Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP.

Enyoji K., Sevigny J., Lin Y., Frenette P. S, Christie P. D., Schult am Esch J., Imai M., Edelberger J. M., Rayburn H., Lech M., Beeler D. M., Csizmadia E., Wagner D. D., Robson S. C. and Rosenberg R. D. (1999) Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature Med.* **5**,1010-1017.

Grobben B., Anciaux K., Roymans D., Stefan C., Bollen M., Esmans E.L. and Slegers H. (1999) An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma. *J. Neurochem.* **72**, 826-834.

Haydon P.G. (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nature* **2**, 185-193.

Heine P, Braun N., Heilbronn A. and Zimmermann H. (1999) Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur. J. Biochem.* **262**, 102-107.

Hicks-Berger C. A., Chadwick B. P., Frischauf A. M. and Kirley T. L. (2000) Expression and Characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). *J. Biol. Chem.* **275**, 34041-34045.

Kast B. (2001) The best supporting actors. *Nature* **412**, 674-676.

Kegel B., Braun N., Heine P., Maliszewski C. R. and Zimmermann, H. (1997) An ecto-ATPase and an ecto-ATPdiphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacol.* **36**, 1189-1200.

Lai K. and Wong P. C. L. (1991) Metabolism of extracellular adenine nucleotides by cultured rat brain astrocytes. *J. Neurochem.* **57**, 1510-1515.

- Lenz G., Gottfried C., Luo Z., Avruch J., Rodnight R., Nie W. J., Kang Y. and Neary J.T. (2000) P2y purinoceptor subtypes recruit different Mek activators in astrocytes, *Br. J. Pharmacol.* **129**, 927-936
- Mulero J. J., Yeung G., Nelken S. T. and Ford J. E. (1999) CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J. Biol. Chem.* **274**, 20064-20067.
- Mulero J. J., Yeung G., Nelken S. T., Bright J. M., McGowan D. W. and Ford J. E. (2000) Biochemical characterization of CD39L4. *Biochemistry* **39**, 12924-12928.
- Neary J. T., Rathbone M. P., Cattabeni F., Abbracchio M. P. and Burnstock G. (1996) Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* **19**,13-18.
- Oliveira E.M., Battastini A.M.O., Meirelles M.N.L., Moreira C.M., Dias R.D. and Sarkis J.J.F. (1997) Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarcolemmal membrane from rat heart. *Mol. Cel. Biochem.* **170**, 115-123.
- Pinto S. S., Gottfried C., Mendez A, Gonçalves D., Karl J., Gonçalves C. A., Wofchuk S. and Rodnight R. (2000) Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Letters* **486**, 203-207.
- Plesner L. (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* **158**,141-214.
- Ralevic V. and Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Review* **50**, 413-92.

- Rathbone M. P., Middlemiss P. J., Gysbers J. W., Andrew C., Herman M.A.R., Ciccarelli R., Di Iorio P. and Caciagli F. (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* **59**, 663 -690.
- Scemes E., Suadiciani S. O. and Spray D. C. (2000) Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. *J. Neurosci.* **20**, 1435-1445.
- Schetingner M.R.C., Bonan C.D., Schierholt R.C., Webber A., Arteni N., Emanuelli T., Dias R.D., Sarkis J.J.F., Neto C.A. (1998) Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: A possible link between preconditioning and adenosine production. *J. Stroke Cerebr. dis* **7**, 1-3.
- Sevigny J., Sundberg C., Braun N., Guckelberger O., Csizmadia E., Qawi I., Imai M., Zimmermann H. and Robson, S.C. (2002) Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDases 1) and NTPDase 2 have implications for thromboregulation. *Blood* **99**, 2801-2809.
- Smith T. M. and Kirley T. L. (1998) Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys. Acta* **1386**, 65-78.
- Song H., Stevens C. F. and Gage F. H. (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**, 39-44.
- Svendsen C. N. (2002) The amazing astrocytes. *Nature* **417**, 29-32.

- Voelter W., Zech K., Arnold P. and Ludwig G. (1980) Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chromat.* **199**, 345-354.
- Vollmayer P., Koch M., Braun N., Heine P., Servos J., Israr E., Kegel B. and Zimmermann, H. (2001) Multiple ecto-nucleotidase in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression. *J. Neurochem.* **78**, 1019-1028.
- Wink M.R., Braganhol E., Tamajusuku A.S.K., Casali E.A., Karl J., Barreto-Chaves M.L., Sarkis J.J.F. and Battastini A.M.O. (2003a) Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem. Int.* **1367**, 1-8.
- Wink M.R., Lenz G., Braganhol E., Tamajusuku A.S.K., Schwartzmann G., Sarkis J.J.F. and Battastini A.M.O. (2003b) Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Letters. In press.*
- Yeung G., Mulero J. J., McGowan D.W., Bajwa S.S. and Ford J.E. (2000) CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. *Biochemistry* **39**, 12916-12923.
- Zimmermann H., (1996) Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **49**, 589-618.
- Zimmermann H., (2001) Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* **52**, 44-56.

Legends

Fig. 1 Metabolism of extracellular nucleotides and product formation by astrocyte cultures. Cells in 24 well plates were incubated with 100 μ M of ATP (A) or ADP (B) in 200 μ l of incubation medium as described in material and methods. An aliquot of the supernatant was withdrawn at various periods of time and the presence of ATP, ADP and AMP was determined after separation by HPLC. Data are mean \pm SEM (bars). Values from two experiments in duplicates.

Fig. 2 Competition plot between ATP and ADP hydrolysis rate. Cells in 24 well plates were incubated for 4 min with different combination of substrates. The P values ranged from 0 to 1 and represent different ATP and ADP concentrations. At $P = 0$, [ATP] was 0.130 mM and $P = 1$, [ADP] was 2.0 mM. Data are mean \pm SEM (bars). Values from three experiments carried out in triplicates. V (nmol Pi/mg protein/min).

Fig. 3 RT-PCR analysis of NTPDases expression by rat astrocytes. Total RNA was isolated from hippocampal (H), cortical (Cx) and cerebellar (Ce) rat astrocytes and the cDNA was analyzed by PCR with primers for CD39L family as described in material and methods. Plasmids contained the sequences of all NTPDases were used as a positive

controls (+) in all reaction. The length (bp) of the PCR products obtained with each pair of primers is given in each figure.

Fig. 4 Comparison of NTPDase family expression in astrocytes by quantitative real-time RT-PCR analysis. The expression of NTPDase members in hippocampal, cortical and cerebellar rat astrocytes was quantitatively analyzed by real-time PCR as described in material and methods. The results are presented as ratio of enzymes/GAPDH.

Fig. 5 Immunocytochemistry localization of NTPDase family members in hippocampal astrocyte cultures. Cells were cultured to confluence in DMEM, fixed in methanol and immuno-stained with polyclonal antibodies to GFAP, NTPDase 2, NTPDase 3, NTPDase 5 or NTPDase 6, as described in material and methods.

Figures

Figure 1A

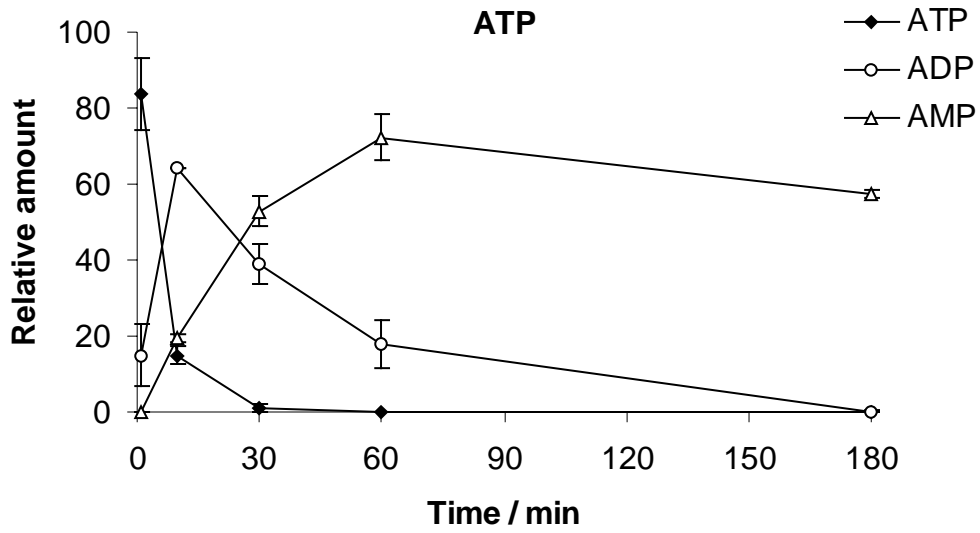


Figure 1B

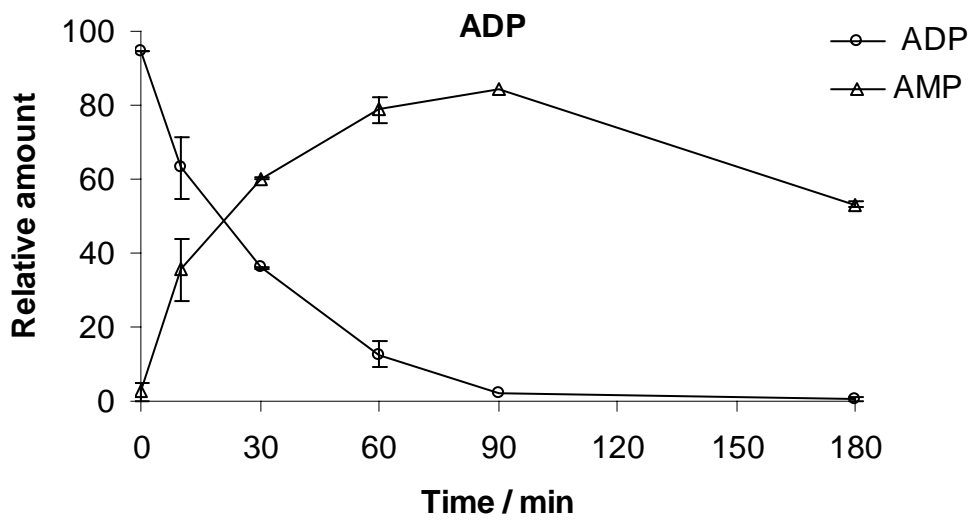


Figure 2

P	0	0.25	0.5	0.75	1
ATP mM	0.13	0.0975	0.065	0.0325	0
ADP mM	0	0.5	1	1.5	2

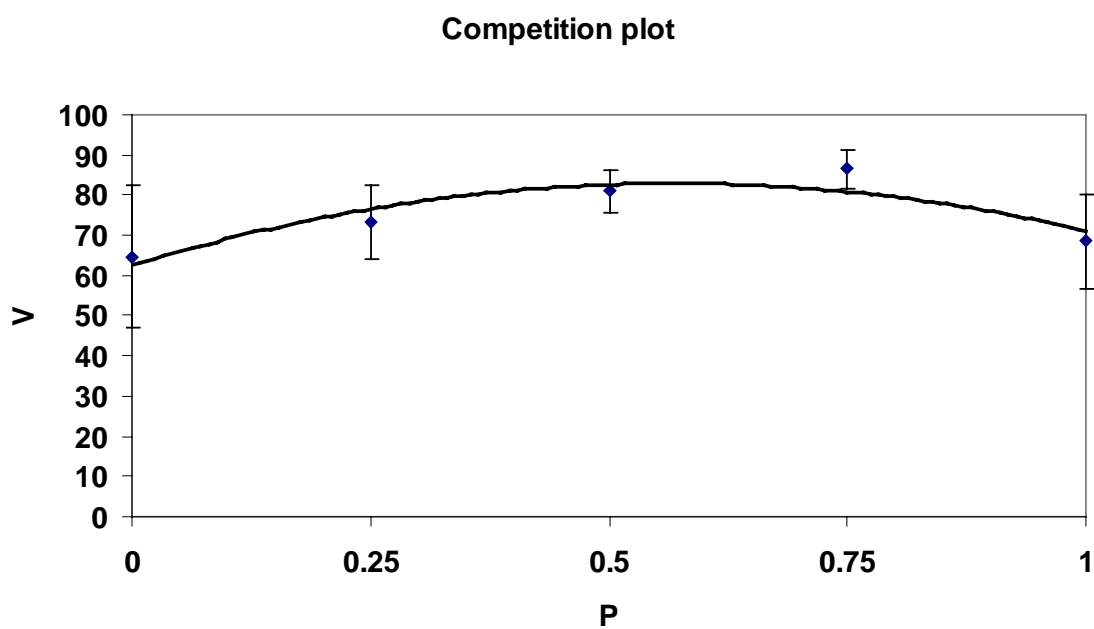


Figure 3

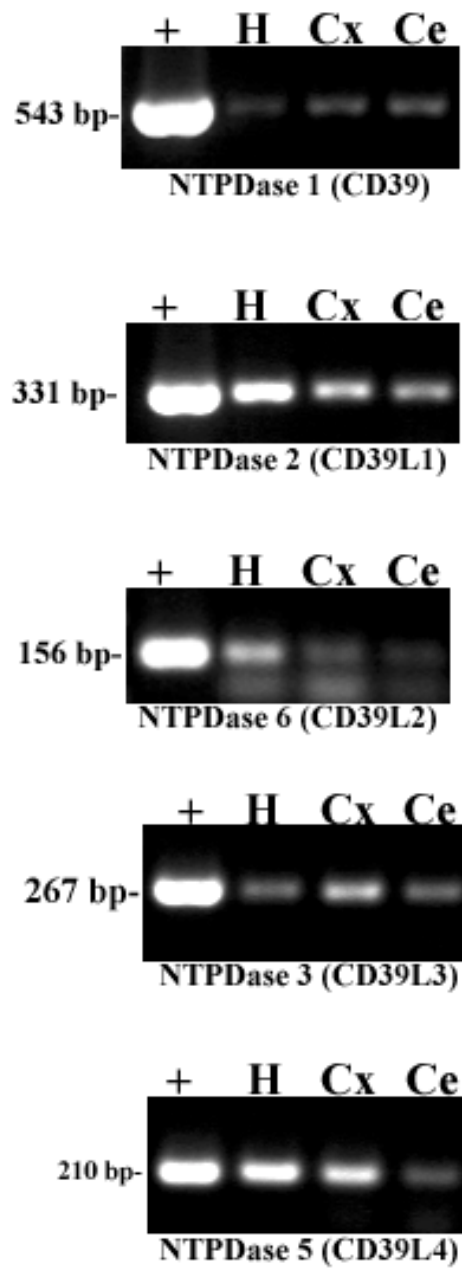


Figure 4

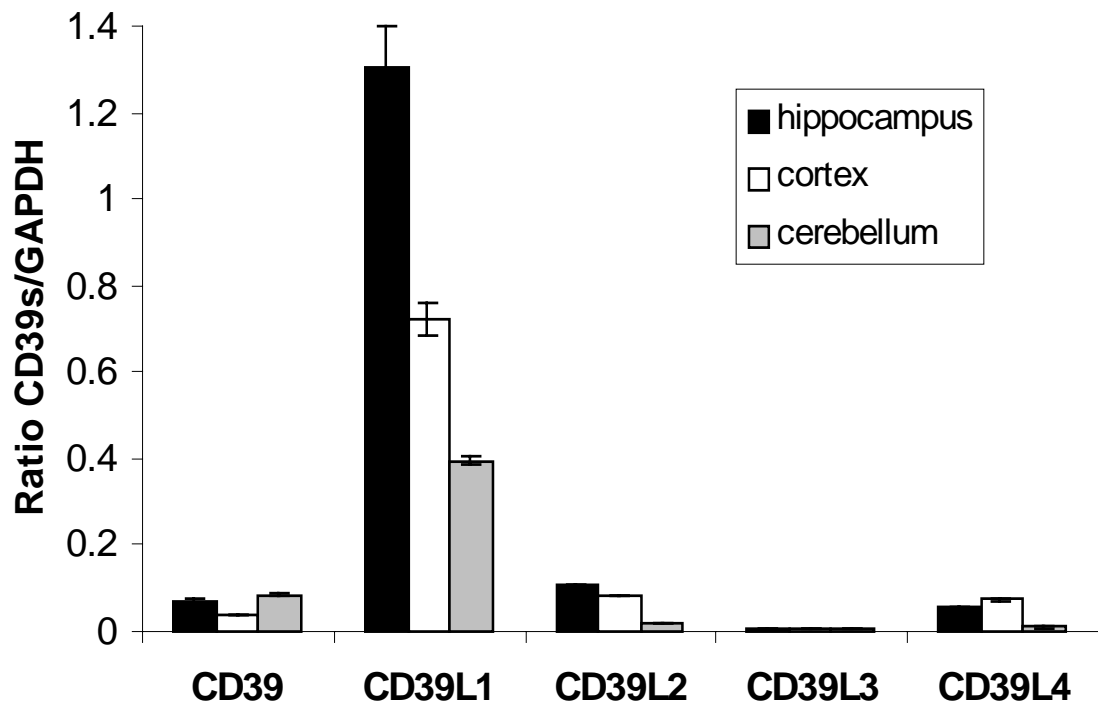


Figure 5

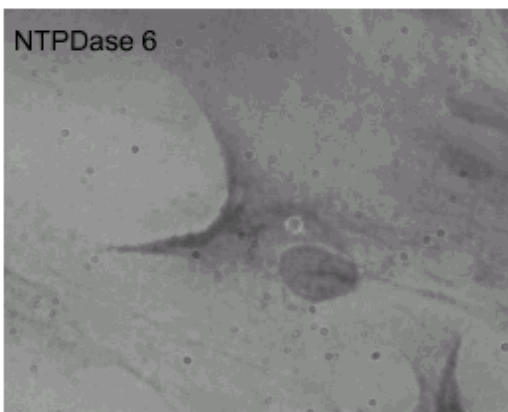
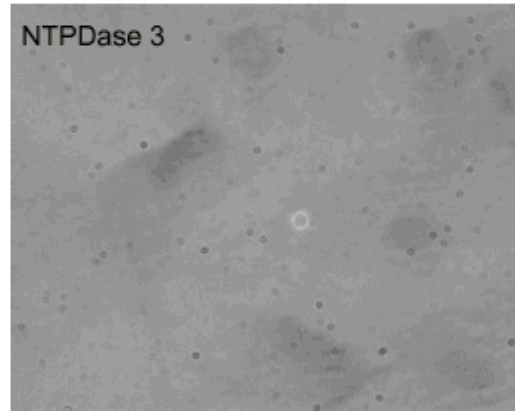
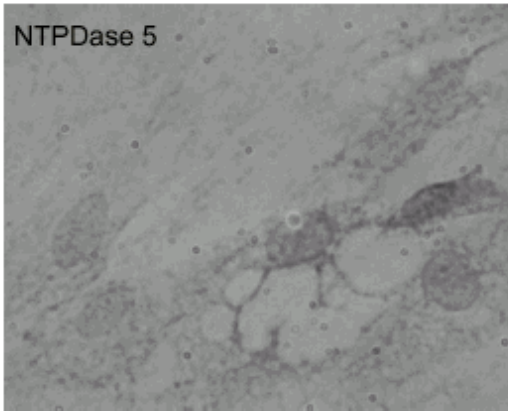
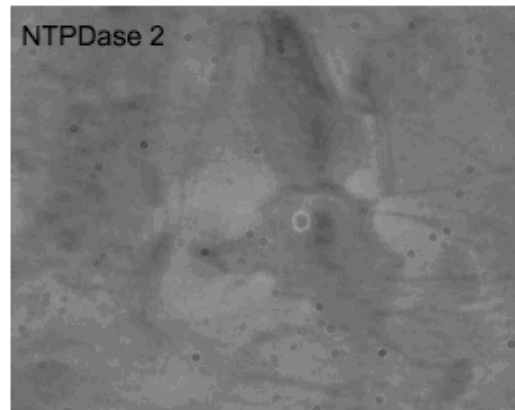
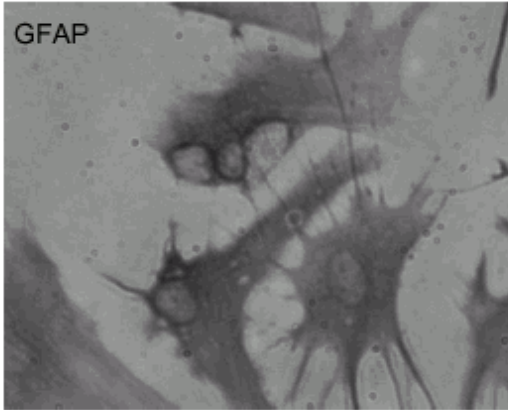


Table 1. Substrate specificity in hippocampal astrocytes. Enzyme activities were determined in astrocyte cultures in 24 well plates as described in material and methods. The results are expressed as nmol Pi/mg/min and as a percentage of activity relative to the ATP as a substrate. The activities were determined in five experiments in triplicates. Values are mean \pm SD.

Substrates	nmol/min/mg	% ATP	NTP/NDP ratio
ATP	864 \pm 133	100	10
ITP	1060 \pm 139	123	14
CTP	1030 \pm 401	119	6
UTP	954 \pm 278	110	8
GTP	848 \pm 238	98	8
ADP	84 \pm 48	10	
IDP	76 \pm 42	9	
CDP	178 \pm 94	21	
UDP	121 \pm 84	14	
GDP	100 \pm 58	12	
<i>p</i> -nitrophenyl-TMP	16 \pm 4	2	
PPi	0	0	

Table 2. Effect of inhibitors on ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in hippocampal astrocytes.

ATPase and ADPase activities were assayed as described in material and methods. Astrocytes from hippocampus were pre-incubated with inhibitors for 30 min at 37°C prior to the addition of ATP and ADP. Oligomycin was added from a concentrated ethanol solution (1% final ethanol concentration). Ethanol 1% itself did not inhibit enzymatic activities. ATPase and ADPase activities are expressed as percent of control obtained in the absence of inhibitor. The average of control values (100%) from different experiments were 1068 ± 323 nmois Pi/min/mg for ATP and 91 ± 38 nmois Pi/min/mg for ADP. Inhibitor concentrations are given in mM, unless specified. Results are the mean \pm SD of 2-5 experiments in triplicates.

Inhibitors	Concentration mM	% Control enzyme activity	
		ATPase	ADPase
Sodium azide	1.0	89 \pm 39	103 \pm 28
	5.0	99 \pm 8	129 \pm 19
	20	97 \pm 12	97 \pm 11
Oligomycin	2.0 ug/ml	92 \pm 9	88 \pm 14
Ouabain	1.0	94 \pm 8	69 \pm 25
Ortho-vanadate	0.1	106 \pm 10	90 \pm 26
Levamisole	1.0	110 \pm 6	88 \pm 9
Lanthanum	0.1	102 \pm 6	67 \pm 35
<i>N</i> -Ethylmaleimide	1.0	98 \pm 9	99 \pm 32
Suramin	0.1	71 \pm 23	111 \pm 27
	0.3	49 \pm 10	102 \pm 49
Evans blue	0.1	31 \pm 2	7 \pm 3

3.3.1 Anexo

Expression of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase CD39 family members by glioma cell lines

**Paper em preparação,
iniciado durante o “doutorado sanduíche” e que será finalizado no Pós-doutorado, a
ser realizado no Beth Israel Hospital - Harvard Medical Scholl, novamente sob
orientação do Dr. Simon C. Robson.**

**(Os resultados desse anexo foram apresentados como poster, no “Research Day” em
outubro de 2002 no Beth Israel Hospital – Harvard Medical School.)**

**Expression of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase CD39 family
members by glioma cell lines**

Márcia R. wink^{1,2}, Elzbieta Kaczmarek², Eva Csizmadia², Keiichi Enjyoji²,
Ana M.O. Battastini¹, and Simon C. Robson^{2*}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215, USA

* Corresponding author: Dr. Simon C. Robson
Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center,
Harvard Medical School
99 Brookline Ave.
Boston, Massachusetts 02215, USA
Tel. (617) 632-0881
FAX (617) 632-0880
E-mail: srobson@caregroup.harvard.edu

ABSTRACT

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common, malignant brain tumor and has a poor prognosis for cure. It has been shown that ATP can act as a mitogenic factor for glial cells and that glioma cell lines express very low nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) activity when compared to primary astrocyte cultures.

Aim: Analyze patterns of expression of NTPDases in malignant glioma cell lines.

Methods and Results: The expression of NTPDases was investigated by RT-PCR, immunocytochemistry and Western blotting. The expression of NTPDase6 (CD39L2), NTPDase3 (CD39L3) and NTPDase5 (CD39L4) was detected in the glioma cell line U87, while NTPDase2 (CD39L1) was absent in the transformed cells.

Conclusions: Substantial decreases in ATP and ADP hydrolysis were observed by gliomas secondary to the absence of expression of CD39L1. These data suggest that alterations in the ecto-nucleotidase may represent an important mechanism associated with malignant transformation of glioma cell lines.

Financial support: CNPq and National Institutes of Health.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human glioma cell line U-87 MG, was obtained from ATCC. Cells were maintained in complete medium consisting of DMEM (Gibco, Cat. number 12320) and 10% (v/v) FCS, penicillin (50 UI/ml) and streptomycin (50 µg/ml) at 37°C in 5% CO₂/95% air. For experiments, exponentially growing cells were detached from the culture flasks with EDTA-trypsin, inoculated in complete medium into 24-well microplates and allowed to grow to confluence (3-4 days) as previously described (Wink et al., 2003).

RT-PCR analysis

Total RNA from glioma cell line U87 cultured until confluence was isolated with RNeasy Mini Kit reagents (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA species were synthesized with SuperScript II (Life Technologies) from 5 µg of total RNA in a total volume of 20 µl with both, oligo (dT) primer and random hexamers in accordance with the manufacturer's instructions. 0.5 µl of the RT reaction mix was used as a template for PCR in a total volume of 20 µl using a concentration of 0.5 µM of each primer indicated below and 0.5 units of Ex Taq DNA polymerase (Takara BIO INC, Japan). The annealing temperatures were: CD39L1, 59.3°C; CD39L2, 56.6 °C; CD39L3, CD39L4 and CD73, 52.0 °C. The PCR was run for 35 cycles and the cycling conditions were as follows: 1 min at 95 °C, 1 min at 94 °C, 1 min at the annealing temperatures, 1 min at 72 °C and a final 10 min extension at 72° C. 10µl of the PCR reaction was analyzed on a 1.3% agarose gel. The following set of primers were used: CD39L1: upper 5'-CAGGATGTGCCCAAAGAGA-3' and lower 5'-CCCCATTGAAAGAGCATCG-3'; CD39L2: upper 5'-GTGTGGGCGTGTTTCATCTA-3' and lower 5'-

CCTTCATCTGTTCCGTTCA-3'; CD39L3: upper 5'-TACCGAACTCCAACCATCA-3' and lower 5'-CCTTGACTTTTTGCATACA-3'; CD39L4: upper 5'-AAGGCAACAGCAGGACTAC-3' and lower: 5'-AATCCAAATCCCAAGTAAC-3'; and CD73: upper 5'-GATCGAGCCACTCCTCAAA-3' and lower 5'-GCCCATCATCAGAAGTGAC-3'. Oligonucleotides were obtained from Invitrogen, Life Technologies. Negative controls were performed with templates substituted by DNase, RNase free distilled water (Gibco) for each PCR reaction. Plasmids with cDNA sequences for human CD39L1, CD39L2, CD39L3 and CD39L4 were used as a positive control.

Northern blotting Analysis

Total RNA (15 µg) from human glioma cell lines U87 (in triplicate) and 132 1N1 was separated on a 1 % formaldehyde-agarose gel and transferred onto nylon membrane by capillary blotting, followed by UV cross-linking. RNA was hybridized with CD39 (extracellular domain, 1.3 kb), CD39L1 (666 bp) or GAPDH cDNA. The cDNA probes were labeled with [α -³²P]dATP using Megaprime™ DNA labelling systems (Amersham Life Science). Membrane blocking (2 hours) and hybridization (overnight) were carried out at 42°C in a solution containing 5x sodium saline citrate (SSC), 5x Reinhardt's solution, 50 % formamide and 1 % SDS. Membranes were washed once for 15 min in 2x SSC/0.1 % SDS at room temperature, once for 15 min in 2x SSC at 65°C and again for 15 min with SSC/0.1 % SDS at 65°C. The blots were exposed to Kodak Biomax MR film with intensifying screens at -80°C.

Western Blot Analysis

Cell lysate proteins (30 µg per line) were separated on 4 to 15 % linear gradient SDS-polyacrylamide gel under non-reducing conditions, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by electroblotting and probed with polyclonal antibodies to human CD39L3 (1:1000) and CD39L4 (1:1000). Bands were visualized using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Pierce, Rockford, IL) and the Enhanced ChemiLuminescence (ECL) assay, according to the manufacturer's instruction.

Immunohistochemistry

Confluent cultures were fixed in 75% acetone/0.5% buffered formaline for 3 min and washed with cold PBS. Non-specific binding sites were blocked for 30 min with 7% normal goat serum/PBS and exposed overnight at 4°C to primary polyclonal antibodies: anti-human CD39L1 (NTPDase2) (Sevigny et al., 2002) (1:1000); anti-human L3 (NTPDase 3 or HB6) (Smith and Kirley, 1998) (1:1000); anti-human CD39L2 (NTPDase 6) (1:1000) and CD39L4 (NTPDase 5) (1:1000) generated by peptide immunization of rabbits with: PEP002A TRAAPGARWGQQA (Yeung et al., 2000) and 246-A2 N-terminus 19aa (Mulero et al., 2000), respectively (prepared by Hyseq, Sunnyvale CA); and monoclonal anti-human CD39 (Zymed, San Francisco, CA) (1:500). After three washes with PBS, cells were treated with 0.15% hydrogen peroxidase (Sigma) to inactivate endogenous peroxidase and then incubated with biotinylated secondary anti-rabbit IgG (2µg/ml) (ABC, Vector lab, Burlingame, CA) for one hour at room temperature. Following the incubation with avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC, DAKO, Denmark), the staining was visualized by reacting with 3,3 -diaminobenzidine tetrahydrochloriden (DAB) and hydrogen peroxide using a DAB reagent set (Vector lab, Burlingame, CA).

Legends

Fig. 1 RT-PCR analysis of NTPDases expression by glioma cell line U87. Total RNA was isolated from U87 cells and the cDNA was analyzed by PCR with primers for CD39L family (S) as described in material and methods. Plasmids contained the sequences of NTPDases were used as a positive controls (PC) in all reaction. Negative controls (NC) did not contain cDNA. 100 bp ladder was used as a molecular weight marker (left).

Fig. 2 (A) Northern blot analysis of glioma cell lines. mRNA isolated from three different U87 cultures (lines 1, 2 and 3) and 132 1N1 culture (line 4) was hybridized with CD39, CD39L1 or GAPDH cDNA probe. (B) Formaldehyde-agarose gel stained with ethidium bromide to evaluate quality and amount of RNA.

Fig. 3 Representative immunoblot of human U87 glioma cell line with antibodies to NTPDases. CD39L3 and CD39L4-transfected COS-7 (CP) or U87 cell lysates (30 µg, per line) were probed with polyclonal anti-human CD39L3 (A) or CD39L4 (B) antibodies. The antibodies did not react with any proteins present in the mock transfected COS-7 cell lysates (CN). Positions of molecular size markers are shown in kDa (left).

Fig. 4 Immunocytochemistry localization of NTPDase family members in U87 glioma cell line. Cells were cultured to confluence in DMEM, fixed in methanol and immunostained with antibodies to CD39, CD39L1, CD39L2, CD39L3 and CD39L4 as described in material and methods.

Figures

Figure 1

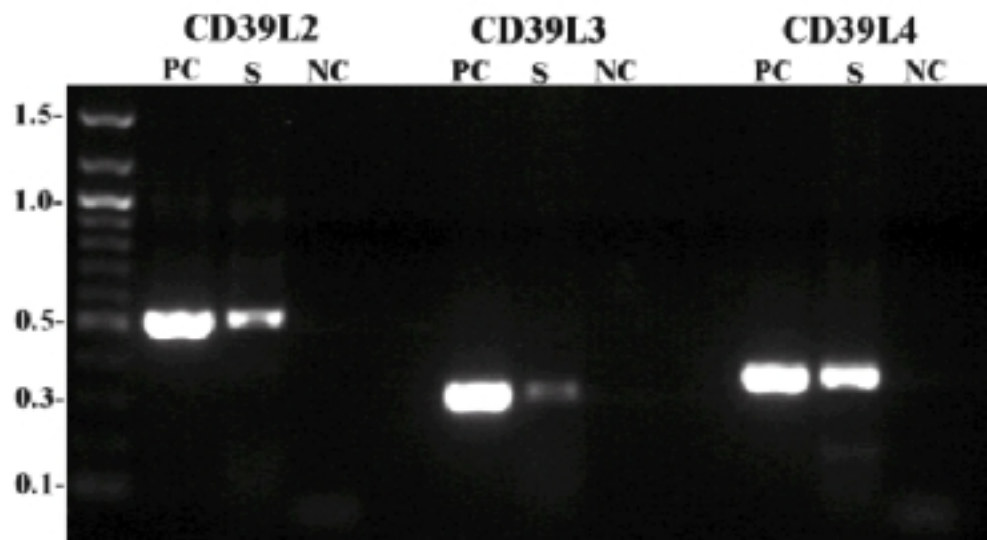
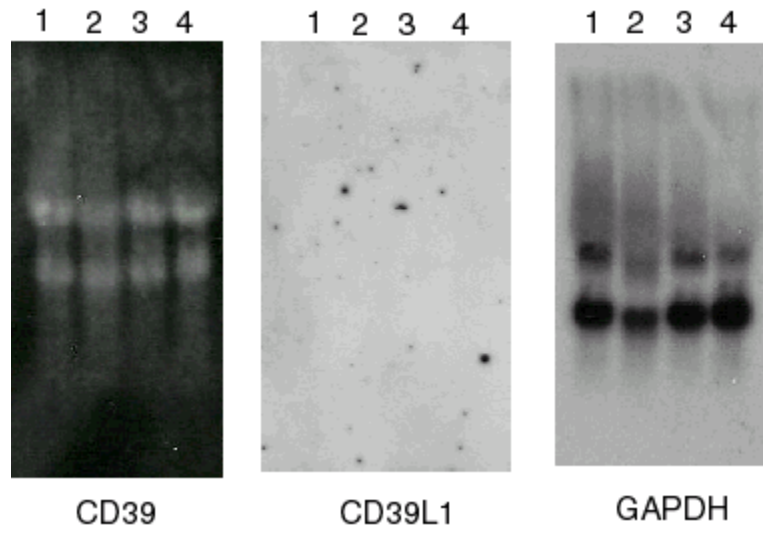


Figure 2

A



B

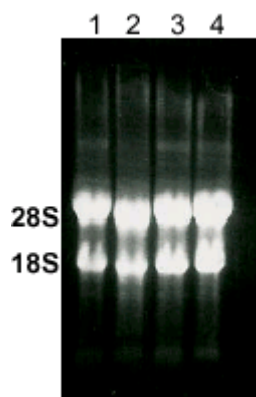


Figure 3A

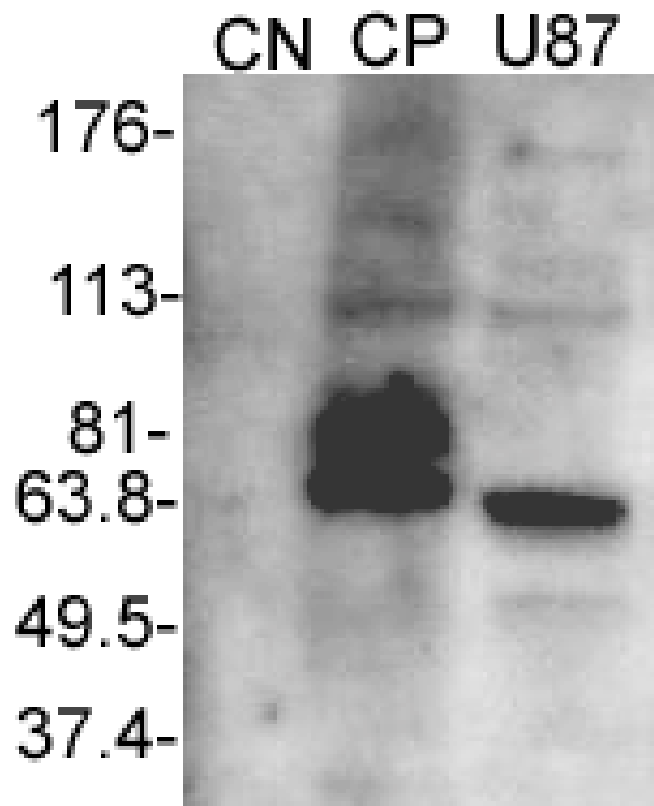


Figure 3B

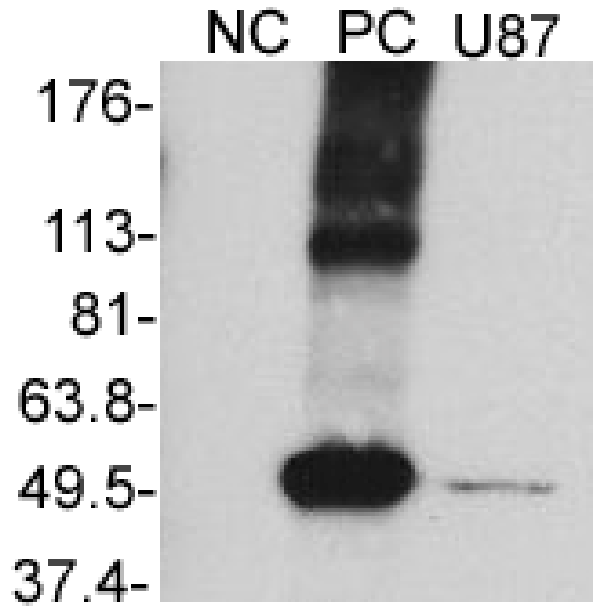
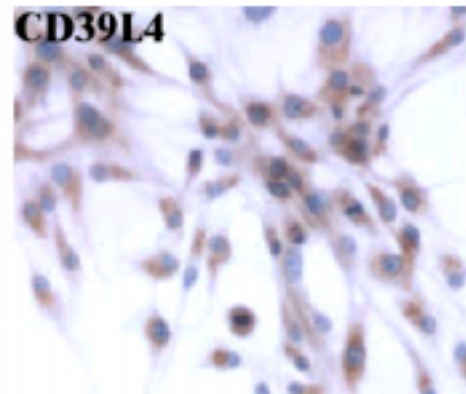
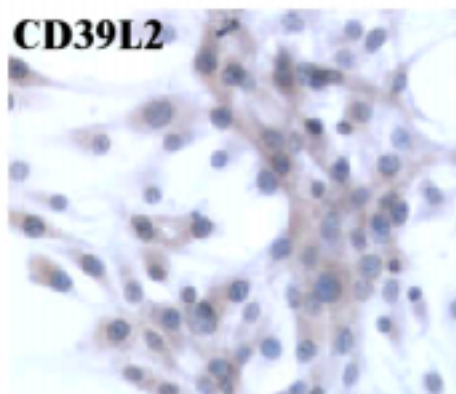
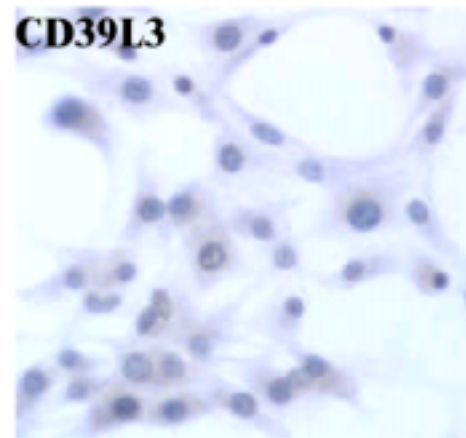
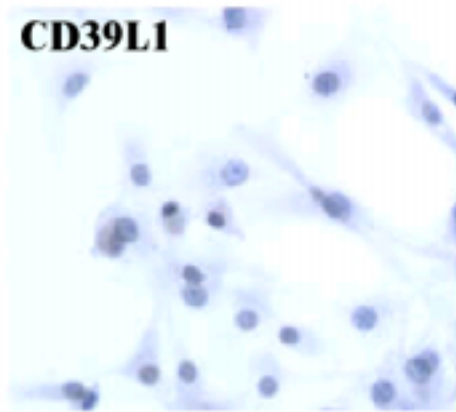
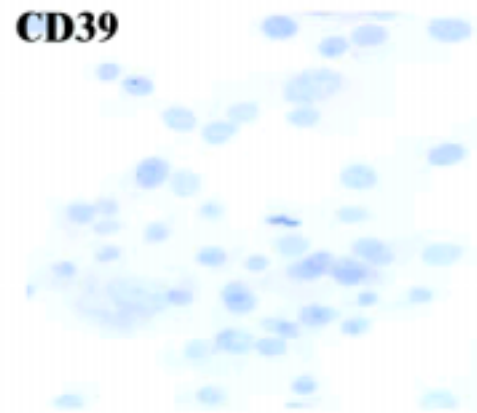
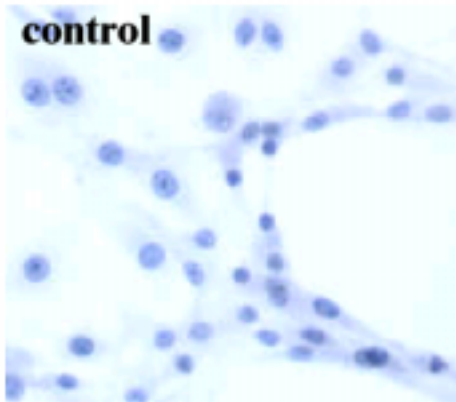


Figure 4



4 Discussão

4.1 Degradação dos nucleotídeos extracelulares em astrócitos

Os astrócitos representam a maior população celular do cérebro e são também as principais fontes de purinas extracelulares e importantes alvos para a ação dessas substâncias (Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2001). Como as membranas celulares são impermeáveis a compostos fosforilados, é importante que as células metabolizem os nucleotídeos extracelularmente, por um conjunto de enzimas localizadas na superfície extracelular. Essas atividades enzimáticas são capazes de regular a concentração dos nucleotídeos extracelulares, bem como a formação dos nucleosídeos, modulando assim seus efeitos biológicos.

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que culturas de astrócitos de diferentes regiões cerebrais são capazes de hidrolisar extracelularmente, todos os nucleosídeos tri e di-fosfatados.

Culturas de astrócitos preparadas de hipocampo e córtex de ratos, degradaram ATP, ADP e AMP extracelular com velocidades similares. Entretanto, astrócitos de cerebelo apresentaram uma atividade ATPásica significativamente menor do que astrócitos de hipocampo e córtex. Astrócitos de cerebelo também diferiram de hipocampo e córtex, em relação a atividade AMPásica, que foi sete vezes maior nessa estrutura.

A análise do metabolismo do ATP extracelular em astrócitos das três estruturas por HPLC, confirmou o perfil diferenciado do cerebelo, observado com os experimentos de medida de hidrólise. Enquanto o ATP foi rapidamente hidrolisado em 30 minutos nas três estruturas, produzindo um acúmulo de 60 e 40% de ADP em hipocampo e córtex,

respectivamente, em cerebelo o acúmulo de ADP foi de 20%, com a conseqüente maior produção de AMP nesse período. O AMP formado em astrócitos de cerebelo foi rapidamente metabolizado, desaparecendo completamente em 180 minutos. Diferentemente dos astrócitos de hipocampo e córtex, onde este nucleotídeo permaneceu acumulado, sendo o principal produto de metabolismo observado nesse período. A rápida metabolização do AMP em cerebelo, observada em HPLC, está em concordância com a maior atividade AMPásica observada nessa estrutura pelo método de liberação do fosfato inorgânico.

A adenosina formada pela hidrólise do AMP, não sofreu acúmulo no meio de incubação dos astrócitos das diferentes regiões cerebrais. Experimentos com dipiridamol sugerem a participação dos transportadores de nucleosídeos em astrócitos de hipocampo e córtex, devido ao aumento significativo na concentração extracelular de inosina após a incubação com a droga. Porém, a adenosina não acumulou na presença de dipiridamol, nessas duas estruturas, indicando que o nucleosídeo está sendo rapidamente metabolizado a inosina pela ação da ecto-adenosina deaminase. Em cerebelo, apesar da alta atividade AMPásica, o dipiridamol não afetou a concentração extracelular da adenosina e inosina, sugerindo que a atividade ecto-adenosina deaminase é maior em cerebelo do que em hipocampo e córtex. Os resultados obtidos sugerem que a atividade ecto-adenosina deaminase pode ser o mecanismo mais importante para o controle da adenosina extracelular nos astrócitos das diferentes regiões cerebrais.

Nas últimas décadas tem tornado-se evidente o papel da adenosina como um potente neuromodulador, principalmente na transmissão sináptica no sistema nervoso de mamíferos (Cunha et al., 1996; Mendonça et al., 2000; Sebastião e Ribeiro, 2000; Cunha,

2001). Pelo menos em parte, a adenosina produzida fisiologicamente no espaço extracelular é proveniente da ação de ectoenzimas que hidrolisam os nucleotídeos, liberados como resultado da atividade das células nervosas. O passo final para a produção da adenosina formada a partir dos nucleotídeos da adenina é catalisada pela ecto-5'N (CD73) (Zimmermann, 1992; Zimmermann, 1996a; 1996b). Esta enzima é de particular interesse em sistema nervoso central, devido a sua distribuição regional altamente específica (Heymann et al., 1984).

Para investigar se o aumento observado na hidrólise do AMP em cerebelo foi consequência de uma maior expressão da enzima, foram determinados e comparados os níveis de mRNA para a ecto-5'N/CD73 em astrócitos preparados das três estruturas cerebrais estudadas. Os resultados demonstraram níveis similares da expressão da enzima em hipocampo e córtex. Em concordância com os resultados de hidrólise de AMP e metabolismo do ATP, astrócitos de cerebelo apresentaram uma expressão, aproximadamente quatro vezes mais alta de mRNA para a ecto-5'N, do que as outras duas estruturas.

A expressão da ecto-5'N tem sido investigada em sistema nervoso, principalmente por técnicas de histoquímica e imunocitoquímica (Heymann et al., 1984; Maienschein e Zimmermann, 1996). Vários estudos demonstraram que a camada molecular do cerebelo contém altos níveis de receptores A₁ e de ecto-5'N, sendo que a enzima foi encontrada, principalmente associada à glia de Bergmann (ítem 1.3.1), que é o principal tipo celular da camada molecular (Hess e Hess, 1986; Schoen et al., 1988). Os corpos celulares desses astrócitos especializados, estão distribuídos continuamente dentro da camada das células de Purkinje e seus processos estão em íntima associação com os dendritos das

células de Purkinje. Hess e Hess (1986) demonstram que em camundongos deficientes em células de Purkinje, a presença de ecto-5'N é intensamente diminuída da camada molecular e que atividade residual da enzima é colocalizada com as células de Purkinje sobreviventes, sugerindo fortemente que a expressão da ecto-5'N pela glia de Bergmann é influenciada pela associação com as células de Purkinje (Hess e Hess, 1986).

A ecto-5'N apresenta um papel na proliferação e formação de contatos durante os processos de desenvolvimento e crescimento. Um estudo de ontogenia pós-natal em cerebelo de rato mostrou atividade enzimática em neurônios em migração e a ausência em neuroblastos latentes, sugerindo a enzima como uma marcadora para células nervosas em migração (Schoen et al., 1988). A localização generalizada da ecto-5'N no cerebelo em desenvolvimento sugere um papel da enzima nas interações glia-neurônio (Schoen et al., 1988). Outro papel atribuído à enzima no cerebelo em desenvolvimento é a mielinização desse sistema (Schoen et al., 1988; Heymann et al., 1984).

Além do mais, há evidências de que a atividade de hidrólise do AMP está relacionada à regeneração e ao desenvolvimento neuronal (Maienschein and Zimmermann, 1996), que geralmente é mais rápida no cerebelo (Marangos et al., 1982). Estas funções podem ser atribuídas aos produtos de degradação do AMP, a adenosina e inosina, que podem agir como agentes tróficos no SNC, induzindo mudanças funcionais e modulando a diferenciação neuronal (Rathbone et al., 1992; Rathbone et al., 1999).

Em conclusão os dados apresentados nesse capítulo sugerem que astrócitos de cerebelo apresentam um perfil de hidrólise de nucleotídeos peculiar, quando comparado com o hipocampo e o córtex, sendo que a diferença mais pronunciada foi encontrada em

relação a ecto-5'N. Esses resultados podem indicar a heterogeneidade das funções das diferentes regiões cerebrais.

4.2 NTPDases em astrócitos

O metabolismo dos nucleotídeos extracelulares da adenina observado nas culturas de astrócitos preparadas de hipocampo, cortex e cerebelo de ratos, demonstra que essas células possuem todos os componentes da cascata enzimática para a completa hidrólise do ATP até a formação adenosina.

Recentemente, foi demonstrado que a hidrólise extracelular dos nucleosídeos di e trifosfatados é realizada por uma família de ecto-enzimas, as E-NTPDases, composta até o momento de pelo menos 6 membros (Zimmermann, 2001). Nossos resultados sugerem que culturas de astrócitos de hipocampo, córtex e cerebelo expressam todos os membros da família E-NTPDase com potencial para hidrolisar os di e tri-fosfonucleosídeos (Capítulo 3, Figuras 3 e 4).

Astrócitos de hipocampo, córtex e cerebelo expressam a NTPDase 2 ou CD39L1, como a principal E-NTPDase (Capítulo 3, Figura 4), caracterizada por hidrolisar preferencialmente os nucleosídeos tri-fosfatados (Kegel et al., 1997; Mateo et al., 1999; Zimmermann, 2001). Dentre as três estruturas, astrócitos de hipocampo apresentaram a mais alta expressão de NTPDase 2 e o cerebelo a mais baixa (Capítulo 3, Figura 4). Esses dados estão em concordância com os resultados de hidrólise de ATP, onde a mais alta

atividade ATPásica foi encontrada em hipocampo e a mais baixa em cerebelo (Capítulo 1, Figura 2A).

Astrócitos das três estruturas hidrolisaram o ATP, bem como outros trifosfonucleosídeos, com uma atividade ATPásica extremamente alta (Capítulo 1, Figura 2 e 3; Capítulo 3, Tabela 1). O perfil obtido para o metabolismo do ATP em HPLC mostra um acúmulo de ADP (Capítulo 1, Figura 3) como demonstrado para a ecto-ATPase de cérebro de ratos (NTPDase 2) (Heine et al., 1999). Além disso, a suramina e o “Evans blue”, causaram uma inibição na atividade ATPásica similar a observada para a ecto-ATPase recombinante expressa em células Cos-7 (Capítulo 3, Tabela 2) (Heine et al., 1999). Essa observação sugere que em astrócitos de hipocampo e córtex o ATP é principalmente hidrolisado pela NTPDase 2 (ecto-ATPase). Entretanto, em astrócitos de cerebelo, houve um menor acúmulo de ADP (Capítulo 1, Figura 3C), indicando que parte do ATP possa estar sendo hidrolisado diretamente a AMP. Esse perfil de hidrólise é o descrito para a NTPDase 1 (CD39 ou ecto-apirase) (Heine et al., 1999) e também para a pirofosfatase. Porém, a presença de uma pirofosfatase foi descartada, por que não houve liberação de fosfato inorgânico, mediante a incubação de astrócitos de cerebelo com pirofosfato. Além disso, astrócitos de cerebelo possuem a maior expressão de NTPDase 1 entre as três estruturas (Capítulo 3, Figura 4). Então, em astrócitos de cerebelo, além da NTPDase 2, pode estar havendo uma contribuição da NTPDase 1 para a hidrólise do ATP.

O perfil de hidrólise do ADP, observado para as três estruturas pelo método de liberação de Pi (Capítulo 1, Figura 2B), bem como o observado em astrócitos de hipocampo pelo HPLC (Capítulo 3, Figura 1B), sugerem que o ADP é hidrolisado com

uma velocidade maior do que a atribuída à NTPDase 2 (Kegel et al, 1997; Heine et al., 1999). Além disso foi verificada a presença de membros da família E-NTPDase com capacidade de hidrolisar NDPs como a NTPDase 5 e 6 (Capítulo 3, Figuras 3 e 4). Esses resultados sugerem que possa estar havendo a contribuição de outros membros da família das E-NTPDases, além da NTPDase 2, para a hidrólise dos nucleosídeos difosfatados. Algumas observações suportam essa idéia: a) a razão de hidrólise obtida para NTP/NDP que foi de aproximadamente 10 (Capítulo 3, Tabela 1), enquanto que o descrito para a NTPDase 2 é 30; b) O perfil de inibição obtido para a atividade ADPásica é diferente da atividade ATPásica, principalmente em relação a suramina e “Evans blue” (Capítulo 3, Tabela 2); c) o perfil obtido com o gráfico de Chevillard, o qual sugere que o ATP e ADP estão sendo hidrolisados por mais de um sítio catalítico (Capítulo 3, Figura 2); e d) a presença de múltiplas NTPDases, observadas por RT-PCR e imunocitoquímica (Capítulo 3, Figuras 3, 4 e 5).

Os resultados dos capítulos 1 e 3 demonstram que em astrócitos, os nucleosídeos di e trifosfatados são hidrolisados principalmente pelos membros da família das E-NTPDases. Provavelmente, a contribuição dos membros da família das E-NPPs é muito pequena, pois a incubação das culturas de astrócitos com *p*-nitrophenyl-TMP como substrato, representou apenas 2% quando comparado com a hidrólise do ATP (Capítulo 3, Tabela 1). A pré-incubação das células com os inibidores clássicos das ATPases tipo P, F, V, não afetou a atividade ATPásica, excluindo a participação dessas enzimas na hidrólise do ATP (Capítulo 3, Tabela 2).

A alta expressão da NTPDase 2 em astrócitos pode representar um eficiente meio pelo qual o sistema nervoso central diminui as altas concentrações extracelulares de ATP

observadas em determinadas patologias, bem como em situações de trauma e injúria, onde há morte neuronal. Nesse sentido o ATP citotóxico, poderá ser rapidamente hidrolisado a ADP pela NTPDase 2, elevando a concentração dos nucleosídeos tróficos através dos demais componentes da cascata enzimática.

Os dados apresentados no capítulo 3, complementam os resultados obtidos no capítulo 1 e mostram pela primeira vez, que a NTPDase 2 é a principal ectonucleotidase, responsável pela hidrólise do ATP em astrócitos provenientes de hipocampo, córtex e cerebelo.

4.3 Degradação alterada dos nucleotídeos extracelulares em gliomas

Uma das características que mais distinguem os gliomas dos outros tipos de neoplasias, é a alta capacidade de invasão e proliferação e a baixa resposta a tratamentos como radioterapia e quimioterapia. Dentre os tipos de gliomas, o glioblastoma multiforme é o tipo mais agressivo e maligno. Devido ao rápido crescimento, este tipo de tumor provoca destruição de extensas áreas do tecido nervoso, reduzindo a sobrevida dos pacientes a menos de um ano.

As linhagens de gliomas têm sido extensivamente usadas como modelos representativos dos gliomas *in vitro*, para os mais diversos tipos de abordagens tanto na ciência básica como aplicada. Essas células têm sido consideradas excelentes modelos de estudo uma vez que apresentam diversas características biológicas dos tumores *in vivo*, como alto poder de invasão e proliferação (Masters, 2000; Grobbs, 2002).

Recentemente, Takano e colaboradores (2001) mostraram, elegantemente, que a liberação de glutamato promove o crescimento de gliomas malignos em cérebro de ratos.

Usando diferentes linhagens de glioma C6, secretora e não secretora de glutamato, os autores mostraram que a linhagem secretora tem uma clara vantagem proliferativa sobre a linhagem não secretora, somente *in vivo*, indicando que a neurotoxicidade promovida pelo glutamato facilita a progressão tumoral. Essas observações suportaram a idéia de que, a secreção de glutamato pela glia neoplásica promove a expansão do tumor por causar morte neuronal e acelerar a resposta inflamatória nas regiões que circundam o tumor (Takano et al., 2001).

A necrose induzida por glutamato causa injúria e morte celular. É bem descrito que sob essas circunstâncias há uma liberação de altas concentrações de nucleotídeos e nucleosídeos, como o ATP e a adenosina do interior das células (Rathbone et al., 1992; Braun et al., 1997; Braun et al., 1998; Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2001; Nedergaard et al., 2002). Além do mais foi demonstrado que os astrocitomas por si só, também podem liberar nucleotídeos como ATP e UTP (Harden e Lazarowski, 1999). Assim a interface do glioma com o tecido normal pode ser um sítio de alta concentração de nucleotídeos e nucleosídeos.

Vários estudos têm demonstrado que o ATP extracelular é capaz de promover a proliferação celular em astrócitos (Rathbone et al., 1992; Neary et al., 1994; Neary et al., 1996; Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2001). Além disso, Rathbone e colaboradores (1992), mostraram que o ATP e seus produtos de degradação estimularam a proliferação em linhagens de astrocitoma através de diferentes receptores e Dixon e colaboradores (1997), observaram que o ATP estimula a proliferação em células de câncer de mama (MCF-7) via receptores P2. Recentemente, Morrone e colaboradores (2003) mostraram pela primeira vez que o ATP e a adenosina, via purinoreceptores P2 e

possivelmente A3, respectivamente, aumentaram a proliferação em diversas linhagens de gliomas. Em adição, esses autores também observaram que o ATP e a adenosina aumentaram o transporte de timidina para dentro da célula.

A análise da degradação de nucleotídeos em cinco linhagens diferentes de gliomas, mostrou que essas células apresentam um padrão alterado de hidrólise dos nucleotídeos extracelulares, quando comparado com astrócitos normais. A maior diferença foi observada em relação a hidrólise do ATP. As linhagens de gliomas humanos: U87, U373, U251 e U138; e a linhagem de glioma de rato C6, degradaram o ATP com uma atividade específica de aproximadamente 10 nmois de Pi/min/mg de proteína, enquanto os astrócitos degradaram com uma atividade específica de aproximadamente 1000 nmois de Pi/min/mg de proteína (Capítulo 2, Figura 2 e Tabela 1). O perfil de metabolismo do ATP obtido em HPLC, confirmou o resultado da medida da velocidade de reação pela liberação de Pi. Enquanto virtualmente todo o ATP foi metabolizado pelos astrócitos em 30 minutos, as linhagens de gliomas, nesse mesmo período metabolizaram menos de 30% deste nucleotídeo, sendo que na linhagem U138 somente 5% do ATP foi metabolizado (Capítulo 2, Figura 1). A baixa velocidade de hidrólise observada com ATP, também foi observada com GTP, CTP, ITP e UTP, sendo esta uma característica dos gliomas para com todos os nucleosídeos tri-fosfatados (Capítulo 2, Figura 2).

4.4 Ecto-5'-nucleotidase nos gliomas

A análise da degradação AMP nas linhagens de gliomas mostra que, surpreendentemente, essas células apresentam uma atividade AMPásica muito mais elevada do que os astrócitos, chegando em algumas linhagens a ser 10 vezes maior. A

degradação do AMP por astrócitos medida em HPLC, confirmou os resultados de hidrólise e chama atenção o fato de que enquanto o AMP é o principal produto acumulado em astrócitos em 180 minutos de incubação, em gliomas ocorre o acúmulo de inosina.

Assim, é plausível supor que o AMP resultante da hidrólise do ATP e ADP (Capítulo 2) e aquele liberado pelos astrócitos que circundam o tumor (Spychala, 1999) será rapidamente hidrolisado a adenosina pelas células tumorais. A adenosina tem sido descrita como promotora tumoral (Spychala, 1999) e recentemente foi mostrado que esse nucleosídeo aumenta a proliferação em linhagens de gliomas, possivelmente via receptores A3 (Morrone et al., 2003). Além disso, estudos sobre o efeito do T3 em gliomas C6 mostrou uma super-expressão da ecto-5'-nucleotidase (Wink et al., 2003). Como o T3 estimula a proliferação de astrócitos e a liberação de fatores mitogênicos em cultura de C6 (Trentin et al., 1995; Gomes et al., 1999; Trentin et al., 2001), poderia ser pensado que esses efeitos são mediados pela adenosina, resultante da atividade aumentada da ecto-5'-nucleotidase nessas células sob o efeito do hormônio T3.

Uma vez que foi demonstrado que a adenosina quando transformada em inosina assegura proteção aos gliomas contra isquemia (Imura et al., 2000), também poderíamos propor que a adenosina produzida em grandes quantidades pelos gliomas poderia ainda ser utilizada para a produção de inosina, que é o principal produto de degradação acumulado em todas as linhagens estudadas (Capítulo 2, Figura 1).

Finalmente, tem sido sugerido um envolvimento da ecto-5'-nucleotidase em mecanismos que induzem a resistência a drogas, onde a enzima seria importante na recuperação do ATP utilizado pelas proteínas Pgp170 (P-glycoprotein 170) e MRP

(multidrug resistance associated protein), membros da “ATP-binding cassette transporter family”, na extrusão das drogas (Ujházy et al., 1996).

4.5 Expressão das NTPDases em gliomas

A investigação das ecto-nucleotidases responsáveis pela alta hidrólise do ATP em astrócitos, mostrou que a NTPDase 2/CD39L1, conhecida previamente como ecto-ATPase (Kegel et al., 1997), é a principal NTPDase expressa por astrócitos de hipocampo, córtex e cerebelo. Com o objetivo de analisar e comparar as NTPDases expressas em gliomas e astrócitos, foi realizada análise da expressão do mRNA por RT-PCR na linhagem U87, utilizada como representativa dos gliomas. Os resultados mostraram que esta linhagem expressa as NTPDases 3, 5 e 6, como encontrado nos astrócitos (Anexo, Figura 1). Porém não foi encontrado sinal para as NTPDases 1 e 2 que são as principais responsáveis pela hidrólise dos nucleosídeos tri-fosfatados. Para confirmar esses resultados, foram realizados experimentos de Northern blotting utilizando-se como sonda a sequência extracelular da ATPDase 1 e uma sonda preparada por PCR (aproximadamente 700 bp) para a NTPDase 2. Em concordância com os resultados de RT-PCR, não foram encontradas bandas correspondentes na membrana contendo os RNAs e as sondas, no filme de raio X (Anexo, Figura 2). A análise da expressão dessas enzimas por imunocitoquímica, mostra um padrão similar ao obtido com astrócitos (Capítulo 3, Figura 5 e Anexo, 4). A expressão da NTPDase 3 foi mais baixa e a expressão das NTPDases 5 e 6 foi alta, justificando a atividade ADPásica medida pelo método da liberação de fosfato, observada nas linhagens de gliomas estudadas (Capítulo 2, Tabela 1 e Figura 2).

Em conjunto, esses resultados sugerem que a baixa degradação dos nucleosídeos tri-fosfatados, observados em todas as linhagens de gliomas estudadas, poderia ser devido a falta de expressão das NTPDases responsáveis pela hidrólise do ATP, principalmente a NTPDase 2. Recentemente foi mostrado que câncer de pâncreas apresenta uma diminuição na expressão da NTPDase 1, quando comparada com tecido normal, causando uma diminuição da atividade ATPásica nas regiões de crescimento do tecido tumoral (Kittel et al., 2002).

A análise de alguns dados da literatura levaram à interessante observação de que a NTPDase 1 está posicionada no cromossomo 10 (Maliszewski et al., 1994; Chadwick e Frischauf, 1998) que é o cromossomo parcialmente ou inteiramente deletado em 90% dos glioblastomas (Besson et al., 1999). Surpreendentemente, o gene da NTPDase 1 é localizado na mesma região do cromossomo 10 que o supressor tumoral PTEN, a região 10q23.3, frequentemente deletada em glioblastomas (Li et al., 1997; Maier et al., 1999; Besson et al., 1999; Kato et al., 2000; Penninger e Woodgett, 2001). Essa alteração é também observada em linhagens de gliomas (Li et al., 1997; Maier et al., 1999).

Outra observação curiosa, é que o gene da NTPDase 2 está situado no cromossomo 9q34.3 (Chadwick e Frischauf, 1997), que é uma região do cromossomo 9q frequentemente perdida em câncer renal (Povey et al., 1997). Essa é também a região definida para o gene da desordem genética humana da TSC1 (tubular sclerosis I) também chamada de hamartina, caracterizada pelo generalizado desenvolvimento de tumores distintos, chamados hamartomas ou células gigantes de astrocitoma subependimal (subependymal giant cell astrocytoma – SGCA). (Slegtenhorst et al., 1997; Gutmann et al., 2000; Mizuguchi e Takashima, 2001).

O fato da localização dos genes das NTPDases 1 e 2 terem a mesma localização cromossômica de genes envolvidos em supressão tumoral como a PTEN e TSC1, pode sugerir a idéia de que em gliomas a deleção desses supressores tumorais poderia ter afetado também o gene das NTPDases. No caso da NTPDase 1 isso poderia ocorrer concomitantemente com a perda da PTEN, uma vez que esta é uma das maiores alterações encontradas em gliomas de alto grau. Em concordância, a linhagem U87, utilizada para investigação das NTPDases em gliomas, não possui a proteína PTEN funcional, devido a uma deleção de 49 bp no gene (Li et al., 1997; Maier et al., 1999).

Várias possibilidades poderiam ser levantadas para a falta de atividade ATPásica nas linhagens de gliomas. Sem dúvida a deleção do gene da NTPDase 2, poderia ser a mais plausível, porém há também a possibilidade de mutações em aminoácidos ou regiões específicas, que levem a perda somente da atividade ATPásica. Como demonstrado por diversos estudos, a integridade dos domínios transmembrana da enzima, bem como a estrutura quaternária são essenciais para sua afinidade pelos substratos trifosfatados (Heine et al., 2001; Grinthal e Guidotti, 2002). Assim, mutações nessas regiões poderiam levar a perda da atividade ATPásica. Similarmente, foi demonstrado para a NTPDase 1 que a histidina 59 na ACR I possui um papel central na especificidade pela hidrólise do ATP nos tetrâmeros intactos (Grinthal e Guidotti, 2000).

Outra possibilidade que não pode ser excluída é alteração na atividade por regulação. A regulação, tem sido o aspecto menos explorado em relação as E-NTPDases, muito pouco é conhecido sobre como essas proteínas são reguladas. A análise das sequências de aminoácidos mostra que há a presença de sítios de consenso para fosforilação por proteínas quinases em todos os membros da família (Wang et al., 1997;

Chadwick e Frischauf; 1997; Chadwick e Frischauf; 1998; Kegel et al., 1997; Smith e Kirley, 1998). Além disso, foi mostrada a presença de uma banda fosforilada em astrócitos e gliomas U87, coincidente com uma banda reconhecida pelo anticorpo anti-apirase de batatas. Porém esse estudo não permite o conhecimento de qual das NTPDases foi imunodetectada, uma vez que o anticorpo utilizado não possui especificidade para distinguir entre os diferentes membros da família E-NTPDase (Wink et al., 2000). A regulação, através da interação com proteínas também poderia ser uma possibilidade, já que foi demonstrada que a interação da NTPDase 1 através do domínio citoplasmático com proteínas reguladoras é capaz de regular a atividade ADPásica (Wang et al., 1998; Zhong et al., 2000).

Processamento alternativo de mRNA (splicing) tem sido relatado para as NTPDases e poderia ser também uma das possibilidades para a falta de atividade ATPásica, observada nos gliomas. Vlajkovic e colaboradores (1999) mostraram uma variante de splice da ecto-ATPase em cóclea (ecto-ATPase B), que também é expressa em cérebro de ratos. Essa variante de splicing é 50 aminoácidos mais longa que a outra isoforma (ecto-ATPase A) contendo três sítios para caseína quinase-2 não existentes na outra isoforma. Entretanto um sítio para proteína quinase C existente na ecto-ATPase A, foi perdido. Assim, os autores sugerem que esse splicing alternativo, seja uma estratégia para a regulação diferencial da hidrólise do ATP.

Embora a deleção genômica muito provavelmente possa ser responsável pela ausência da NTPDase 1 em gliomas PTEN negativos (como a U87 e U373), um estudo mais aprofundado de gliomas PTEN positivos, poderá indicar se alguns dos outros mecanismos de alteração, discutidos anteriormente, também desempenham um papel na

perda da atividade ATPásica em gliomas. Estudos em gliomas PTEN positivos serão essenciais para elucidar se a baixa atividade ATPásica é um fator fundamental na gliomagênese, ou se a alta prevalência pela deleção da região 10q23.3 é devido a presença da PTEN nesta região.

Serão necessários vários outros estudos para elucidar o porquê da falta de atividade ATPásica nas linhagens de gliomas. Como nas células normais correlatas, astrócitos, a NTPDase 2 é a principal NTPDase expressa e possivelmente a maior responsável pela hidrólise dos nucleosídeos tri-fosfatados, torna-se evidente que essa ectonucleotidase deva ser o alvo das investigações. Entretanto, primeiramente será preciso confirmar os resultados obtidos com as linhagens de gliomas, comparando-os com gliomas obtidos de cirurgias, usando-se como controle tecido cerebral humano normal *pos mortem*. Estes estudos serão essenciais tanto para confirmar o resultado da hidrólise de ATP nas linhagens de gliomas, quanto os resultados de RT-PCR e Northern blotting que foram realizados para a linhagem U87.

4.6 Modelo proposto para o envolvimento do ATP e das NTPDases em gliomas

Os resultados obtidos nos três capítulos e no anexo dessa tese, juntamente com dados da literatura e resultados em preparação no nosso laboratório, sugerem que o ATP extracelular e a adenosina possam ser substâncias que atuem na proliferação dos gliomas, podendo fazer parte dos mecanismos que caracterizam esses tumores, como alta capacidade de invasão e proliferação.

Assim, a análise de todos esses dados nos induziram a propor um modelo para a atuação do ATP extracelular na progressão dos gliomas (Figura 12). Esse modelo está baseado principalmente nas seguintes observações: a recente descoberta de Takano e colaboradores (2001) de que gliomas que liberam glutamato possuem vantagem proliferativa *in vivo*; ATP via receptores P2X₇ pode induzir astrócitos a liberar glutamato (Duan et al., 2003); a baixa atividade ATPásica observada nas linhagens de gliomas (Capítulo 2); e o fato de que gliomas são resistentes à morte por altas concentrações de ATP (Morrone et al., 2003, manuscrito em preparação).

Gliomas liberando glutamato, causariam uma citotoxicidade que provocaria a morte neuronal do tecido que o circunda. Como consequência a morte neuronal provocaria a liberação de vários fatores, entre eles glutamato e altas concentrações de ATP. O ATP liberado, induziria astrócitos a liberarem glutamato, provocando neurotoxicidade e mais

liberação de ATP, num processo de retro-alimentação positiva. Como as células dos gliomas possuem uma baixíssima capacidade de hidrólise de ATP, possivelmente devido a falta de expressão ou defeito funcional da NTPDase 2, o ATP liberado permanecerá acumulado ao redor do tumor. O tecido cerebral que circunda o tumor sofreria os processos de gliose reativa, apoptose e necrose induzidos pelas altas concentrações de ATP, ocasionando a morte neuronal e conseqüentemente mais liberação de glutamato e ATP. Como o glioma parece ser resistente a morte por ATP e o ATP induz sua proliferação, o tumor poderia proliferar e ocupar o espaço proporcionado pelo dano tecidual provocado pelo glutamato e pelo ATP num processo de retroalimentação positiva. Essa proposta está simplificada no esquema da Figura 12.

Se esse modelo for comprovado, poderia ser pensada uma terapia onde o excesso de ATP fosse removido da região que circunda o tumor, principalmente no momento da ressecção cirúrgica, já que a reincidência do tumor é a maior causa de insucesso do tratamento. Para isso poderia ser usada como medicamento a apirase solúvel que é um “scavenger” natural do ATP e já tem sido testada como terapia em sistema circulatório. Além do mais se for confirmado que não há a expressão da NTPDase 2 em gliomas, por terapia gênica esse gene poderia ser inserido nas células do tumor. O estudo da eficácia e viabilidade dessas duas alternativas de terapia na inibição do crescimento de gliomas, estão em andamento no nosso laboratório.

É preciso mencionar, que essa é uma proposta simplificada de um dos eventos que possam estar envolvidos no processo da gliomagênese. Entretanto, devido à urgência de novas terapias mais seletivas e eficazes para essa patologia, todas as observações que levem ao entendimento da patologia merecem ser investigadas. Assim, além de mais estudos que confirmem e aprofundem os resultados obtidos, será necessário investigar se as alterações observadas na atividade catalítica das NTPDases são a causa ou a consequência da gliomagênese.

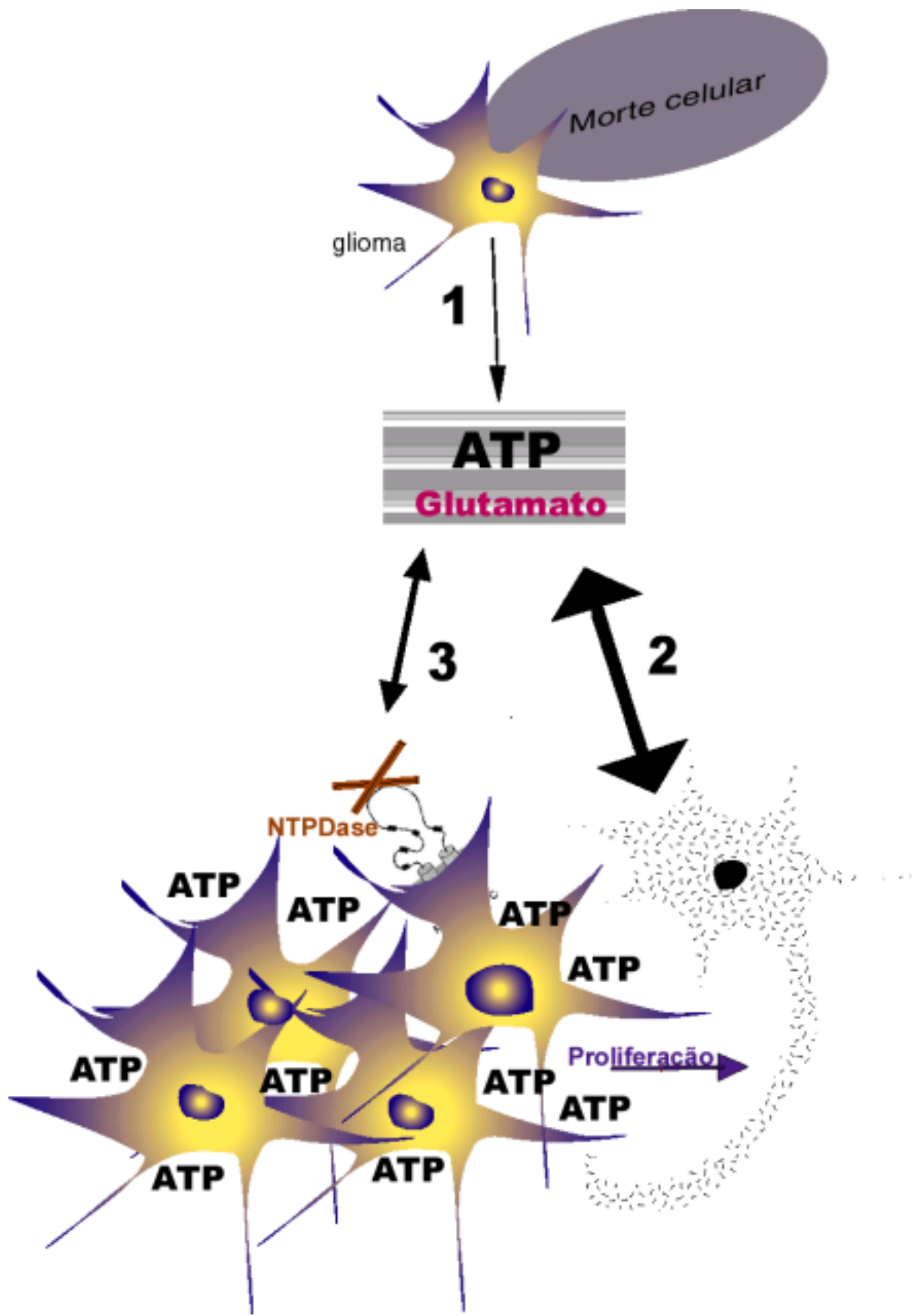


Figura 12. Modelo proposto para o envolvimento do ATP extracelular na progressão dos gliomas.

As células do glioma, através da liberação de glutamato e outras substâncias, causam a morte celular do tecido que circunda o tumor, o que leva à liberação de fatores cuja concentração intracelular é elevada, como o ATP e o próprio glutamato (**seta 1**). Estes fatores induzem a morte neuronal, por sua vez causando uma maior liberação de ATP e glutamato (**seta 2**). Como a degradação do ATP pelos gliomas é extremamente baixa, possivelmente pela deleção das NTPDases 1 e 2 e como os gliomas são resistentes à morte por ATP, o nucleotídeo permanecerá acumulado nas bordas do tumor, contribuindo ainda mais para o processo de retro-alimentação positiva entre morte neuronal, liberação de ATP e glutamato e conseqüentemente proliferação e invasão do glioma (**seta 3**).

5 Conclusões

5.1 Gerais

- 1) Astrócitos de cerebelo apresentam um perfil diferenciado do metabolismo dos nucleotídeos extracelulares e uma maior expressão da ecto-5'-nucleotidase, em comparação com astrócitos de hipocampo e córtex.
- 2) Astrócitos de diferentes regiões cerebrais, expressam a NTPDase 2 (CD39L1) como a principal NTPDase responsável pela hidrólise do ATP.
- 3) Gliomas apresentam um padrão alterado do metabolismo do ATP, possivelmente devido a falta de expressão da NTPDase 2.

5.2 Específicas

- 1) Culturas de astrócitos de diferentes regiões cerebrais foram capazes de hidrolisar completamente o ATP extracelular até adenosina;
- 2) Astrócitos de hipocampo e córtex hidrolisaram de forma semelhante o ATP, ADP e AMP.
- 3) Astrócitos de cerebelo degradaram o ATP extracelular com uma atividade específica, significativamente menor do que hipocampo e córtex.
- 4) Astrócitos de cerebelo degradaram o AMP com uma atividade específica aproximadamente sete vezes maior do que astrócitos de hipocampo e córtex.
- 5) Astrócitos de cerebelo apresentaram uma expressão de mRNA para ecto-5'-nucleotidase de aproximadamente quatro vezes maior do que hipocampo e córtex.

- 6) A ecto-adenosina deaminase foi o principal mecanismo para a metabolização da adenosina em astrócitos das diferentes estruturas cerebrais.
- 7) Astrócitos expressaram mRNA para todos os membros da família E-NTPDase, sendo que a NTPDase 3 (CD39L3) é a menos expressa.
- 8) A NTPDase 2 (CD39L1) foi a principal NTPDase por astrócitos de hipocampo, córtex e cerebelo.
- 9) Diferentes linhagens de gliomas humanos e uma linhagem de glioma de rato apresentaram uma capacidade reduzida de hidrolisar o ATP extracelular quando comparada com astrócitos.
- 10) As linhagens U87, U373 e U138 apresentaram uma maior hidrólise de AMP quando comparadas com astrócitos.
- 11) Dados preliminares sugerem que a falta de atividade ATPásica observada nas linhagens de gliomas possa ser devido a falta de expressão das NTPDases 1 e 2.

6 Perspectivas

- 1) Comparar os resultados de hidrólise de nucleotídeos obtidos com linhagens de gliomas com astrócitos normais de humanos;
- 2) Analisar se tumores obtidos cirurgicamente apresentam a mesma falta de atividade ATPásica observada nas linhagens e comparar o resultado com tecido cerebral normal;
- 3) Confirmar por RT-PCR e Northern blotting a falta de expressão das NTPDases 1 e 2 nas linhagens de gliomas, usando-se tecido cerebral humano como controle positivo;
- 4) Analisar a expressão das NTPDase em tumores obtidos de cirurgia e comparar com tecido cerebral normal; e correlacionar com a expressão da PTEN;
- 5) Se a falta de atividade ATPásica nos gliomas for devido à ausência da expressão da NTPDase 2, investigar o seu papel na proliferação, transfectando as linhagens com plasmídeos para a NTPDase 2 e observar se expressão da enzima, diminui a proliferação; neste caso, as linhagens expressando a NTPDase 2 recombinante poderão ser injetadas no cérebro de ratos e poderá se comparar a formação de tumores *in vivo* com as linhagens que não expressam a enzima; ainda neste caso, poderá se bloquear o gene da NTPDase 2 em astrócitos, através do RNAi e observar se a sua ausência é suficiente para a transformação maligna.

7 Produção científica no Doutorado

WINK M. R., LENZ G., RODNIGHT R., SARKIS J. J. F., BATTASTINI A. M. O. Identification of ecto-apyrase from rat brain as a phosphoprotein. *Mol. Cell. Biochem.* **213**, 11-16, 2000.

WINK M. R., BRAGANHOL E., TAMAJUSUKU A. S. K., CASALI E.A., KARL J., BARRETO-CHAVES M. L. M., SARKIS J. J. F., BATTASTINI A. M. O. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem. Int. In press*, 2003.

WINK M. R., LENZ G., BRAGANHOL E., TAMAJUSUKU A. S. K., SCHWARTSMANN G., SARKIS J. J. F., BATTASTINI A. M. O. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Letters. In press*, 2003.

WINK M. R., TAMAJUSUKU A. S. K., BRAGANHOL E., CASALI E. A., BARRETO-CHAVES M. L. M., SARKIS J. J. F., BATTASTINI A. M. O. Thyroid hormone upregulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 in C6 rat glioma cells. *Mol. Cell. Endocrinol. In press*, 2003.

WINK M. R., BRAGANHOL E., TAMAJUSUKU A. S. K., CSIZMADIA E., ZERBINI L.F., SARKIS J. J. F., BATTASTINI A. M. O., ROBSON S.C. Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 (CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by astrocytes. *J. Neurochem.* Submitted, 2003.

WINK M. R., KACZMAREK K., CSIZMADIA E., ENJYOJI K., BATTASTINI A. M. O., ROBSON S.C. Expression of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase CD39 family members by glioma cell lines. Manuscript in preparation, 2003.

OSÉS J.P., CARDOSO C.M., GERMANO R.A., KIRST I.B., RUCKER B., FURSTENAU C.R., **WINK M.R.**, BONAN D., BATTASTINI A.M.O., SARKIS J.J.F. Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci.* Submitted, 2003.

8 Referências

- ABBRACCHIO M. P., SAFFREY M. J., PÓQUER V., BURNSTOCK G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience* **59**, 67-76, 1994.
- AIRAS L., HELLMAN J., SALMI M., BONO P., PUURUNEN T., SMITH D. J., JALKANEN S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J. Exp. Med.* **182**, 1603-1608, 1995.
- AIRAS L., NIEMELA J., SALMI M., PUURUNEN T., SMITH D. J., JALKANEN S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J. Cell Biol.* **136**, 421-431, 1997.
- ANDOH K., JIN-HUA P., TERASHIMA K., NAKAMURA H., SANO K. Genomic structure and promoter analysis of the ecto-phosphodiesterase I gene (*PDNP3*) expressed in glial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1446**, 213-224, 1999.
- ARAQUE A., PARPURA V., SANZGIRI R. P., HAYDON P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* **22**, 208-215, 1999.
- AUDOUY S., MALLET J., PRIVAT A., RIBOTA M. G. Adenovirus-mediated suicide gene therapy in an in vitro model of reactive gliosis. *Glia* **25**, 293-303, 1999.
- BATTASTINI, A. M. O. “ATP difosfohidrolase de membrana plasmática sináptica de cérebro de ratos: solubilização, caracterização e purificação parcial”. *Tese de*

doutorado, Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná em convênio com o Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

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

BATTASTINI A. M. O., ROCHA J. B. T., BARCELOS C. K., *et al.* Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* **16**, 1303-1310, 1991.

BECKER A. J., LOBACH M., KLEIN H., NORMANN S., NOTHEN M. M., VON DEIMLING A., MIZUGUCHI M., ELGER C. E., SCHRAMM J., WIESTLER O. D., BLUMCKE I. Mutacional analysis of *TSC1* and *TSC2* genes in gangliogliomas. *Neuropathol. App. Neurobiol.* **27**, 105-114, 2001.

BESSON A., ROBBINS S. M., YONG V. W. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur. J. Biochem.* **263**, 605-611, 1999.

BIEDERBICK A., KOSAN C., KUNZ J., ELSASSER H. P. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 19018-19024, 2000.

BIEDERBICK A., ROSE S., ELSASSER H. P. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* **112**, 2473-2484, 1999.

- BODIN P., BURNSTOCK G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* **26**, 959-969, 2001.
- BOECK C. R., SARKIS J. J. F., VENDITE D. Kinetic characterization and immunodetection of ecto-ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in cultured hippocampal neurons. *Neurochem. Int.* **40**, 449-453, 2002.
- BOGLER O., NAGANE M. GILLIS J., HUANG H. J. S., CAVENEE W. K. Malignant Transformation of p53-deficient Astrocytes Is Modulated by Environmental Cues *in vitro*. *Cell Growth and Differ.* **10**, 73-86, 1999.
- BRADFORD H. F., Glial Cells: Mechanical and Functional Supporting Cells of the Nervous System. In: *Chem Neurobiol.* W. H. Freeman and Company, NY, USA Cap. 2, p. 62-110, 1985.
- BRAUN N., BRENDEL P., ZIMMERMANN H. Distribution of 5'-nucleotidase in the developing mouse retina. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **88**, 79-86, 1995.
- BRAUN N., FENGLER S., EBELING C., SERVOS J., ZIMMERMANN H. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem. J.* **351**, 639-647, 2000b.
- BRAUN N., LENZ C., GILLARDON F., ZIMMERMANN M., ZIMMERMANN H. Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res.* **766**, 213-226, 1997.
- BRAUN N., SÉVIGNY J., ROBSON S.C., ENJYOJI K., GUCKELBERGER O., HAMMER K., DI VIRGILIO F., ZIMMERMANN H. Assignment of ecto-nucleoside

- triphosphate diphosphohydrolase-1/CD39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur. J. Neuros.* **12**, 4357-4366, 2000a.
- BRAUN N., ZHU Y., KRIEGLSTEIN J., CULMSEE C., ZIMMERMANN H. Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.* **18**, 4891-4900, 1998.
- BRAUN N., ZIMMERMANN H. Microglial ectonucleotidases: identification and functional roles. *Drug Dev. Res.* **53**, 208-217, 2001.
- BREDEL M., POLLACK I. F. The p21-*Ras* signal transduction pathway and growth regulation in human high-grade gliomas. *Brain res. Reviews* **29**, 232-249, 1999.
- BRENDEL M., POLLACK I. K. The p21-*Ras* signal transduction pathway and growth regulation in high-grade gliomas. *Brain Res. Rev.* **29**, 232-249, 1999.
- BRUNDEGE J. M., DUNWIDDIE T. V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv. Pharmacol.* **39**, 353-391, 1997.
- BURNSTOCK G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* **24**, 509-581, 1972.
- BURNSTOCK G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacol.* **36**, 1127-1139, 1997.
- BURNSTOCK G. Purine-mediated signaling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 182-188, 2001.
- CHADWICK B. P., FRISCHAUF A. M. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. *Mamm. Genome* **8**, 668-672, 1997.
- CHADWICK B. P., FRISCHAUF, A. M. The CD39-like gene family identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues,

and a member of the gene family from drosophila melanogaster. *Genomics* **50**, 357-367, 1998.

CICCARELLI R., D'ALIMONTE I., BALLERINI P., DI IORIO P., GIULIANI P., CACIAGLI F. Non-uniform effect mediated by P2Y receptors on the proliferation of cultured astrocytes. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **87**, 47-48, 1995.

CICCARELLI R., DI IORIO P., BALLERINI P., AMBROSINI G., GIULIANI P., TIBONI G. M., CACIAGLI F. Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **39**, 556-566, 1994.

CICCARELLI R., BALLERINI P., SABATINO G., RATHBONE M. P., D'ONOFRIO M., CACIAGLI F., DI IORIO P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **19**, 395-414, 2001.

COLLINS V.P. Cellular mechanisms targeted during astrocytoma progression. *Cancer Lett.* **188**, 1-7, 2002.

COMMUNI D., GONZALEZ N. S., DETHEUX M., *et al.* Identification of a novel human ADP receptor coupled to G_i. *J. Biol. Chem.* **276**, 41479- 41485, 2001.

COMMUNI D., JANSSENS R., SUAREZ-HUERTA N., ROBAYE B., BOEYNAEMS J. M. Advances in signalling by extracellular nucleotides: the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell. Signal.* **12**, 351-360, 2000.

CUNHA R.A. Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem. Res.* **26**, 979-991, 2001.

CUNHA R.A. Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem. Res.* **26**, 979-991, 2001.

- CUNHA R. A., CORREIA-DE-SÁ P., SEBASTIÃO A. M., RIBEIRO J. A. Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 253-260, 1996.
- CZAJKOWSKI R., BARANSKA J. Cross-talk between the ATP and ADP nucleotide receptor signalling pathways in glioma C6 cells. *Acta Biochim. Polonica* **49**, 877-889, 2002.
- DAI C., HOLLAND E. C. Glioma models. *Biochem. Biophys. Acta* **1551**, M19-M27, 2001.
- DIXON C. J., BOWLER W. B., FLEETWOOD P., GINTY A. F., GALLAGHER J. A., CARRON J. A. Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells via P2-purinoceptors. *Br. J. Cancer* **75**, 34-39, 1997.
- DOMBROWSKI K. E., BREWER K. A., MALECKAR J. R., KIRLEY T. L., THOMAS J. W., KAPP J. A. Identification and partial characterization of ectoATPase expressed by immortalized B lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **340**, 10-18, 1997.
- DRURY A.N., SZENT-GYORGYI A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.(Lond.)* **68**, 213-237, 1929.
- DUAN S., ANDERSON C. M., KEUNG E. C., CHEN Y., CHEN Y., SWANSON R. P2X₇ Receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* **23**, 1320-1328, 2003.

DUARTE F., PITTELLA J. E. H., ÁVILA C. M. In: Filho GB. *et al.* Bogliolo Patologia. 5 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.723-825, 1994.

DUNWIDDIE T. V., MASINO S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* **24**, 31-55, 2001.

ENG L. F., GHIRNIKAR R. S., LEE Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* **25**, 1439-1451, 2000.

ENJOJI K., SÉVIGNY J., LIN Y., FRENETTE P., CHRISTIE P. D., SCHULTE AM ESCH, J., IMAI M., EDELBERGER J. M., RAYBURN H., LECH M., BEELER D. M., CSIZMADIA E., WAGNER D. D., ROBSON S. C., ROSEMBERG R. D. Targeted disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and tromboregulation. *Nature Med.* **5**, 1010-1017, 1999.

FAILER B. U., BRAUN N., ZIMMERMANN H. Cloning, expression, and functional characterization of a Ca^{2+} -dependent endoplasmic reticulum nucleoside diphosphatase. *J. Biol. Chem.* **277**, 36978-36986, 2002.

FILIPPINI A., TAFFS R. E., AGUI T., SITKOVSKY M. V. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J. Biol. Chem.* **265**, 334-340, 1990.

FRANCO R., CASADÓ V., CIRUELA F., SAURA C., MOLLOL J., CANELA E. I., LLUIS C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog. Neurobiol.* **52**, 283-294, 1997.

- FRANCO R., MOLLOL J., CASADÓ V., LLUIS C., CANELA E. I., SAURA C., BLANCO J., CIRUELA F. Ecto-adenosine deaminase: an ecto-enzyme and costimulatory protein acting on a variety of cell surface receptors. *Drug Dev. Res.* **45**, 261-268, 1998.
- FRASSETTO S. S., DIAS R. D., SARKIS J. J. F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol. Cel. Biochem.* **129**, 47-55, 1993.
- GANGADHARAN S. P., IMAI M., RHYNHART K. K., SÉVIGNY J., ROBSON S. C., CONTE M. S. Targeting platelet aggregation: CD39 gene transfer augments nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in injured rabbit arteries. *Surgery* **130**, 296-303, 2001.
- GAO L., DONG L., WHITLOCK J. P. A novel response to dioxin. Induction of ecto-ATPase gene expression. *J. Biol.Chem.* **273**, 15358-15365, 1998.
- GAYLE III R. B., MALISZEWSKI C. R., GIMPEL S. D., *et al.* Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J. Clin. Invest.* **101**, 1851-1859, 1998.
- GIROLAMI V. *et al.* O Sistema Nervoso Central. in: Cotran RS, Kumar V, Collins. Robbins Patologia estrutural e funcional. .ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- GOMES F. C. A., MAIA C. G., MENEZES J. R. L., MOURA NETO V. Cerebelar astrocytes treated by thyroid hormone induce neuronal proliferation. *Glia* **25**, 247-255, 1999.

- GRINTHAL A., GUIDOTTI G. Substitution of His59 converts CD39 apyrase into an ADPase in a quaternary structure dependent manner. *Biochemistry* **39**, 9-16, 2000.
- GRINTHAL A., GUIDOTTI G. Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras. *Biochemistry* **41**, 1947-1956, 2002.
- GROBBEN B., ANCIAUX K., ROYMANS D., STEFAN C., BOLLEN M., ESMANS E. L., SLEGERS H. An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma. *J. Neurochem.* **72**, 826-834, 1999.
- GROBBEN B., DE DEYN P. P., SLEGERS H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, *Cell Tissue Res.* **310**, 257-270, 2002.
- GROBBEN B., DE DEYN P. P., SLEGERS H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, *Cell Tissue Res.* **310**, 257-270, 2002.
- GUTMANN D. H., ZHANG Y., HASBANI M. J., GOLDBERG M. P. PLANK T. L., HENSKE E. P. Expression of the tuberous sclerosis complex gene products, hamartin and tuberin, in central nervous system tissues. *Acta Neurophatol.* **99**, 223-230, 2000.
- HANDA M., GUIDOTTI G. Purification and cloning of atp-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **218**, 916-923, 1996.

HARDEN T. K., LAZAROWSKI E. R. Release of ATP and UTP from astrocytoma cells. *Prog. Brain Res.* **120**, 135-143, 1999.

HAYDON P. G. Glia: listening and talking to the synapse. *Nature* **2**, 185-193, 2001.

HEILBRONN A., ZIMMERMANN H. 5'-nucleotidase activates and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation of PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 1172-1179, 1995.

HEILBRONN A., MAIENSCHNIG V., CARSTENSEN K., GANN W., ZIMMERMANN H. Crucial role of ecto-5'-nucleotidase in differentiation and survival of developing neural cells. *Neuroreport* **29**, 257-261, 1995.

HEINE P., BRAUN N., SEVIGNY J., ROBSON S. C., SERVOS J., ZIMMERMANN H. The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *Eur. J. Biochem.* **268**, 364-373, 2001.

HESS D. T., HESS A. 5'-Nucleotidase of cerebellar molecular layer: reduction in purkinje cell-deficient mutant mice. *Dev Brain res.* **29**, 93-100, 1986.

HEYMANN D., REDDINGTON M., KREUTZBERG G. W. Subcellular localization of 5'-Nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* **43**, 971-978, 1984.

HICKS-BERGER C. A., CHADWICK B. P., FRISCHAUF A. M., KIRLEY T. L. Expression and Characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). *J. Biol. Chem.* **275**, 34041-34045, 2000.

- HOLLAND E. C. Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. *Nature* **2**, 120-129, 2001.
- HOLLAND E. C., CELESTINO J., DAI C., SCHAEFER L., SAWAYA R. E., FULLER G. N. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice, *Nat. Genet.* **25**, 55-57, 2000.
- HOLLOPETER G., JANTZEN H. M. VINCENT D. *et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**, 202-207, 2001.
- HOLTON F. A., HOLTON P. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots: a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* **126**, 124-140, 1954.
- IMAI M., KACZMAREK E., KOZIAK K. *et al.* Suppression of ATP diphosphohydrolase/CD39 in human vascular endothelial cells. *Biochemistry* **38**, 13473-13479, 1999a.
- IMAI M., TAKIGAMI K., GUCKELBERGER O. *et al.* Modulation of nucleotide triphosphatase diphosphohydrolase-1 (NTPDase-1)/*cd39* in xenograft rejection. *Mol. Medicine* **5**, 743-752, 1999b.
- IMAI M., TAKIGAMI K., GUCKELBERGER O. *et al.* Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. *Transplantation* **70**, 864-870, 2000.

- IMURA T., SHIMOHAMA S. Opposing effects of adenosine on the survival of glial cells exposed to chemical ischemia. *J. Neurosci. Res.* **62**, 539-546, 2000.
- JAMES G., BUTT A. M. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca^{2+} signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* **447**, 247-260, 2002.
- KACZMAREK E., KOZIAK K., SÉVIGNY J. *et al.* Identification and characterization of CD39/vascular ATP-Diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **271**, 33116-33122, 1996.
- KANSAS G. S., TEDDER T. F. Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce leukocyte function-associated antigen-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase dependent pathway. *J. Immunol.* **147**, 4094-4102, 1991.
- KAS-DEELEN A. M., BAKKER W. W., OLINGA P. *et al.* Cytomegalovirus infections increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5' nucleotidase (CD73) on endothelial cells. *FEBS Lett.* **491**, 21-25, 2001.
- KAST B. The best supporting actors. *Nature* **412**, 674-676, 2001.
- KATO H., KATO S., KUMABE T. *et al.* Functional evaluation of *p53* and *PTEN* gene mutations in gliomas. *Clinical Cancer Res.* **6**, 3937-3943, 2000.
- KAWASHIMA Y., NAGASAWA T., NINOMIYA H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* **96**, 2157-2162, 2000.

- KEGEL B., BRAUN N., HEINE P., MALISZEWSKI C. R., ZIMMERMANN H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmac.* **36**, 1189-1200, 1997.
- KIMELBERG H. K., NOREMBERG M. D., Astrocytes, *Sci. Am.* **260**, 66-76, 1989.
- KIRLEY T. L., YANG F., IVANENKOV V. V. Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: the importance of conserved glycine residues and the identification of additional conserved proteins motifs in eNTPDases. *Arch. Biochem. Biophys.* **395**, 94-102, 2001.
- KIRLEY T. L. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**, 1076-1081, 1997.
- KITTEL A., GARRIDO M., VARGAS G. Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 549-555, 2002.
- KOMOSZYNSKI M., WOJTCZAK A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochem. Biophys. Acta* **1310**, 233-241, 1996.
- KOZIAK K., SÉVIGNY J., ROBSON S. C., SIEGEL J. B., KACZMAREK E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb. Haemost.* **82**, 1538-1544, 1999.
- LAWS JR E. R., SHAFFREY M. E. The inherent invasiveness of cerebral Gliomas: implications for clinical management. *Int. J. Neurosci.* **17**, 413-420, 1999.

- LEE H. Y., CLAIR T., MULVANEY P. T. et al. Stimulation of tumor cell motility linked to phosphodiesterase catalytic site of autotaxin. *J. Biol. Chem.* **271**, 24408-24412, 1996.
- LENZ G., GOTTFRIED C., LUO Z., AVRUCH J., RODNIGHT R., NIE W. J., KANG Y., NEARY J. T. P2y purinoceptor subtypes recruit different Mek activators in astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 927-936, 2000.
- LENZ G., MANOZZO L., GOTTARDO S., ACHAVAL M., SALBEGO C., RODNIGHT R. Temporal profiles of the in vitro phosphorylation rate and immunoccontent of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after kainic acid-induced lesions in area CA1 of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. *Brain Res.* **764**, 188-196, 1997.
- LEWIS-CARL S., KIRLEY T. L. Immunolocalization of the ecto-ATPase and ecto-apyrase in chicken gizzard and stomach. *J. Biol. Chem.* **272**, 23645-23652, 1997
- LI J., YEN C., LIAW D. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947, 1997.
- MAHER E. A., FURNARI F. B., BACHOO R. M., ROWITCH D. H., LOUS D. N., CAVENEY W. K., DEPINHO R. A. Malignant glioma, genetics and biology of a grave matter, *Genes Dev.* **15**, 1311-1333, 2001.
- MAIENSCHNIG V., ZIMMERMANN H. Immunocytochemical localization of Ecto- 5'-Nucleotidase in cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience* **70**, 429- 438, 1996.

- MAIER D., JONES G., LI X., SCHONTHAL A. H., GRATZL O., MEIR E. G. V., MERLO A. The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res.* **59**, 5479-5482, 1999.
- MALISZEWSKI C. R., DELESPESE G. J., SCHOENBORN M. A. *et al.* The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* **153**, 3574-3583, 1994.
- MARANGOS P. J., PATEL J., STIVERS J. Ontogeny of adenosine binding sites in rat forebrain and cerebellum. *J. Neurochem.* **39**, 25- 30, 1982.
- MARCUS A. J., BROEKMAN M. J., DROSOPOULOS J. H. F. *et al.* The endothelial cell ecto-adenosine triphosphatase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J. Clin. Invest.* **99**, 1351-1360, 1997.
- MASTERS J. R. W. Human cancer cell lines: fact and fantasy, *Nature Ver. Molec. Cell. Biol.* **1**, 233-236, 2000.
- MATEO J., HARDEN T. K., BOYER J. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 396-402, 1999.
- MENDONÇA A., SEBASTIÃO A. M., RIBEIRO J. A. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res. Rev.* **33**, 258-274, 2000.
- MEYERHOF O. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.* **157**, 105-119, 1945.
- MIZUGUCHI M., TAKASHIMA S. Neuropathology of tuberous sclerosis. *Brain Dev.* **23**, 508-515, 2001.

- MORRONE F. B., JACQUES-SILVA M. C., HORN A. P., BERNARDI A., SCHWARTSMANN G., RODNIGHT R., LENZ G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines, *J. Neuro-oncology. In press*, 2003.
- MULERO J. J., YEUNG G., NELKEN S. T., FORD J. E. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J. Biol. Chem.* **274**, 20064-20067, 1999.
- MULERO J. J., YEUNG G., NELKEN S. T., BRIGHT J. M., MCGOWAN D. W., FORD J. E. Biochemical characterization of CD39L4. *Biochemistry* **39**, 12924-12928, 2000.
- MURPHY D. M., IVANENKOV V. V., KIRLEY T. L. Identification of cysteine residues responsible for oxidative cross-linking and chemical inhibition of human nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase 3. *J. Biol. Chem.* **277**, 6162-6169, 2002
- NAGY A. K., KNOWLES A. F., NAGAMI G. T. Molecular cloning of the chicken oviduct ecto-ATP-Diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **273**, 16043-16049, 1998.
- NEARY J. T., BAKER L., JORGENSEN S. L., NOREMBERG M. D. Extracellular ATP induces stellation and increases glial fibrillary acidic protein content and DNA synthesis in primary astrocyte cultures. *Acta Neuropathol.* **87**, 8-13, 1994.
- NEARY J. T., RATHBONE M. P., CATTABENI F., ABBRACCHIO M. P., BURNSTOCK G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* **19**, 13-18, 1996.

- NEARY J. T., KANG Y., BU Y., YU E., AKOUNG K., PETERS C. M. Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent PKC ERK pathway distinct from the PI-PLC-calcium pathway. *J. Neurosci.* **19**, 4211-4220, 1999.
- NEARY J. T., RATHBONE M. P., CATTABENI F., ABBRACCHIO M. P., BURNSTOCK G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* **19**, 13-18, 1996.
- NEARY J. T., WHITTEMORE S. R., ZHU Q., NOREMBER M. D. Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by FGF and extracellular ATP. *J. Neurochem.* **63**, 490-494, 1994.
- NEARY J. T., ZHU Q. Signaling by ATP receptors in astrocytes. *Neuroreport* **5**, 1617-1620, 1994.
- NEDERGAARD M., TAKANO T., HANSEN A.J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Rev. Neurosci.* **3**, 748-755, 2002.
- OLIVEIRA E. M., BATTASTINI A. M. O., MEIRELLES M. N. L., MOREIRA C. M., DIAS R. D., SARKIS J. J. F. Characterization and localization of Na⁺ ATP-Diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5.) in sarcolemmal membrane from rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* **170**, 115-123, 1997.
- PÁEZ J. G., RECIO J. A., ROUZAUT A., NOTARIO V. Identity between the *PCPH* proto-oncogene and the *CD39L4* (*ENTPD5*) ectonucleotidase triphosphate diphosphohydrolase gene. *Int. J. Oncol.* **19**, 1249-1254, 2001.
- PENNINGER J. M., WOODGETT J. PTEN-coupling tumor suppression to stem cells? *Science* **294**, 2116-2118, 2001.

- PILLA C., EMANUELLI T., FRASSETO S. S., BATTASTINI A. M. O., DIAS R. D., SARKIS J. J. F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* **7**, 225-230, 1996.
- PLESNER L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* **158**, 141-214, 1995.
- QAWI I., ROBSON S. C. New developments in anti-platelet therapies: potencial use of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase in thrombotic disorders. *Cur. Drug Targets* **1**, 285-296, 2000.
- RALEVIC V., BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Review* **50**, 413-92, 1998.
- RATHBONE M. P., MIDDLEMISS P. J., GYSBERS J. W., ANDREW C., HERMAN M. A. R., CICCARELLI R., DI IORIO P., CACIAGLI F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* **59**, 663 –690, 1999.
- RATHBONE M. P., MIDDLEMISS P. J., KIM J. K., GYSBERS J. W., DEFORGE S. P., SMITH R. W., HUGHES D. W. Adenosine and nucleotides stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells. *Neurosci. Res.* **13**, 1- 17, 1992.
- ROBSON S. C., ENJYOJI K., GOEPFERT C., IMAI M., KACZMAREK E., LIN Y., SÉVIGNY J., WARNY M. Modulation of extracellular nucleotide-mediated signaling by CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1. *Drug Dev. Res.* **53**, 193-207, 2001.

- SAKURA H., NAGASHIMA S., NAKASHIMA A., MAEDA M. Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thrombosis res.* **91**, 83-89, 1998.
- SARKIS J. J. F., SALTO C. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* **26**, 871-876, 1991.
- SARKIS J. J. F., GUIMARAES J. A., RIBEIRO J. M. C. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. *Biochem. J.* **233**, 885-891, 1986.
- SARKIS J. J. F., BATTASTINI A. M. O., OLIVEIRA E. M., FRASSETTO S. S., DIAS R. D. ATP-Diphosphohydrolase: an overview. *Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)*, **47**, 131-136, 1995.
- SCHETINGER M. R. C., BONAN C. D., SCHIERHOLT R. C., WEBBER A., ARTENI N., EMANUELLI T., DIAS R. D., SARKIS J. J. F., NETO C. A. Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: A possible link between preconditioning and adenosine production. *J. Stroke Cerebr. Dis.* **7**, 1-3, 1998.
- SCHOEN S. W., KREUTZBERG G. W. Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult rat dentate gyrus. *Exp. Neurol.* **127**, 106-118, 1994.
- SCHOEN S. W., GRAEBER M. B., TÓTH L., KREUTZBERG G. W. 5'- Nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for migrating nerve cells? *Dev. Brain Res.* **39**, 125-136, 1988.

- SEBASTIÃO A. M., RIBEIRO J. A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Tips* **21**, 341-346, 2000.
- SERVOS J., REILANDER H., ZIMMERMANN H. Catalytically active soluble ecto-5'-nucleotidase purified after heterologous expression as a tool for drug screening. *Drug Dev. Res.* **45**, 269-276, 1998.
- SÉVIGNY J., SUNDBERG C., BRAUN N. *et al.* Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase) and NTPDase 2 have implications for thromboregulation. *Blood* **99**, 2801-2809, 2002.
- SHI J. D., KUKAR T., WANG C.Y. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (*LALPI*). *J. Biol. Chem.* **276**, 17474-17478, 2001.
- SLEGTENHORST M. V., HOOGT R., HERMANS C. *et al.* Identification of the tuberous sclerosis gene *TSC1* on chromosome 9q34. *Science* **277**, 805-808, 1997.
- SMITH T. M., HICKS-BERGER C. A., KIM S., KIRLEY T. L. Cloning, expression, and characterization of a soluble calcium-activated nucleotidase, a human enzyme belonging to a new family of extracellular nucleotidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **406**, 105-115, 2002.
- SMITH T. M., KIRLEY T. L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys. Acta* **1386**, 65-78, 1998.

- SMITH, T. M., KIRLEY, T. L. Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-ATPase: evidence that the E-type ATPases are related to the Actin/Heat shock 70/Sugar kinase superfamily. *Biochemistry* **38**, 321-328, 1999a.
- SMITH T. M., KIRLEY T. L. Glycosylation is essential for functional expression of a human brain Ecto-ATPase. *Biochemistry* **38**, 1509-1516, 1999b.
- SMITH T. M., LEWIS-CARL S.A., KIRLEY T. L. Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: inactivation and conversion of an ecto-ATPase to an ecto-NTPase. *Biochemistry* **38**, 5849-5857, 1999.
- SPYCHALA J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* **87**, 161-173, 2000.
- TAKANO T., LIN J. C., ARCUINO G., GAO Q., YANG J., NEDERGAARD M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med.* **7**, 1010-1015, 2001.
- TRENTIN A. G., ALVAREZ-SILVA M., MOURA NETO V. Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. *Am. J. Physiol.* **281**, E1088-E1094, 2001.
- TRENTIN A. G., MOURA NETO V. T₃ affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. *Neuroreport* **6**, 293-296, 1995.
- UJHAZY P., BERLETH E. S., PIETKIEWICZ J. M., KITANO H., SKAAR J. R., EHRKE M. J., MIHICH E. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. *Int. J. Cancer* **68**, 493-500, 1996.

- VASCONCELOS E. G., FERREIRA, S. T., CARVALHO T. M. U. *et al.* Partial purification and immunohistochemical localization of ATP Diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **271**, 22139-22145, 1996.
- VASCONCELOS E. G., NASCIMENTO P. S., MEIRELLES M. N. L. *et al.* Characterization and localization of an ATP-Diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**, 205-214, 1993.
- VAZQUEZ-CHONA F., GEISERT E. E. JR. N-cadherin at the glial scar in the rat. *Brain Res.* **838**, 45-50, 1999.
- VLAJKOVIC S. M., HOUSLEY G. D., GREENWOOD D., THORNE P. R. Evidence for alternative splicing of ecto-ATPase associated with termination of purinergic transmission. *Mol. Brain Res.* **73**, 85-92, 1999.
- VOLLMAYER P., KOCH M., BRAUN N., HEINE P., SERVOS J., ISRAR E., KEGEL B., ZIMMERMANN H. Multiple ecto-nucleotidase in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression. *J. Neurochem.* **78**, 1019-1028, 2001.
- WANG T. F., GUIDOTTI G. CD39 is an Ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺) apyrase. *J. Biol. Chem.* **271**, 9898-9901, 1996.
- WANG T. F., OU Y., GUIDOTTI G. The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **273**, 24814-24821, 1998.

- WANG T. F., ROSEMBERG P. A., GUIDOTTI G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol. Brain Res.* **47**, 295-302, 1997.
- WINK M. R., TAMAJUSUKU A. S. K., BRAGANHOL E., CASALI E. A., BARRETO-CHAVES M. L. M., SARKIS J. J. F., BATTASTINI A. M. O. Thyroid hormone upregulates ecto-5'-nucleotidase/cd73 in Rat C6 glioma cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *In press*, 2003.
- WINK M. R., LENZ G., RODNIGHT R., SARKIS J. J. F., BATTASTINI A. M. O. Identification of ecto-apyrase from rat brain as a phosphoprotein. *Mol. Cell. Biochem.* **213**, 11-16, 2000.
- YANG F., HICKS-BERGER C. A., SMITH T. M., KIRLEY T. L. Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: the importance of residues in the apyrase conserved regions. *Biochemistry* **40**, 3943-3950, 2001.
- YEUNG G., MULERO J. J., MCGOWAN D.W., BAJWA S.S., FORD J.E. CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. *Biochemistry* **39**, 12916-12923, 2000.
- ZHONG X., GUIDOTTI G. A yeast golgi E-type ATPase with an unusual membrane topology. *J. Biol.Chem.* **274**, 32704-32711, 1999.
- ZHONG X., MALHOTRA R., GUIDOTTI G. Regulation of yeast ectoapyrase Ynd1p activity by activator subunit Vma13p of vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 35592-35599, 2000.

ZHU Y., PARADA L. F. The molecular and genetic basis of neurological tumors. *Nature Cancer Reviews* **2**, 616-625, 2002.

ZIGANSHIN A. U., ZIGANSHINA L. E., BURNSTOCK G. P2 receptors: theoretical background for the use in clinical practice. *Bull. Exp. Biol. Med.* **134**, 313-317, 2002.

ZIGMOND, M.J., BLOOM, F.E., LANDIS, S.C., ROBERTS, J.L., ROBERTS, J.L., SQUIRE., LR. *Fundamental Neuroscience*, San Diego, Academic Press, 1999. p.58-70.

ZIMMERMANN H., BRAUM 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.

ZIMMERMANN H. Two novel families of ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties, and a search for function. *Trends Pharm. Sci.* **20**, 231-236, 1999.

ZIMMERMANN H. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev. Res.* **39**, 337-352, 1996b.

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

ZIMMERMANN H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **49**, 589-618, 1996a.

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