

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Avaliação das atividades de ectonucleotidases em sinaptossomas de  
sistema nervoso central na condição de deprivação de hormônios  
esteróides e na comparação entre machos e fêmeas submetidos à tarefa de  
esquiva inibitória**

**BÁRBARA RÜCKER**

**Orientador:**

**Prof. Dr. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para obtenção  
do título de mestre em Bioquímica.**

**Porto Alegre**

**2004**

**UFRGS**  
**Inst. de Ciências Básicas da Saúde**  
**Biblioteca**

## AGRADECIMENTOS

Ao Sarkis, por ser mestre, mas acima de tudo amigo. Agradeço a Deus por ter me proporcionado o convívio com uma pessoa tão especial e única para mim. Pelo carinho com que me ensinou sobre a pesquisa e sobre a vida. Pela confiança, ajuda e orientação. Muito obrigada.

À Carla, uma pessoa excepcional. Um grande exemplo para todos. Obrigada pela amizade e pela disposição em me ajudar muito neste trabalho.

À Ana, pela ajuda sempre que necessária, pelos ensinamentos, pela amizade e carinho.

À Simone Berti, por ter me dado a oportunidade de conhecer o Sarkis e seu trabalho.

À Cris, por ser meu anjo da guarda. Pela grande amizade, pelos sábios conselhos, pelo incentivo e pela paciência. Tua ajuda foi fundamental para realização deste trabalho.

À Grace, um exemplo de professora e pesquisadora. Minha amiga de todas as horas, minha grande incentivadora e colaboradora. Exemplo de dinamismo e coragem. Obrigada pela preciosa ajuda neste trabalho.

À Dani, pela grande ajuda na realização das cirurgias, experimentos, pela troca de idéias e angústias.

Aos queridos colegas e amigos dos laboratórios 22 e 24, principalmente à Japinha (Ale T.), à Ale Bruno, à Ana Paula, à Déia, à Eliz, ao Émerson, ao Felipe, à Fernanda, à Gi, ao Jean, à Leandre, à Luci, à Márcia e ao Guido, ao Rafa, à Rô, ao Spiller, à Tiana e à Vanessinha querida, pela amizade, pelas risadas, pela troca de experiências e pela ajuda no dia-a-dia.

À Professora Maria Luiza Barreto-Chaves (Dep. Anatomia, ICB, USP) e sua aluna Marcela Carneiro-Ramos pela excelente colaboração e disposição para ajudar neste trabalho.

À Denise, por cuidar do nosso material com tanto cuidado e competência.

À professora Carla Dalmaz por ter gentilmente cedido os pelets para reposição hormonal e à sua bolsista, a Martinha, por tê-los confeccionado.

À todos os professores, colegas e funcionários do departamento que me ajudaram de alguma maneira. Um obrigado especial ao Valeri, pela sua disposição em arrumar ratas em períodos difíceis...

A todos os meus amigos, principalmente à Camille, à Ciça, à Lurdinha, à Mônica, ao Claiton, à Beta e ao Paulo, à Nati, à Lu, ao Júnior, ao Gonzatti e ao Tiago, pessoas muito importantes na minha vida e que eu sei que torcem muito por mim.

Aos meus pais Ellen e Rui, que são meu pensamento e meu coração. Obrigada pelo exemplo, pelo amor e pelo incentivo de todos os dias.

Aos meus queridos irmãos, Xande, Jorge e Aninha, pelo carinho, incentivo e admiração.

À toda minha família que sempre torceu pelas minhas conquistas.

À CAPES pela bolsa concedida durante meu mestrado e à FAPERGS pela bolsa de iniciação científica.

À Deus por ter me dado força e determinação quando eu mais precisei.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	II
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	III
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 HORMÔNIOS ESTERÓIDES.....	1
1.2 CICLO ESTRAL, OVARECTOMIA E REPOSIÇÃO HORMONAL EM RATAS.....	4
1.3 HORMÔNIOS ESTERÓIDES E ECTO-ATPase .....	5
1.4 SISTEMA PURINÉRGICO.....	6
1.5 ECTONUCLEOTIDASES.....	9
1.6 MEMÓRIA E SISTEMA PURINÉRGICO.....	13
1.7 MODULAÇÃO DA MEMÓRIA E HORMÔNIOS ESTERÓIDES.....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	
<b>3.1 CAPÍTULO 1 – RÜCKER, B.; POCHMANN, D.; FÜRSTENAU, C.R.; CARNEIRO-RAMOS, M.S.; BATTASTINI, A.M.O. ; BARRETO-CHAVES, M.L.M.; SARKIS, J.J.F. Effects of Steroid Hormones in synaptosomal ectonucleotidases activities from hippocampus and cortex of adult female rats. Submetido à revista General and Comparative Endocrinology .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 CAPÍTULO 2 - RÜCKER, B.; PEREIRA, G.S.; FÜRSTENAU, C.R.; BONAN, C.D.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F. Inhibitory Avoidance Task Reveals Differences in</b>	

Ectonucleotidase Activities between Male and Female Rats. Submetido à revista Neurochemical Research.....	42
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>75</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>

## RESUMO

Os hormônios esteróides possuem potentes efeitos na estrutura e funcionamento do cérebro adulto. Nas últimas décadas, surgiram evidências que suportam um possível papel neuroprotetor do estrogênio, mas por outro lado, estão surgindo dados conflitantes questionando esses possíveis efeitos protetores. Recentemente, demonstrou-se uma perda de proteção e/ou o aumento de riscos para a saúde com a terapia de reposição hormonal. Nucleotídeos extracelulares são envolvidos em diversos processos patofisiológicos no sistema nervoso central. O ATP é conhecido por exercer potentes efeitos, podendo agir como neurotransmissor ou neuromodulador, enquanto a adenosina é conhecida como um nucleosídeo com propriedades neuroprotetoras e efeitos modulatórios. Considerando que flutuações nos níveis de estrogênio podem interferir na atividade de enzimas de membrana, além de modular eventos fisiológicos como a memória, resolvemos investigar as atividades de ectonucleotidases em sinaptossomas de sistema nervoso central na condição de privação de hormônios esteróides e na comparação entre machos e fêmeas submetidos à tarefa de esquiiva inibitória. Nossos resultados demonstraram um aumento na atividade da 5'-nucleotidase em sinaptossoma de córtex de ratas ovariectomizadas e os resultados do RT-PCR sugerem que o aumento ocorra por uma maior expressão da enzima. Já a terapia de reposição hormonal reverteu o efeito, fazendo com que a hidrólise retornasse aos níveis do controle. Os hormônios 17  $\beta$ -estradiol, sulfato de dehidroepiandrosterona e sulfato de pregnenolona foram testados *in vitro*, porém não foram observadas mudanças na hidrólise dos nucleotídeos. Este trabalho mostra que pode haver uma relação entre os hormônios esteróides e a 5'-nucleotidase e que as alterações nos níveis de adenosina podem prover algum entendimento a respeito dos efeitos discutíveis que os últimos trabalhos têm demonstrado a respeito da reposição hormonal.

Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a tarefa de esquiiva inibitória está associada com uma diminuição tempo-dependente na atividade de ectonucleotidases de hipocampo em ratos machos adultos. Para avaliarmos se a via das ectonucleotidases é modulada durante o processo de formação da memória em fêmeas, assim como observado em machos, avaliamos o efeito do treino de esquiiva inibitória sobre a atividade sinaptossomal da NTPDase e da 5'-nucleotidase de hipocampo de ratos de ambos os sexos. No entanto, nosso estudo demonstrou não haver mudanças nas atividades das ectonucleotidases hipocampais de ratas treinadas e mortas imediatamente ou 30 minutos após o treino de esquiiva inibitória. As diferenças bioquímicas entre os gêneros na tarefa de esquiiva inibitória nos levam a sugerir que esta distinção provavelmente exista mais por diferenças naturais e mecanismos sexo-específicos do que por diferenças em habilidades cognitivas.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Resumo dos quatro dias do ciclo estral de ratas.....	4
<b>FIGURA 2.</b> Prognóstico da topografia das ectonucleotidasas de membrana.....	10
<b>FIGURA 3.</b> Liberação de ATP na fenda sináptica e as ações desencadeadas por esse neurotransmissor pré- e pós-sinápticamente.....	13

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina 5'-difosfato

AMP – adenosina 5'-monofosfato

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico

AMPC – adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico

ATP – adenosina 5'-trifosfato

DHEAS – sulfato de diidroepiandrosterona

DPCPX - 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina

GABA -  $\gamma$ -ácido aminobutírico

LTD – depressão de longa duração

LTP – potenciação de longa duração

NMDA – *N*-metil-*D*-aspartato

OVX – ovariectomia

PKA – proteína quinase A, proteína quinase dependente de AMP cíclico

PKC – proteína quinase C

SNC – sistema nervoso central



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Nos últimos anos, tem sido evidenciado um aumento no número de estudos que demonstram o papel dos hormônios esteróides em diversos processos patológicos e fisiológicos. Evidências recentes demonstram que estes hormônios exercem importantes ações em áreas consideradas não-reprodutivas por natureza, como regiões cerebrais que influenciam o aprendizado e a memória, ossos e sistemas cardiovascular e imunológico (WISE, 2003).

No cérebro, assim como em outros órgãos alvo, os hormônios esteróides exercem tanto efeitos genômicos quanto não genômicos (ALONSO-SOLEIS et al., 1996; GENAZZANI et al., 1996; VALVERDE & PARKER, 2002). Os efeitos genômicos são os efeitos clássicos de ação propostos e consistem na ativação específica de receptores que modulam a transcrição gênica e a síntese de proteínas. Em particular, os hormônios gonadais modulam a síntese, liberação e metabolismo de diversos neuropeptídeos e transmissores neuroativos, bem como a expressão de seus receptores (ALONSO-SOLEIS et al., 1996; GENAZZANI et al., 1996; PANAY et al., 1996; GENAZZANI et al., 2002). Os efeitos não genômicos correspondem a um novo mecanismo de ação hormonal proposto nos últimos anos. Acredita-se que os efeitos poderiam ocorrer em três diferentes níveis celulares: membrana, citosol e núcleo. Os sítios alvos na membrana incluiriam receptores esteróides similares aos receptores nucleares, receptores esteróides não-clássicos e canais iônicos ativados por voltagem e ligante. A ativação de alguns destes receptores desencadearia eventos sinalizadores levando a uma ativação de diferentes quinases. Já em relação aos alvos citosólicos, acredita-se que sejam os receptores “translocadores”

clássicos, sendo a resposta citosólica associada com a ativação de quinases. A ativação de ambos os alvos de membrana e citosol poderia levar, por último, a uma mudança na expressão gênica. O terceiro nível de ação seriam os alvos nucleares, que afetariam a modulação direta da expressão gênica através da interação de receptores complexos com o elemento de resposta hormonal no DNA ou com outros fatores de transcrição (VALVERDE & PARKER, 2002).

Independente do mecanismo de ação, os hormônios esteróides possuem potentes efeitos na estrutura e funcionamento do cérebro adulto. Em particular, flutuações nos níveis de estrogênio através de terapia de reposição hormonal ou naturalmente através do ciclo reprodutivo em fêmeas intactas, levam a um grande número de mudanças morfológicas (STEWART & KOLB, 1994; MURPHY & SEGAL, 1996; WOOLEY, 1998), neuroquímicas (LUINE et al., 1998; GIBBS, 2000) e eletrofisiológicas (CORDOBA-MONTOYA & CARRER, 1997; WOOLEY, 1998; DESMOND et al., 2000; GOOD et al., 2000).

Nas últimas décadas, surgiram evidências que suportam um possível papel neuroprotetor do estrogênio em humanos e roedores. Estudos clínicos têm demonstrado que o estrogênio é capaz de influenciar a memória, a cognição, o humor e pode proteger contra doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e injúrias associadas ao choque cerebrovascular (WISE, 2002). Além disso, um recente trabalho demonstrou que a exposição exógena ao estradiol não somente diminui a resposta a numerosas formas de insulto, mas que o cérebro regula positivamente a síntese de estradiol e a expressão de receptores estrogênicos em sítios de injúria (GARCIA-SEGURA et al., 2001). Em relação a um possível papel neuroprotetor do estrogênio, demonstrou-se que ratas adultas apresentam baixa mortalidade e menos dano neuronal quando comparadas a machos da

mesma idade que sofreram uma oclusão arterial cerebral (ALKAYED et al, 1998; DHANDAPANI & BRANN, 2002). Sugeriu-se que o fator ovariano influencia na proteção, quando estudos com ratas castradas tiveram eliminado o fator de proteção endógeno observado em fêmeas após isquemia cerebral (ALKAYED et al, 1998; DHANDAPANI & BRANN, 2002). Além disso, os níveis séricos de estradiol têm sido inversamente correlacionados com danos devido a choques isquêmicos (LIAO et al., 2001), e estudos têm demonstrado que a reposição de estrogênio em ratas ovariectomizadas retorna a proteção cerebral a níveis similares aos observados em animais intactos (SIMPKINS et al., 1997; DUBAL et al., 1998; ZHANG et al., 1998; FUKADA et al., 2000; ROOF et al., 2000; DUBAL et al., 2001).

Por outro lado, dados conflitantes questionam os possíveis efeitos protetores do estradiol. Recentemente, demonstrou-se uma perda de proteção e/ou o aumento de riscos para a saúde com a terapia de reposição hormonal, devido à ocorrência de choque cerebrovascular (VISCOLI et al., 2001), doenças cardiovasculares (HULLEY et al., 1998), doença de Alzheimer (MULNARD et al., 2000) e câncer de mama invasivo (WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS, 2002).

Logo, os efeitos dos hormônios esteróides no cérebro e no corpo das mulheres mostram-se controversos, aumentando, assim, o questionamento e a cautela para a utilização da reposição hormonal. A heterogeneidade entre os estudos dificulta uma generalização e a indicação de uma terapia de reposição hormonal torna-se cada vez mais discutida. Atualmente, encontram-se na literatura diversos modelos animais que são utilizados com o propósito de ampliar os estudos sobre reposição hormonal e ações do estrogênio.

## 1.2 CICLO ESTRAL, OVARIECTOMIA E REPOSIÇÃO HORMONAL EM RATAS

O ciclo reprodutivo em ratas é chamado ciclo estral e é caracterizado por quatro fases: metaestro (ou diestro I), diestro (ou diestro II), proestro e estro (LONG & EVANS, 1922; FREEMAN, 1988) (Figura 1).

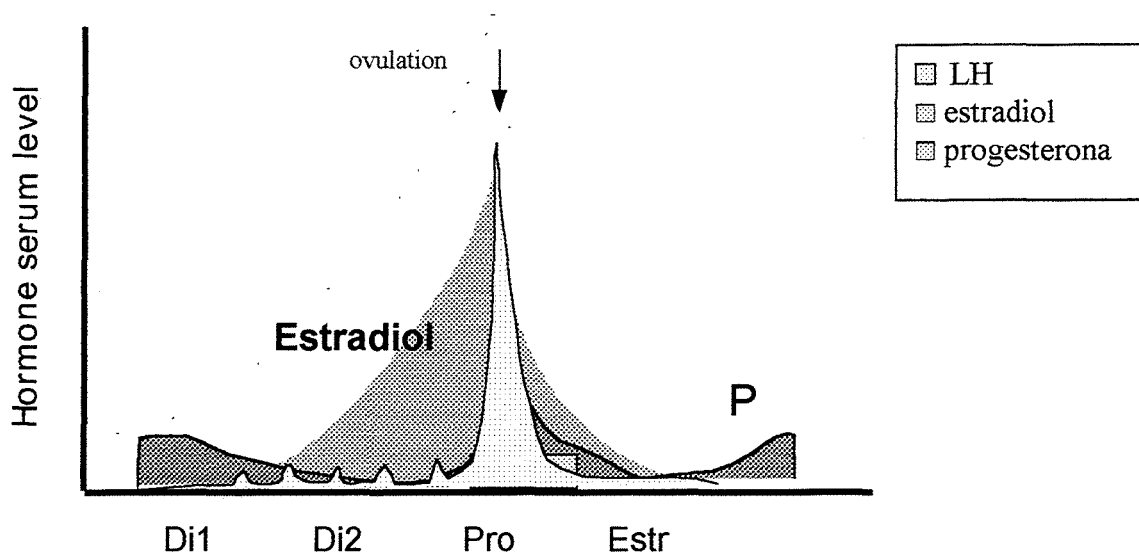


Figura 1. Resumo dos quatro dias do ciclo estral de ratas: 2 dias para diestro I e II (baixa concentração de estradiol e gradual aumento do mesmo), 1 dia para proestro (pico de estradiol e pequena concentração de progesterona - período da ovulação) e 1 dia para o estro (decréscimo de estradiol).

O ciclo estral em ratas dura, em média, quatro dias (LONG & EVANS, 1922; MANDL, 1951; FREEMAN, 1988), o que torna estes animais um modelo ideal para investigações de mudanças que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (SPORNITZ et al., 1999; MARCONDES et al., 2001). A ovulação ocorre do início do proestro (fase em que o estradiol se encontra mais elevado) até o final do estro (fase de diminuição do hormônio) (YOUNG et al., 1941; SCHWARTZ, 1964).

As fases do ciclo estral podem ser determinadas através dos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (LONG & EVANS, 1922; HOAR & HICKMAN, 1975). A caracterização de cada fase é baseada na proporção entre três diferentes tipos celulares: células epiteliais, células corniformes e leucócitos.

O modelo de deprivação hormonal, ou seja, a ovariectomia é um modelo cirúrgico muito utilizado para estudo de possíveis efeitos decorrentes da falta de hormônios esteróides em animais. A cirurgia é feita sob anestesia e são retirados ambos os ovários através de uma incisão abdominal (SINGH et al., 1994; LUINE et al., 1998; FUGGER et al., 2000; FRYE & RHODES, 2002).

Um dos métodos de reposição com estrogênio, em ratas, foi descrito por GAMARO et al. (2003). As ratas são anestesiadas, e cápsulas de silicone de 15 mm contendo hormônio ou óleo de girassol são implantadas subcutaneamente na nuca do animal. Estudos mostram que estas cápsulas podem gerar concentrações séricas de estradiol entre 17 e 32 pg/mL e que estas medidas permanecem constantes entre 10 e 30 dias após o implante (BROWN et al., 1990).

### **1.3 HORMÔNIOS ESTERÓIDES E ECTO-ATPase**

Diversos estudos têm demonstrado o efeito dos hormônios esteróides sobre a atividade de enzimas e sobre receptores de nucleotídeos. Em 1995, ZYLINSKA e colaboradores demonstraram que esteróides neuroativos (17  $\beta$ -estradiol, sulfato de pregnenolona e sulfato de dehidroepiandrosterona - DHEAS) são capazes de modular a atividade *in vivo* de uma  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -ATPase de membranas sinaptossomais de córtex e cerebelo de ratos. Um outro trabalho de ZYLINSKA & LEGUTKO (1998) demonstrou

que esteróides neuroativos podem modular *in vitro* a atividade da mesma  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase em cultura de neurônio de ratos. O mesmo grupo demonstrou que 17  $\beta$ -estradiol, sulfato de pregnenolona, DHEAS e testosterona podem modificar diretamente a atividade de uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, um componente integral da membrana plasmática (ZYLINSKA et al., 1999). NEDELJKOVIC e colaboradores (2000) mostraram o efeito da deprivação hormonal sobre a expressão de uma ecto-ATPase em distintas regiões cerebrais de ratas adultas. Além disso, 17  $\beta$ -estradiol inibe não-genomicamente receptores P2X7 de humanos expressados em células renais de macacos (CARIO-TOUMANIANTZ et al., 1998) e DHEAS age como um bloqueador de canal, suprimindo a atividade funcional de receptores P2 (LIU et al., 2001).

Estes resultados mostram algumas evidências de que esteróides neuroativos podem afetar a atividade e expressão de ATPases, o que pode representar novos mecanismos de regulação destas enzimas e seus receptores.

#### 1.4 SISTEMA PURINÉRGICO

As purinas e os nucleotídeos de purina são constituintes essenciais de todas as células vivas. O ATP é usado como fonte de energia para praticamente todas as atividades celulares, enquanto a adenina é um componente dos ácidos nucleicos. Além disso, talvez como resultado de sua natureza ubíqua, as purinas são importantes moléculas tanto para sinalizações intracelulares quanto para extracelulares (DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

Evidências sugerem que os nucleotídeos purínicos exercem diversas funções no cérebro, entre as quais se destaca a participação na transmissão sináptica, na excitose, na regulação do crescimento e da diferenciação celular, na permeabilização da membrana e na

apoptose (ZIMMERMANN, 1994; ABBRACCHIO et al., 1995; DI ORIO et al., 1998; RATHBONE et al., 1999).

Os nucleotídeos extracelulares exercem seus efeitos biológicos interagindo com receptores presentes na superfície das membranas celulares. Os receptores que ligam nucleotídeos e nucleosídeos são divididos em dois grandes grupos: P1 e P2. Os receptores P1 se subdividem em  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  e são ativados com potencial agonista na ordem adenosina > AMP > ADP > ATP, enquanto os receptores  $A_1$  e  $A_3$  são acoplados à proteína  $G_i$  e inibem a adenilato ciclase. Ambos os tipos de receptores  $A_2$  são acoplados a proteínas  $G$  e estimulam a adenilato ciclase (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; CZAJKOWSKI & BARANSKA, 2002). Os receptores P2 ligam preferencialmente ATP/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 ( $P2X_{1-7}$ ) e os receptores metabotrópicos P2Y ( $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$ ,  $P2Y_{11}$ ,  $P2Y_{12}$  e  $P2Y_{13}$ ) (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; COMMUNI et al., 2001; CZAJKOWSKI E BARANSKA, 2002).

O ATP é o principal nucleotídeo de adenina liberado nos terminais nervosos de diferentes áreas cerebrais (RICHARDSON & BROWN, 1987; FIEDLER et al., 1992). Este neurotransmissor é armazenado nos terminais nervosos e co-liberado com diversos neurotransmissores, em diferentes preparações biológicas, de uma forma  $Ca^{2+}$ -dependente (PHILLIS & WU, 1981). Liberado, o ATP extracelular exerce ação em receptores específicos e a seguir pode ser rapidamente hidrolisado por uma cadeia de ectonucleotidases (NAGY et al., 1986) e seus produtos de hidrólise (ADP, AMP e adenosina) podem influenciar a excitabilidade neuronal quando interagem com receptores específicos (PHILLIS & WU, 1981).

A adenosina parece estar envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos no sistema nervoso central. A adenosina altera os níveis de AMP cíclico (SATTIN & RALL, 1970), inibe a atividade sináptica e neuronal (DUNWIDDIE & HOFFER, 1980) e modula o fluxo sanguíneo cerebral (BERNE et al., 1981). Sua liberação durante a isquemia cerebral conduziu à hipótese de que a adenosina age como um neuroprotetor, prevenindo a excitotoxicidade e danos isquêmicos (DRAGUNOW & FAULL, 1988).

A adenosina é também reconhecida como um importante agente neuromodulador (JARVIS & WILLIAMS, 1990), mas não um neurotransmissor por si, já que não há evidências de que seja liberada pelas vias  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente clássicas ou estocada em vesículas, além de não haver evidências da existência de sinapses em que o neurotransmissor primário seja a adenosina. Entretanto, os receptores  $A_1$  estão associados à inibição da liberação de praticamente todos os neurotransmissores clássicos, como dopamina, noradrenalina, glutamato e acetilcolina. Dentre esses, o efeito mais proeminente está, geralmente, associado ao sistema excitatório glutamatérgico, no qual a transmissão sináptica pode ser completamente bloqueada pela adenosina (DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

A adenosina é, de fato, consensualmente reconhecida como uma substância muito importante para a homeostasia das células do sistema nervoso central. O fato de a adenosina ser um catabólito imediato dos nucleotídeos da adenina a torna uma molécula sinalizadora adequada tanto para situações fisiológicas como patológicas que resultam em degradação dos nucleotídeos da adenina.

Existem duas fontes de adenosina extracelular: liberação de adenosina por difusão facilitada (DECKERT et al., 1988) e conversão extracelular de nucleotídeos de adenina



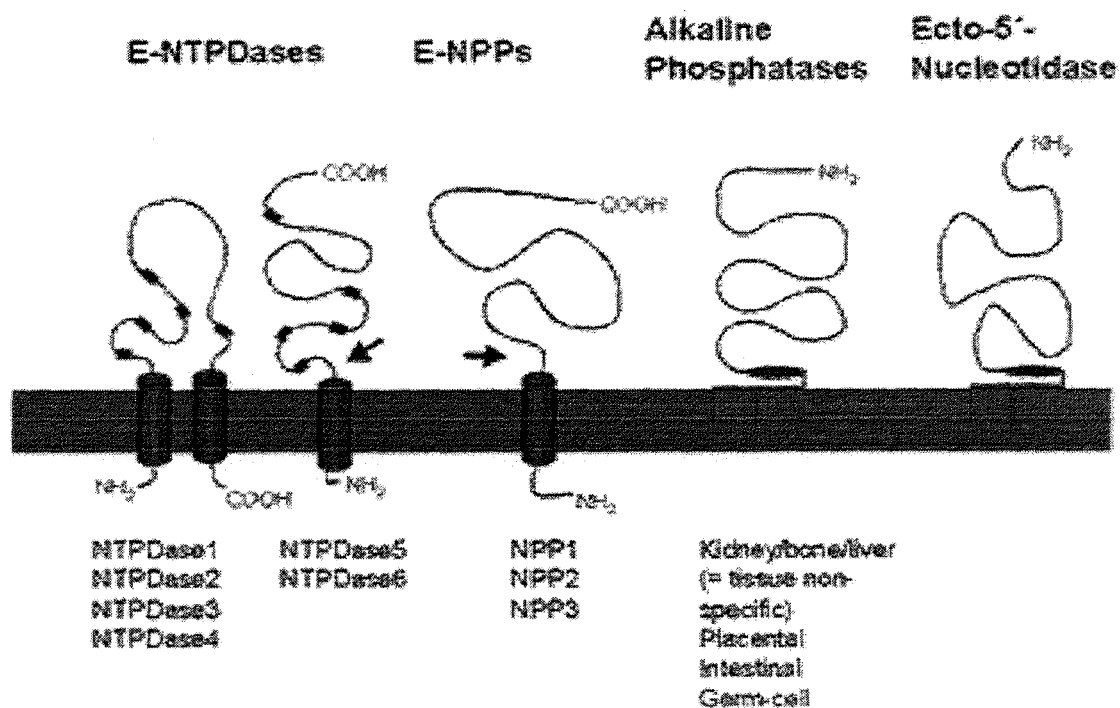
que, liberados geram adenosina através de uma série de ecto-enzimas (ZIMMERMANN & BRAUN, 1999).

### 1.5 ECTONUCLEOTIDASES

Nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular ou que podem estar solúveis no meio intersticial ou em fluidos corporais. A sinalização mediada por estes nucleotídeos requer mecanismos efetivos para a inativação do seu sinal. Nos últimos anos, consideráveis progressos têm sido feitos na caracterização de uma família de enzimas responsáveis pela degradação de nucleotídeos extracelulares, conhecida como família das E-NTPDase. Em mamíferos, seis membros desta família foram clonados e funcionalmente caracterizados (ZIMMERMANN, 2001) (Figura 2).

Esta família de genes também se expressa em invertebrados, plantas, leveduras e protozoários (HANDA & GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS et al., 1996; ZIMMERMANN & BRAUN, 1999). As enzimas de mamíferos hidrolisam nucleosídeos 5'-trifosfatos e difosfatos, porém apresentam uma considerável diferença em suas preferências por tipos individuais de nucleotídeos. A ecto-ATP difosfohidrolase, também denominada NTPDase1, apirase ou CD39, hidrolisa ATP e ADP igualmente bem (KACZMAREK et al., 1996; WANG & GUIDOTTI, 1996; HEINE et al., 1999). A ecto-ATPase, também denominada NTPDase 2 ou CD39L1, tem uma preferência maior pela hidrólise de ATP (30 vezes) do que ADP (KEGEL et al., 1997; KIRLEY, 1997; MATEO et al., 1999). A NTPDase3 ou CD39L3, encontrada em humanos e aves, é um intermediário funcional e hidrolisa ATP em uma velocidade aproximadamente 3 vezes maior que o ADP

(SMITH & KIRLEY, 1998). Esta última também tem sido considerada uma ATP difosfohidrolase, apirase ou CD39.



**FIGURA 2.** Prognóstico da topografia das ectonucleotidases de membrana. 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 pontos escuros na seqüência das NTPDase 1 a 6 representam as regiões conservadas das apirases (ACR). Todas as ectonucleotidases representadas são glicoproteínas. Adaptado de Zimmermann, 2001.

Até o presente momento, as diferenças funcionais na especificidade pelo substrato e suas conseqüências específicas nas células ou tecidos não estão completamente entendidas. As três enzimas podem produzir um impacto surpreendentemente diferente na sinalização dos receptores de nucleotídeos. A partir destas propriedades funcionais (HEINE et al.,

1999), é possível sugerir que NTPDase1 pode hidrolisar nucleosídeos tri e difosfatados igualmente bem, o que resultaria na formação de nucleosídeos monofosfatados e na inativação de todos os receptores P2. A NTPDase2 pode seletivamente inativar os nucleosídeos trifosfatados e agir como um produtor extracelular de nucleosídeos difosfatados. A NTPDase3, com suas propriedades intermediárias, hidrolisa efetivamente nucleosídeos trifosfatados, porém a hidrólise de nucleosídeos difosfatados pode ser diminuída e, portanto, o nucleosídeo difosfatado pode permanecer estável um maior período de tempo até que seja hidrolisado (ZIMMERMANN, 2001).

Apesar das diferenças catalíticas, há cinco domínios com seqüência altamente conservada nesta família de enzimas, denominados “regiões conservadas da apirase”, que possivelmente participam da formação do sítio catalítico destas enzimas (HANDA & GUIDOTTI, 1996). Além disso, KEGEL et al. (1997) demonstraram que uma ecto-ATPase e uma ecto-apirase são co-expressas em cérebro de ratos.

O estudo das ectonucleotidases associadas à membrana no sistema nervoso central (BATTASTINI et al., 1991, 1995; TODOROV et al., 1997) tem sido alvo de diversos trabalhos desde que o ATP extracelular passou a ser considerado um neurotransmissor excitatório (EDWARDS et al., 1992; EVANS et al., 1992) e diversas classes de receptores de nucleotídeos foram descobertas (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

Estas enzimas têm um papel essencial na regulação das concentrações e da disponibilidade de ligantes (ATP, ADP, AMP e adenosina) para estes receptores, na fenda sináptica. Além disso, a desfosforilação do nucleotídeo pela ação das ectonucleotidases inativa a sua ação neurotransmissora de modo direto, através da conversão de um agonista (ATP) em adenosina, que pode subsequenteamente ativar ou inibir outros receptores ou

enzimas associadas ao sistema (ZIMMERMANN, 1996; DI ORIO et al., 1998; SMITH & KIRLEY, 1998, RATHBONE et al., 1999).

Juntamente com as NTPDases, uma outra enzima responsável pela degradação de nucleotídeos extracelulares é a ecto-5'-nucleotidase ou CD73. Esta enzima possui uma ampla distribuição tecidual e até agora apenas um único gene tem sido identificado em vertebrados, entretanto formas variantes glicosiladas têm sido descritas (CUNHA et al., 2000). No sistema nervoso central, a 5'-nucleotidase está predominantemente associada à glia, contudo várias evidências têm demonstrado esta atividade associada a neurônios (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN et al., 1998). A ecto-5'-nucleotidase é transitoriamente expressa na superfície de células neuronais e nas sinapses durante o desenvolvimento sináptico (SCHOEN & KREUTZBERG, 1994; BRAUN et al., 1998).

A ecto-5'-nucleotidase tem um importante papel na formação da adenosina a partir de AMP extracelular e conseqüente ativação de receptores  $A_1$  de adenosina. Nosso laboratório tem proposto que, em sistema nervoso, a conversão extracelular de ATP até adenosina é catalisada pela ação conjugada de uma ATP difosfohidrolase e uma 5'-nucleotidase (SARKIS & SALTÓ, 1991; BATTASTINI et al., 1995). Assim, a associação destas enzimas se constitui em uma via altamente sofisticada, desenvolvida com o objetivo de controlar os níveis extracelulares de ATP e adenosina, capazes de modular uma série de processos fundamentais a nível celular em muitos órgãos e tecidos, principalmente no sistema nervoso central (Figura 3).

Vários trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório têm mostrado a importância da atividade destas enzimas tanto em processos patológicos como epilepsia (BONAN et al., 2000; BRUNO et al., 2002), isquemia (Schetinger et al., 1998) e estresse (TORRES et al., 2002), quanto em eventos puramente fisiológicos, como eventos de plasticidade sináptica e

o processamento da memória (BONAN et al., 1998; BONAN et al., 2000; PEREIRA et al., 2001; PEREIRA et al., 2002).

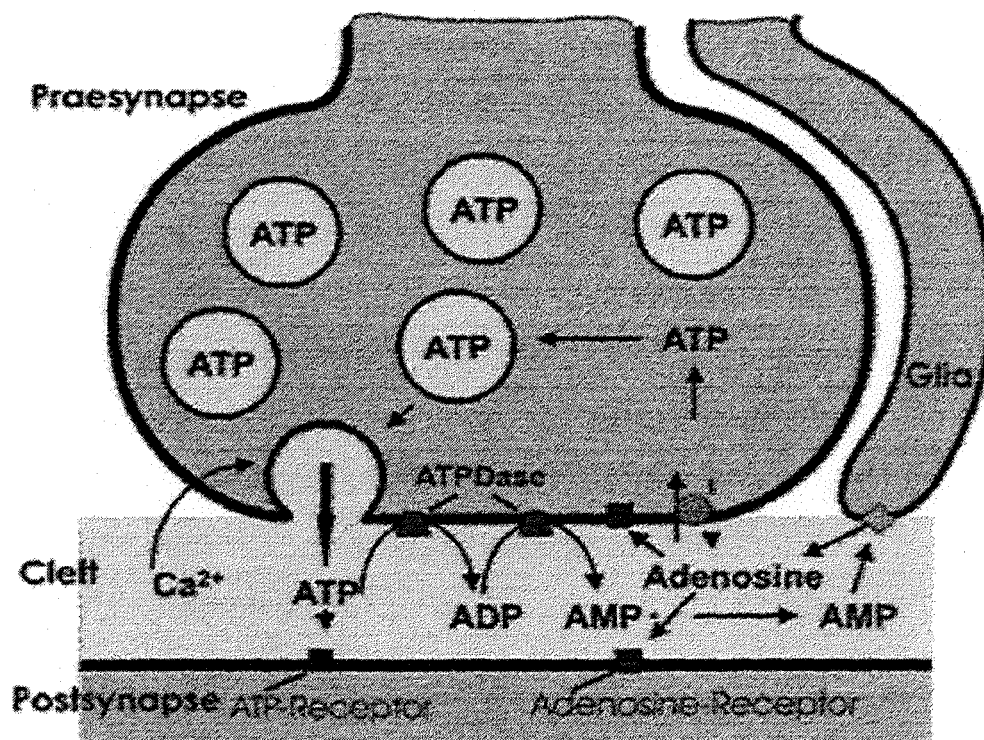


Figura 3. Liberação de ATP na fenda sináptica e as ações desencadeadas por esse neurotransmissor pré- e pós-sinápticamente. (Adaptado de [www.biozentrum.unifrankfurt.de/prof/zimmermann](http://www.biozentrum.unifrankfurt.de/prof/zimmermann)).

## 1.6 MEMÓRIA E SISTEMA PURINÉRGICO

O SNC é constituído de agrupamento de neurônios, os quais, por sua vez, formam sistemas que se interligam entre si de um modo organizado, formando vários sistemas de processamento de informação (EDELMAN & MOUNTCASTLE, 1978). A comunicação entre os neurônios é feita através de sinapses e a conectividade sináptica não é fixa durante a vida do organismo, sendo que alterações podem ocorrer em resposta à estimulação

sensorial, manipulação ambiental ou aprendizado de uma tarefa específica (AGRANOFF et al., 1998).

A formação do aprendizado e da memória envolve mudanças estruturais no cérebro, e existe um grande interesse em identificar e compreender os mecanismos envolvidos na memória e aprendizado de mamíferos. A aprendizagem e a memória são propriedades fundamentais do sistema nervoso central (SNC) e ambas estão intimamente relacionadas. Sendo um processo dinâmico, a memória pode ser dividida em três etapas: (1) **aquisição** da informação através da exposição a um evento, seja ele interno ou externo ao indivíduo, (2) **consolidação**, em que a informação adquirida é processada e (3) **armazenamento** desta informação (McGAUGH, 1996 e 2000; IZQUIERDO, 1989). A melhor maneira de estudar e avaliar o armazenamento da memória se dá através da **evocação** da memória, quando observamos a mudança de comportamento do animal devido ao processo de memorização (QUILFELDT, 1994).

As alterações observadas no processo de aprendizagem e memória ocorrem devido à plasticidade sináptica, fenômeno característico do SNC. O conceito de plasticidade é extremamente amplo, incluindo todas as formas de reorganização duradoura que ocorrem em um cérebro maduro. Essas reorganizações podem ser observadas sob o aspecto fisiológico (propriedades funcionais adquiridas pelos neurônios), morfológico (morfologia e ultraestrutura da glia) ou bioquímico (atividades enzimáticas, transdução de sinal e mudanças na expressão gênica) (AU LOUIS et al., 1997).

Em SNC de mamíferos, dois importantes fenômenos plásticos têm sido descritos: a potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) (AU LOUIS et al., 1997).

Em 1973, Bliss e colaboradores descobriram a LTP (BLISS & LOMO, 1973). Este tipo de neuroplasticidade celular foi primeiramente observado em hipocampo e, subseqüentemente, em outras regiões cerebrais. LTP foi imediatamente reconhecida como uma mudança neuronal capaz de promover uma base para a memória e, assim, numerosas hipóteses surgiram na tentativa de explicar a formação da memória através da LTP (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000). No entanto, ainda não há estudos que comprovem a existência de uma memória dependente de LTP ou a ocorrência de LTP durante a formação da memória, estabelecendo, então, uma correlação entre as duas (IZQUIERDO & MEDINA, 1997 a,b).

Um outro fenômeno envolvido nas alterações sinápticas de longa duração, o qual pode corresponder a uma base neurofisiológica para a memória, é a LTD (depressão de longa duração) (LINDEN, 1994). A LTD compreende uma persistente redução na eficiência sináptica, a qual ocorre tipicamente após repetidas estimulações aferentes de baixa frequência (BRAUNEWELL & MANAHAN-VAUGHAN, 2001). Recentemente, relatou-se que a LTD na região CA1 do hipocampo pode ser associada com a aquisição da memória em ratos (BRAUNEWELL & MANAHAN-VAUGHAN, 2001).

Evidências indicam que o ATP tem um importante papel na plasticidade sináptica. Em sistema nervoso central, o ATP é capaz de induzir LTP. O ATP é capaz de induzir LTP registrada em fatias hipocámpais de camundongo e cobaia (WIERASZKO & SEYFRIED, 1989; FUJII et al., 1999), o que sugere que o ATP extracelular pode estar envolvido na modulação da eficiência sináptica. Além disso, estudos mostram que a liberação de ATP é maior após a estimulação de alta frequência (frequências usadas para induzir LTP), enquanto, após estimulação de baixa frequência (frequências usadas para induzir LTD), ocorre preferencialmente a liberação de adenosina (CUNHA et al., 1996).

Existem diversos mecanismos através dos quais o ATP extracelular pode modular a atividade sináptica. Um deles é a utilização do ATP por proteínas quinases localizadas na superfície neuronal (EHRLICH et al., 1988, 1990, 1999). A utilização do ATP extracelular como substrato na fosforilação de ecto-proteínas realizada por uma ecto-proteína quinase pode estar envolvida em diversas funções neuronais, como a participação na fase de manutenção de uma LTP estável (CHEN et al., 1996).

A adenosina é uma purina endógena com importante papel na regulação da excitabilidade neuronal e na transmissão sináptica de baixa frequência, sendo também considerada como neuromodulador no fenômeno de plasticidade sináptica (DUNWIDDIE & HOFFER, 1980; CUNHA, 2001).

A adenosina endógena é capaz de modular a LTP, já que este fenômeno foi facilitado na presença de um antagonista seletivo de receptor A<sub>1</sub>, 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX), e foi reduzido na presença de um bloqueador da captação de adenosina, nitrobenziltioinosina, sugerindo que a adenosina endógena exerce um efeito inibitório sobre a LTP (DE MENDONÇA & RIBEIRO, 1994). Além disso, tem sido demonstrado que a ativação seletiva de receptores A<sub>1</sub> em hipocampo pode prejudicar a performance na retenção de uma resposta, influenciando o processamento da memória e aprendizagem (NORMILE & BARRACO, 1991).

## **1.7 MODULAÇÃO DA MEMÓRIA E HORMÔNIOS ESTERÓIDES**

Uma variedade de sistemas periféricos modulatórios tem sido mencionada por participar da formação da memória (IZQUIERDO & MEDINA, 1997b). A  $\beta$ -endorfina e outros opióides, a acetilcolina, a vasopressina, a ocitocina, os glicocorticóides, a epinefrina,



a norepinefrina e a glicose (McGAUGH, 1989; GOLD, 1991, 1995; BOHUS, 1994; McGAUGH et al., 1995; GRIGORYAN et al., 1996; IZQUIERDO & MEDINA, 1997b; CAHILL & McGAUGH, 1998), entre outros, são de fato liberados durante muitas formas de treinamento comportamental (IZQUIERDO, 1989; GOLD, 1991), indicando que estas substâncias participam da consolidação e evocação da memória (ZORNETZER, 1978; IZQUIERDO, 1989).

De fato, eventos neuromodulatórios e hormonais que estão presentes no momento do treino modulam a cascata bioquímica em diferentes passos (GOLD, 1995; GOLD & McCARTY, 1995; IZQUIERDO, 1995).

Os hormônios gonadais exercem efeitos na expressão e manutenção normal de funções cognitivas. Em homens e mulheres idosos, os níveis circulantes de hormônios gonadais foram positivamente associados com a performance cognitiva (YAFFE et al., 2000; YAFE et al., 2002). Estudos mostraram que o estrogênio é capaz de melhorar aprendizado e memória quando administrado alguns dias ou semanas após a ovariectomia (DOHANICH, 2002). Além disso, a reposição hormonal com estrogênio também tem sido associada com uma melhora na memória em animais submetidos a longos períodos de privação hormonal (GIBBS, 2000b; MARKOSWSKA & SAVONENKO, 2002). Um estudo demonstrou que a reposição com estradiol durante 30 dias melhorou a memória de trabalho tanto em camundongos fêmeas jovens, quanto adultas ovariectomizadas no teste de alternância espontânea T-maze (MILLER et al., 1999). O estradiol foi capaz de melhorar memória e aprendizado em tarefas de memória espacial (LUINE et al., 1998). Entretanto, em outro estudo, uma administração aguda de estradiol foi associada com a diminuição do aprendizado em tarefas hipocampo-dependentes, incluindo o labirinto aquático de Morris

(FRYE, 1995; WARREN & JURASKA, 1995) e tarefas de memória aversiva (DIAZ-VELIZ et al., 1991; McEWEN et al., 1997).

Os mecanismos através dos quais ocorrem os efeitos dos hormônios esteróides sobre a memória ainda permanecem desconhecidos. Acredita-se que os efeitos, pelo menos em parte, ocorram devido à alteração de funções provocadas no hipocampo (BARRACLOUGH et al., 1999). Mudanças nos níveis dos esteróides gonadais devido a diferentes estados reprodutivos (ciclo hormonal) podem alterar a função do hipocampo, visto que estes hormônios são capazes de ultrapassar livremente a barreira hematoencefálica. Constatou-se que, após a ovariectomia bilateral e tratamento com estradiol, houve um aumento na densidade de ambas as células dendríticas e sinapses na região CA1 do hipocampo (McEWEN & WOOLEY, 1994; WOOLEY et al., 1996). Além disso, o tratamento com estradiol também aumentou a densidade de células dendríticas hipocampais crescidas em culturas (MURPHY & SEGAL, 1996; MURPHY et al., 1998).

Recentes estudos têm demonstrado a possibilidade de que as ações dos hormônios esteróides no sistema nervoso central, incluindo mudanças na plasticidade sináptica do hipocampo (GOULD, et al., 1990; WOOLEY et al., 1990; McEWEN et al., 1995), possam ser mediadas, pelo menos em parte, via interações dos hormônios com sistemas de receptores de membrana envolvidos na rápida ativação de vias intracelulares de transdução de sinal (BI et al., 2000; BI et al., 2001; LEVIN, 2002).

De fato, a complexidade do mecanismo de ação dos hormônios esteróides conduziu-nos a investigar os possíveis efeitos destes hormônios sobre a atividade de ectonucleotidasas que estão envolvidas em situações fisiológicas, como o processamento da memória.

## 2. OBJETIVOS

Considerando que flutuações nos níveis de estrogênio podem interferir na atividade de enzimas de membrana, nossos objetivos foram:

1. Verificar o efeito da deprivação hormonal induzida cirurgicamente, através da retirada dos ovários, sobre a atividade das ectonucleotidases em sinaptossomas de córtex e hipocampo de ratas adultas.
2. Investigar a atividade *in vitro* das ectonucleotidases em sinaptossomas de córtex e hipocampo de ratas adultas na presença de três diferentes hormônios:  $17\beta$ -estradiol, DHEAS e sulfato de pregnenolona.
3. Estudar o efeito da terapia de reposição hormonal com estrogênio sobre a atividade das ectonucleotidases em sinaptossomas de córtex e hipocampo de ratas adultas ovariectomizadas.

Considerando que estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a tarefa de esquiva inibitória está associada com uma diminuição tempo-dependente na atividade de ectonucleotidases de hipocampo de ratos machos adultos, nosso objetivo foi:

1. Comparar o efeito da sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória sobre a atividade de ectonucleotidases em sinaptossomas de hipocampo de ratos machos e fêmeas adultos, para avaliarmos se a via das ectonucleotidases é modulada durante o processo de formação da memória em fêmeas, assim como observado em machos

### **3. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **3.1 CAPÍTULO 1**

Effects of Steroid Hormones on synaptosomal ectonucleotidases activities  
from hippocampus and cortex of adult female rats

Submetido à revista *General and Comparative Endocrinology*

**Effects of steroid hormones on synaptosomal ectonucleotidases activities  
from hippocampus and cortex of adult female rats**

Bárbara Rücker<sup>1</sup> \*, Daniela Pochmann<sup>1</sup>, Cristina Ribas Fürstenau<sup>1</sup>, Marcela Sorelli  
Carneiro-Ramos<sup>3</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini<sup>1</sup>, Maria Luiza M. Barreto-Chaves<sup>2</sup>, João  
José Freitas Sarkis<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

\* Corresponding author:

Bárbara Rücker

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Bioquímica, ICBS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – ANEXO

CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Telephone number: + 55 (51) 3316-5554

FAX number: + 55 (51) 3316-5540

e-mail address: [barucker@ig.com.br](mailto:barucker@ig.com.br)

## Abstract

In the last years, the effects of steroid hormones in brain have been intensively discussed. It has been demonstrated that ATP is hydrolyzed to adenosine in the synaptic cleft by the conjugated action of ectonucleotidases, which includes an enzyme of E-NTPDase family (NTPDase1, apyrase, EC 3.6.1.5) and a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5). ATP is known to exert potent effects on the central nervous system, where can act as a neurotransmitter or neuromodulator, while adenosine is a nucleoside with neuroprotective properties and modulatory effects. However, several questions have been raised about the mechanisms of steroid hormones and the possible neuroprotective effects of estrogen. Thus, we examined the effects of gonadal steroid hormone deprivation induced by removal of ovaries (OVX) and the estrogen replacement therapy on the ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of adult rats. ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex and hippocampus did not change as function of OVX. The results have shown an increase in AMP hydrolysis (82%) in the animals submitted to OVX in cerebral cortex, but not in hippocampus when compared to control and sham-operated groups. Estrogen replacement therapy (ERT) reverted this effect. RT-PCR analysis have shown that the enhancement of enzyme activity in cerebral cortex was due to the higher expression of 5'-nucleotidase following OVX. The hormones  $17\beta$ -estradiol, DHEAS and Pregnenolone sulfate (1.0, 2.5 and 5.0  $\mu$ M) did not alter *in vitro* the nucleotide hydrolysis in synaptosomes from cortex and hippocampus of female adult rats. The results presented in this manuscript should be considered relevant for the hormone replacement therapy, since there are many controversies about this area and the relationship between adenosine and sex steroids is still poorly understood.

Keywords: adenosine, steroid hormones, ectonucleotidases, OVX, ERT.

## 1. Introduction

In recent years, an increasing number of studies have been performed demonstrating the role of steroid hormones in several physiological and pathological responses (Valverde et al., 2002; Garcia-Segura et al., 2000). Estrogen has been associated with a decreased risk, delayed onset and progression, or enhanced recovery from numerous traumatic or chronic neurological and mental diseases (Garcia-Segura et al., 2000). The efficacy of estrogen has been shown in several models of neurodegeneration and ischemic injury *in vivo* and *in vitro*. In ovariectomized rats, physiological concentrations of estradiol, by hormone therapy, attenuated the extent of brain damage caused by permanent cerebral ischemia (Dubal et al., 1998; Harms et al., 2001). On the other hand, several studies have shown conflicting data about the protective effects of estrogen. Recently, studies have indicated a lack of protection or increased health risks of hormone replacement therapy (HRT) in the occurrence of cerebrovascular stroke (Viscoli et al., 2001), cardiovascular disease (Hulley et al., 1998), Alzheimer's disease (Mulnard et al., 2000) and invasive breast cancer (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002).

It has been suggested that steroid hormones can modulate the expression and activity of an ecto-ATPase in distinct brain regions of rats (Nedeljkovic et al., 2000; Zylinska et al., 1999). Ecto-enzymes able to hydrolyze ATP and ADP are present in the central nervous system of several species (Sarkis et al., 1995). ATP released by synapses can be hydrolyzed by ectonucleotidases in a highly sophisticated pathway composed by ecto-enzymes of the E-NTPDase family that includes NTPDase1 (ATP diphosphohydrolase, ecto-apyrase, EC 3.6.1.5) and NTPDase2 (ecto-ATPase, EC 3.6.1.3), which can transform ATP and ADP to AMP (Bonan et al., 2001; Zimmermann, 2001). The AMP produced is subsequently hydrolyzed to adenosine by an ecto 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), the rate-limiting step in

this pathway (Battastini et al., 1995; Sarkis and Saltó, 1991; Zimmermann, 1992). The final product of the pathway is the nucleoside adenosine, an important endogenous neuromodulator.

ATP is released in the CNS from a variety of cells in several regions and acts as a neurotransmitter or neuromodulator (Fiedler et al., 1992; Nedeljkovic et al., 2000; Richardson and Brown, 1987). Furthermore, ATP is also co-released with several neurotransmitters in different biological preparations in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner (Phillis and Wu, 1981).

Adenosine is involved in a diverse array of functions in the central nervous system and may play diverse roles in physiological and pathological conditions. In brain, the adenosine levels are markedly elevated by a wide array of pathological stimuli (Dunwiddie and Masino, 2001). Adenosine mediates its effects through four types of G-protein-coupled receptors:  $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_{2\text{A}}$ ,  $\text{A}_{2\text{B}}$  and  $\text{A}_3$  (Hauber and Bareiß, 2001).

In relation to the mechanism of action of steroid hormones and their possible neuroprotective effects, many questions have been raised and a particular attention has been given to these points. Thus, we examined the effects of gonadal steroid hormone deprivation induced by removal of ovaries (ovariectomy) and the estrogen replacement therapy on the ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of rats. In addition, apart from their well-documented genomics, some evidence indicate that neuroactive steroids effects can act as potent modulators of the plasma membrane receptors, which may interact with different effectors systems in neuronal membranes (Zylinska and Legutko, 1998; Zylinska et al., 1999). Therefore, we evaluated *in vitro* if the hormones 17 $\beta$ -estradiol, DHEAS and Pregnenolone sulfate were able to



modulate directly the ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of adult female rats.

## **2. Methods**

### *2.1 Chemicals*

Nucleotides,  $17\beta$ -estradiol (cyclodextrin-encapsulated  $17\beta$ -estradiol), Dehydroepiandrosterone sulfate (5-androsten- $3\beta$ -ol-17-one sulfate) and pregnenolone (5-pregnen- $3\beta$ -ol-20-one) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All others reagents were of analytical grade.

### *2.2 Animals*

Female Wistar rats (age, 60-75 days; 200-250 g) were used in this study. They were housed five to a cage with food and water available *ad libitum* and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on 7:00 a.m.) at a temperature of  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . For all animals that were ovariectomized and received the pellet containing the hormone, we used 120 mg/kg ketamine HCl (Dopalen: Agribands, Campinas, SP, Brazil) and 16 mg/kg xylazine (Anasedan: Agribands) as anesthesia. Only animals in the diestrus state were used.

### *2.3 Hormone deprivation*

Animals were randomly divided into three groups: control group, the group corresponding to sham-operated animals and the group submitted to a bilateral ovariectomy (OVX) by removal of the glands through one abdominal incision. Sham-operated group was only submitted to abdominal incision, but not to removal of ovaries. The sham-operated and OVX groups were compared to control group in order to verify the effects of

surgery on the nucleotide hydrolysis. Three weeks after surgery, all groups were sacrificed by decapitation and the synaptosomes were prepared.

#### *2.4 Estrogen replacement therapy*

Animals were randomly divided into three groups. A control group, a vehicle group (OVX + silastic pellets with oil) and a third group submitted to estrogen replacement therapy (ERT) (OVX + silastic pellet with estradiol). Pellets with 15 mm medical grade tubing (1.02 mm i.d. x 2.16 mm o.d.; Medicone, Multiplast, Porto Alegre, RS, Brazil) were filled with 10  $\mu$ L of 5% (w/v)  $\beta$ -estradiol 3-benzoato (Sigma, St. Louis, Mo) in corn oil and sealed with silicone. These pellets were soaked in sterile saline overnight and implanted subcutaneously between the scapule (Gamaro et al., 2003). Previous studies show that these pellets generate serum levels of estradiol between 17 and 32 pg/mL, and measurements at 10 and 30 days post-implantation have shown no significant change in circulating levels over these times (Brown et al., 1990; Luine et al., 1998). The pellets were implanted 2 weeks after OVX and 3 weeks after the implant the animals were sacrificed by decapitation and the synaptosomes prepared as described below.

#### *2.5 Hormones in vitro*

The hormones  $17\beta$ -estradiol, DHEAS and Pregnenolone sulfate were tested at three concentrations: 1.0  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M and 5.0  $\mu$ M.  $17\beta$ -estradiol and DHEAS were dissolved in water and Pregnenolone in ethanol 80%. Control tubes contained an equivalent amount of ethanol alone. The final concentration of ethanol was below 0,1%. This concentration of ethanol was tested for the hydrolysis of all nucleotides.

### 2.6 *Synaptosomes preparation*

Animals were sacrificed by decapitation and the brain structures were removed to an ice-cold medium solution (320 mM sucrose, 5 mM HEPES, pH 7.5, and 0.1 mM EDTA). Structures were gently homogenized in five volumes of ice-cold medium solution with a motor-driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described previously by Nagy and Delgado-Escueta (Nagy and Delgado-Escueta, 1984). Briefly, 0.5 ml of the crude mitochondrial fraction were mixed with 4.0 ml of an 8.5% Percoll solution and layered onto an isoosmotic Percoll/sucrose discontinuous gradient (10/16%). The synaptosomes that banded at the 10/16% Percoll interface were collected with wide tip disposable plastic transfer pipettes. The synaptosomal fractions were then washed twice at 15,000-x *g* for 20 minutes with the same ice-cold medium to remove the contaminating Percoll. The synaptosome pellet was resuspended to a final protein concentration of approximately 0.5 mg/ml. The material was prepared fresh daily and maintained at 0-4°C throughout preparation.

### 2.7 *Enzyme assays*

The reaction medium used to assay ATP and ADP hydrolysis was essentially as described previously (Battastini et al., 1991) and contained 5.0 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM TRIS-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 μL. The reaction medium used to assay 5'-nucleotidase activity contained 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 0.15 M sucrose in a final volume of 200 μL (Heymann et al., 1984). For *in vitro* assays, hormones (17 β-estradiol, DHEAS, Pregnenolone) were added to the reaction mixture. The synaptosomal fractions (10-20 μg protein) were added to the reaction mixture, preincubated for 10 minutes and incubated for

20 minutes at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP, ADP or AMP to a final concentration of 1.0 mM and stopped by the addition of 200 µL 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 minutes and samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) (Chan et al., 1986). Incubation times and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct nonenzymatic hydrolysis of the substrates.

### *2.8 Protein determination*

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

### *2.9 RT-PCR*

Total RNA from cortex female rats was isolated with Trizol reagent (Life Technologies) in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA species were synthesized with SuperScript II (Life Technologies) from 2µg of total RNA in a total volume of 20 µl with an oligo (dT) primer in accordance with the manufacturer's instructions. cDNA reactions were performed for 1 h at 42°C and stopped by boiling for 5 min. 2µl of cDNA was used as a template for PCR with primers specific for ecto-5'-nucleotidase. As a control for cDNA synthesis, β-actin-PCR was performed. Two µl of the RT reaction mix was used for PCR in a total volume of 25µl using a concentration of 0.5 µM of each primer indicated below and 50 µM of dNTP and 1 U Taq polymerase (Life Technologies) in the supplied reaction buffer.

The PCR cycling conditions were as follows: for ecto-5'-nucleotidase 45 s at 94°C, 45 s at 64 °C, 1 min 30 s at 72 °C (amplification product 403 bp) and the same

conditions for  $\beta$ -actin (amplification product 210 bp). All PCRs were carried out for 35 cycles and included an initial 3 min denaturation step at 94 °C and a final 10 min extension at 72°C. 10 $\mu$ l of the PCR reaction was analyzed on a 1.5% agarose gel. The following set of primers were used: for ecto-5'-nucleotidase: 5'CCC GGG GGC CAC TAG CAC CTC A3' and 5'GCC TGG ACC ACG GGA ACC TT3' and for  $\beta$ -actin: 5'TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG3' and 5'TAC TCC TGC TTC CTG ATC CAC AT3'. Oligonucleotides were obtained from Invitrogen, Brazil.

### *2.10 Statistical analysis*

The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference with statistical analysis used. All analysis were performed with an IBM compatible computer using the SPSSPC software.

## **3. Results**

The effects of hormonal deprivation on ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex and hippocampus are shown in Fig 1A and 1B. When compared to controls, the sham-operated group has not shown significant difference in ATP and ADP hydrolysis in both structures. The animals submitted to ovariectomy (OVX) treatment also did not show significant changes in ATP and ADP hydrolysis for both structures. Therefore, the ovariectomy has not been able to alter the NTPDase activity in central nervous system.

On the other hand, the results have shown an increase in AMP hydrolysis in the animals submitted to OVX in cerebral cortex ( $22.03 \pm 3.86$ , mean  $\pm$  S.D.,  $n=6$ ), but not in hippocampus ( $27.79 \pm 6.88$ , mean  $\pm$  S.D.,  $n=6$ ), when compared to control group ( $12.6 \pm$

1.35, mean  $\pm$  S.D., n=6 and 20.51  $\pm$  6.43, mean  $\pm$  S.D., n=6, respectively) and sham-operated group (14.07  $\pm$  0.88, mean  $\pm$  S.D., n=6 and 24.47  $\pm$  4.19, mean  $\pm$  S.D., n=4, respectively) (Fig 1C). Thus, it is possible to observe that ovariectomy can change the 5'-nucleotidase activity in cortical synaptosomes, one of the activities involved in the hydrolysis of the neurotransmitter ATP to adenosine in the synaptic cleft.

Considering the effects of hormone deprivation, we also evaluate if the estrogen replacement therapy (ERT) with pellets containing 17 $\beta$ -estradiol could exert effects on AMP hydrolysis (Fig.2). It has been observed that ERT group promote a significantly inhibition on AMP hydrolysis when compared with OVX group in cerebral cortex of female rats (19.05  $\pm$  1.39, mean  $\pm$  S.D., n=6 and 24.45  $\pm$  3.09, mean  $\pm$  S.D., n=6, respectively). There were no significant differences on AMP hydrolysis between the ERT group and control group (17.00  $\pm$  2.54, mean  $\pm$  S.D., n=6), which indicates that the hormone replacement reverted the effect of ovariectomy (p<0.05).

We also tested the effects of ERT on ATP and ADP hydrolysis in cortex and hippocampus. There were no differences for the hydrolysis of both nucleotides in these structures with hormone therapy (results not shown).

To verify how the hormone deprivation could interact with the enzyme, we evaluate possible variations in the expression of 5'-nucleotidase using a RT-PCR method. It has been observed an increase in 5'-nucleotidase expression in OVX group, when compared with control and sham-operated group, as showed in Fig 3. This result suggests that the increase in the enzyme activity could be attributed to an increase on its own synthesis.

Considering the recent findings that neuroactive steroids could act apart from their genomic effects, we tested some hormones (17 $\beta$ -estradiol, DHEAS and Pregnenolone

sulfate) *in vitro* ATP, ADP and AMP hydrolysis in the following concentrations: 1.0, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$ . There were no significant differences in synaptosomal ectonucleotidase activities for both structures in presence of any concentrations tested (results not shown). The inhibitory effect observed for Pregnenolone sulfate was due to the presence of the solvent used, ethanol (results not shown).

#### 4. Discussion

The present study has shown changes in the activity and expression of 5'-nucleotidase in synaptosomes from female rat cerebral cortex, but not from hippocampus, following chronic steroid hormone deprivation induced by removal of ovaries. OVX treatment increased the activity of 5'-nucleotidase in synaptosomes from cerebral cortex when compared to the sham-operated and diestrus control groups.

Many physiological manipulations can increase extracellular adenosine levels. The regulation of the activity of key enzymes, such as 5'-nucleotidase, is central to the mechanisms by which diverse stimuli can elevate extracellular adenosine levels in the brain (Dunwiddie and Masino, 2001). In the OVX this enzyme could be able to hydrolyze with more efficiency the AMP, a product of the hydrolysis of the neurotransmitter ATP promoted by a NTPDase activity. Then the enzymatic pathway from ATP to adenosine (ATP diphosphohydrolase plus 5'-nucleotidase) in the synaptic cleft is activated changing the activity of only one of the two enzymes.

The levels of adenosine in the brain of these ovariectomized female rats probably are higher than the control group, and this could be an important factor, since this nucleoside is considered an important neuroprotector and neuromodulator agent (Bonan et al., 2001;

Cunha, 2001; Dunwiddie and Masino, 2001; Ribeiro et al., 2003). Adenosine modulates the activity of the nervous system at cellular level presynaptically by inhibiting or facilitating transmitter released, postsynaptically by hyperpolarizing or depolarizing neurons and/or exerting non-synaptic effects (Ribeiro et al., 2003). It is important to note that the effects of this nucleoside will depend on the relative density of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor subtypes present in cerebral cortex (Moreau and Huber, 1999; Ribeiro, 1999). Thus, the increase in adenosine levels might be an important compensatory mechanism to control a possible unbalance caused by the hormonal deprivation.

In this study, we examined the expression of ecto 5'-nucleotidase in surgical ovariectomy evaluating the mRNA levels with the use of RT-PCR. RT-PCR analysis confirmed that the enhanced enzyme activity in cortex was due to the higher expression of 5'-nucleotidase following OVX. This is consistent with the classical view that steroids modulate gene expression via their nuclear receptors (Beato et al., 1995; Parker and White, 1996). Moreover, the *in vitro* results (not shown) did not alter the nucleotide hydrolysis, suggesting that, in this case, the hormone does not act through non-genomic mechanisms.

After the estrogen replacement therapy (ERT), the results have shown that the hormone reverted the enhancement of AMP hydrolysis promoted by ovariectomy. Thus, the adenosine levels are probably lower than those reached with hormone deprivation. Thus, this nucleoside, which is an important neuroprotector and neuromodulator, could change the compensatory natural mechanism to normalize the adenosine levels in female rat cortex in the ERT.

The relationship between estrogen neurotrophic effects and their neuroprotective action is unclear. Growing evidence indicates that estradiol may influence the risk of cerebrovascular stroke and also the extent of brain injury after ischemic insult (Wise,



2003). The effect of hormone replacement therapy seems to be complex. In the brain, it seems to be influenced by the type of hormone used, the duration of the treatment, the nature of the tests and by the brain region studied (Genazzani et al., 2002). The latter could explain the change on nucleotide hydrolysis observed for cerebral cortex, but not for hippocampus in synaptosomal fraction from female rats.

In the last few years, the hormone replacement therapy has been exhaustively discussed because a rapid increase in life expectancy had occurred and the women will spend a significant portion of their lives in the postmenopausal state. From the studies published in the recent past years (Viscoli et al., 2001; Hulley et al., 1998; Mulnard et al., 2000; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002), the hormone replacement therapy indication is being reviewed.

The results presented in this manuscript should be considered relevant for the hormone replacement therapy, since there are many controversies about this area and the relationship between adenosine and sex steroids is still poorly understood.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Dr. Carla Dalmaz for the helpfull assistance with hormone pellets. This work was supported by PRONEX, CNPq, CAPES and FAPESP.

### **References**

- 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.) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 209-219.

- Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Moreira, C.M., Bonan, C.D., Sarkis, J.J.F., Dias, R.D., 1995. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from rat brain plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37, 209-219.
- Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 83 (6), 851-857.
- Bonan, C.D., Schetinger, M.R.C., Battastini, A.M.O., Sarkis, J.J.F., 2001. Ectonucleotidases and synaptic plasticity: implications in physiological and pathological conditions. *Drug Develop. Res.* 52, 57-65.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 218-254.
- Brown, T.J., MacLusky, N.J., Shanabrough, M., and Naftolin, F., 1990. Comparison of age- and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progesterin receptor induction in the rat brain. *Endocrinol.* 126, 2965-2972.
- Chan, K., Delfert, D., Junges, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.
- Cunha, R.A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38, 107-125.
- Dubal, D.B., Kashon, M.L., Pettigrew L.C., Ren, J.M., Finklestein, S.P., Rau, S.W., Wise, P.M., 1998. Estradiol protects against ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1253-1258.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., 2001. The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 31-55.

- Fiedler, J.L., Pollard, H.B., Rojas, E., 1992. Quantitative analysis of depolarisation-induced ATP released from mouse brain synaptosomes: external calcium dependent and independent process. *J. Memb. Biol.* 127 (1), 21-33.
- Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L., 2000. Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.* 63, 29-60.
- Gamaro, G.D., Prediger, M.E.; Lopes, J.B., Dalmaz, C., 2003. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76, 327-333.
- Genazzani, A.R., Monteleone, P., Gambacciani, M., 2002. Hormonal influence on the central nervous system. *Maturitas* 43(1), 11-17.
- Harms, C., Lautenschlager, M., Bergk, A., Katchanov, J., Freyer, D., Kapinya, K., Herwig, U., Megow, D., Dirnagl, U., Weber, J.R., Hörtnagl, H., 2001. Differential Mechanisms of Neuroprotection by 17  $\beta$ -estradiol in Apoptotic versus Necrotic Neurodegeneration. *The J. Neurosc.* 21 (8), 2600-2609.
- Hauber, W., Bareiß, A., 2001. Facilitative effects of an adenosine A1/A2 receptor blockade on spatial memory performance of rats: selective enhancement of reference memory retention during the light period. *Behav. Brain Res.* 118, 43-52.
- Heymann, D., Reddington, M., Kreutzberg, G.W., 1984. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43, 971-978.
- Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B., Vittinghoff, E., 1998. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 280, 605-613.

- Luine, V.N., Richards, S.T., Wu, V.Y., Beck, K.D., 1998. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm. Behav.* 34, 149-162.
- Moreau, J.L., Huber, G., 1999. Central adenosine A2A receptors: an overview. *Brain Res. Rev.* 31, 65-82.
- Mulnard, R.A., Cotman, C.W., Kawas, C., van Dyck, C.H., Sano, M., Doody, R., Koss, E., Pfeiffer, E., Jin, S., Garnst, A., Grundman, M., Thomas, R., Thal, L.J., 2001. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer's disease. *JAMA* 283, 1007-1015.
- Nagy, A.K. and Delgado-Escueta, A.V., 1984. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using a non toxic isoosmotic gradient (Percoll). *J. Neurochem.* 43, 1114-1123.
- Nedeljkovic, N., Djordevic, V., Horvat, A., Nikezic, G., Kanazir, D.T., 2000. Effect of steroid hormone deprivation on the expression of ecto-ATPase in distinct brain regions of female rats. *Physiol. Res.* 49, 419-426.
- Parker, M.G., White, R., 1996. Nuclear receptors spring into action. *Nat. Struct. Biol.* 3, 113-115.
- Phillis, J.W., Wu, P.H., 1981. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16, 187-239.
- Ribeiro, J.A., 1999. Adenosine A2A receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. *Eur. J. Pharmacol.* 375, 101-113.
- Ribeiro, J.A., Sebastião, A.M., de Mendonça, A., 2003. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 68, 377-392.

- Richardson, P.J., Brown, S.J., 1987. ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J. Neurochem.* 48(2), 622-630.
- Sarkis, J.J.F., Saltó, C., 1991. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26, 871-876.
- Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Frasseto, S.S., Dias, R.D., 1995. ATP diphosphohydrolases: An overview. 47 (3), 131-136.
- Valverde, M.A., Parker, M.G., 2002. Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *Trends Biochem. Sci.* 27 (4), 172-173.
- Viscoli, C.M., Brass, L.M., Kernan, W.N., Sarrel, P.M., Suissa, S., Horwitz, R.I., 2001. A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 345, 1243-1249.
- Wise, P.M., 2003. Estrogens: protective or risk factors in brain function? *Prog. Neurobiol.* 69, 181-191.
- Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 288, 321-333.
- Zimmermann, H., 1992. 5' nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285, 345-365.
- Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52, 44-56.
- Zylinska, L., Legutko, B., 1998. Neuroactive steroids modulate in vitro the  $Mg^{2+}$ -dependent  $Ca^{2+}$ -ATPase activity in cultured rat neurons. *Gen. Pharmacol.* 30 (4), 533-536.
- Zylinska, L., Gromadzinska, E., Lachowicz, L., 1999. Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical  $Ca^{2+}$ -ATPase activity. *Bioch. Bioph. Acta.* 1437, 257-264.

### Legends to figures

Figure 1: Effects of ovariectomy induced by removal of the ovaries on ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex and hippocampus. Bars represent mean (nmol Pi/min/mg protein)  $\pm$  S.D. of at least 6 experiments. \* Significance level determined by ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Figure 2: Effect of estrogen replacement therapy on AMP hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex of adult female rats. Bars represent means (nmol Pi/min/mg protein)  $\pm$  S.D. of at least 6 experiments. \* Significantly different from the control group. # Significantly different from the OVX-oil treatment. Significance level determined by ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Figure 3: Representative semi-quantitative RT-PCR mRNA for 5' nucleotidase. C (control), S (sham-operated), OVX (ovariectomy). The expression was evaluated by CD73 to  $\beta$ -actin mRNA ratio. Note that there was an increase on ecto-5'-nucleotidase mRNA levels in OVX group compared to Control rats. Bars represent means  $\pm$  S.D of CD73 mRNA/ $\beta$ -actin mRNA ratio.

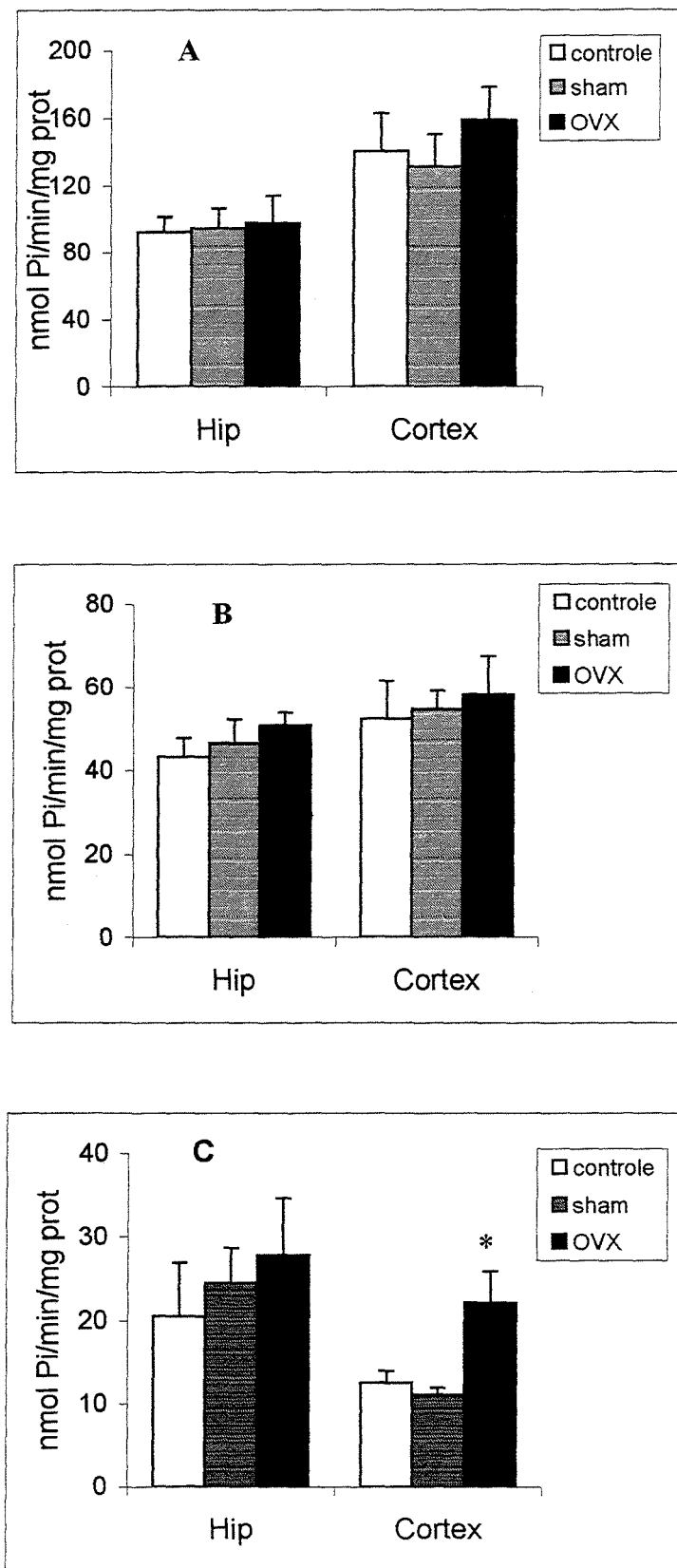


Fig. 1

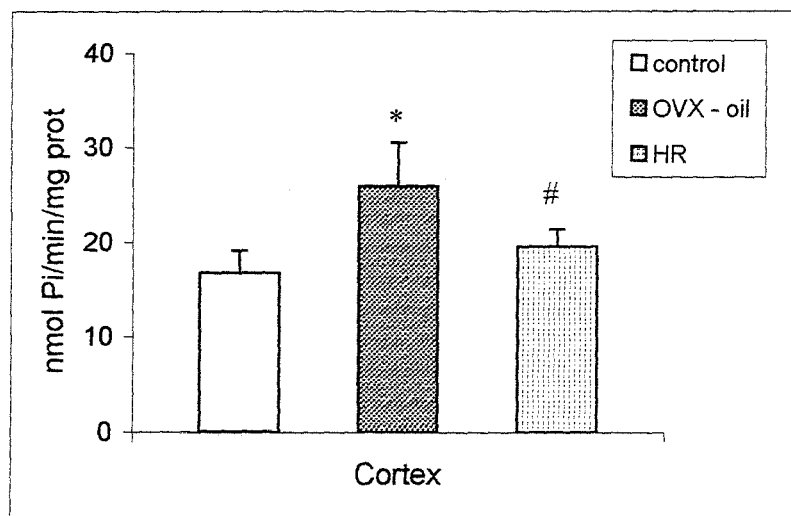


Fig. 2



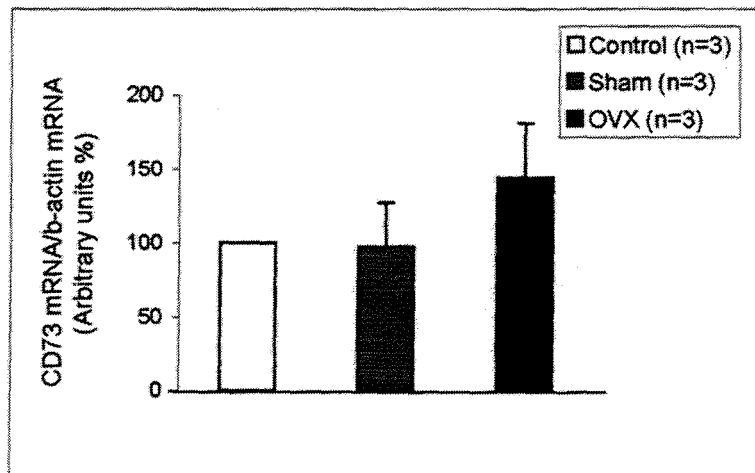
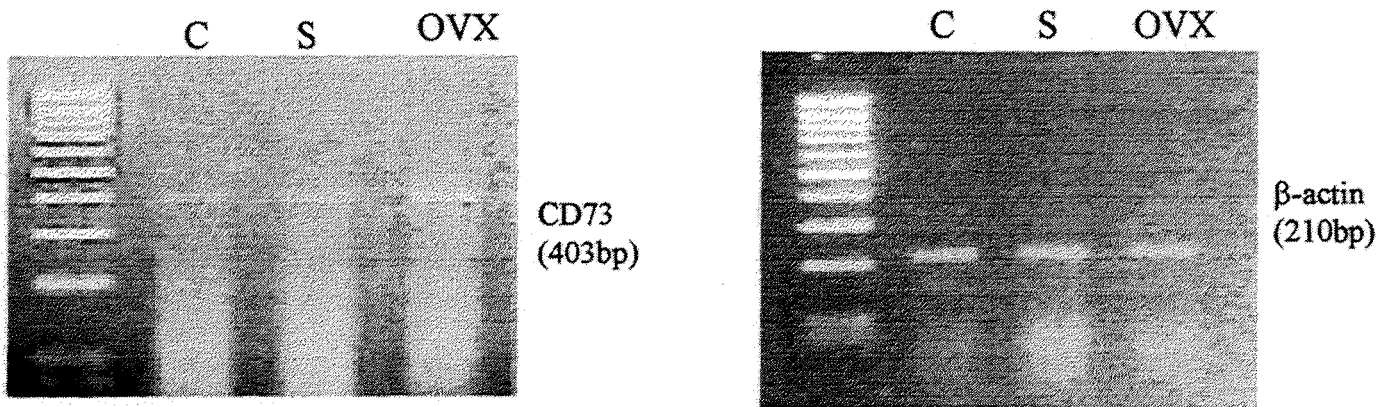


Fig. 3

## 3.2 CAPÍTULO 2

Inhibitory Avoidance Task Reveals Differences in Ectonucleotidase Activities  
between Male and Female Rats.

Submetido à revista *Neurochemical Research*.

## **Inhibitory Avoidance Task Reveals Differences in Ectonucleotidase Activities between Male and Female Rats**

Bárbara Rücker<sup>1</sup>, Grace S. Pereira<sup>1</sup>, Cristina R. Fürstenau<sup>1</sup>, Iván Izquierdo<sup>1</sup>, Carla D.

Bonan<sup>2,\*</sup> and João J. F. Sarkis<sup>1</sup>.

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

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding author:

Dr. Carla Denise Bonan

Departamento de Ciências Fisiológicas - Faculdade de Biociências

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Avenida Ipiranga, 6681

90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: + 55 51 3320 3500/ Ext. 4158

Fax: +55 51 3320 3612

e-mail address: cbonan@puers.br

Running Head: Gender differences in ectonucleotidases after inhibitory avoidance task

## ABSTRACT

Studies demonstrated that endogenous levels of estrogen affect the long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). ATP and adenosine may play a role in the modulation of LTP. Our laboratory observed in previous studies that inhibitory avoidance task is associated with a decrease in hippocampal ectonucleotidase activities in adult male rats. To explore if ectonucleotidases are modulated in memory formation in female rats, as observed in males, we evaluated the effect of inhibitory avoidance training on synaptosomal NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rat hippocampus from both sexes. The results demonstrated a decrease in ATP, ADP and AMP hydrolysis (37%, 38% and 32%, respectively) immediately after training and a significant inhibition only in ATP hydrolysis (36%) 30 minutes post-training in male rats. There were no changes in ectonucleotidase activities from female rats. These findings provide support for the view that could exist biochemical differences in ectonucleotidase activities between males and females.

Keywords: estrogen, ectonucleotidases, memory, ATP, LTP, LTD.

## INTRODUCTION

Research on the differential performance of males and females in memory tasks has been performed. In a spatial navigation task, there were no male-female differences during acquisition, but it has been observed a better performance of males during extinction of memory (1).

A fundamental difference between the two genders is that females are influenced by cyclic hormonal levels (2). Fluctuations in estrogen levels, either by hormone treatment or naturally across the reproductive cycle in intact females, lead to a host of morphological (3,4,5), neurochemical (6,7,8) and electrophysiological (9,10,11) changes in brain areas, which participate actively in learning and memory including hippocampus, striatum, amygdala and frontal cortex (12). Recent studies indicate that the female gonadal hormone, estradiol, enhances performance of learning and memory tasks both in animal models and in humans (13). Furthermore, it has been suggested that different cognitive abilities are more or less sensitive to the modulating effects of estrogen (14,15,16) and there is clear evidence that estrogen may affect cognition through direct or indirect actions on the hippocampus (15,17).

The long-term potentiation (LTP) is considered as a partial model of memory and may even be considered as a particular form of memory, measurable at the eletrophysiological level (18). In addition, the long-term depression (LTD), another plastic event, has often been proposed to underlie memory events (19,20). It has been demonstrated that cyclical changes in endogenous levels of estrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region (21), while chronic treatment with estradiol does not alter LTP *in vitro* in hippocampus (22).

ATP is known to exert potent effects on the central nervous system, where it can act as a neurotransmitter or as a modulator regulating the activity of other transmitter structures (23,24). There is evidence that extracellular ATP may play an important role in synaptic plasticity events, like LTP (25,26,27). The signalling actions induced by extracellular ATP are directly correlated by the activity of ectonucleotidases, because they trigger enzymatic conversion of ATP to adenosine, controlling the nucleotide and nucleoside levels in the synaptic cleft (28). ATP released at synapses can be hydrolyzed by a sophisticated pathway composed by ectoenzymes that include NTPDase1 or NTPDase3 (ecto-apyrase, ATP diphosphohydrolase, EC 3.6.1.5), which can transform ATP and ADP to AMP. ATP can also be hydrolyzed by NTPDase2 (ecto-ATPase, EC 3.6.1.3), producing ADP, (29). The AMP produced by NTPDase1 or 3 is subsequently hydrolyzed to adenosine by an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), a key enzyme in this pathway (30,31,32). Adenosine is an endogenous nucleoside that also exerts an important role in the regulation of neuronal excitability (33,34). It has previously been shown that adenosine can modulate synaptic plasticity in rats (34). The synchronic action of a NTPDase and a 5'-nucleotidase is able to regulate the extracellular ratio of nucleotides/nucleosides (35).

Recently, we observed that one-trial inhibitory avoidance task is associated with a learning-specific, time-dependent decrease in hippocampal ectonucleotidase activities in adult male rats (36). To explore if the ectonucleotidase pathway is modulated in the process of memory formation in female rats, as observed in males, we evaluated the effect of inhibitory avoidance training on synaptosomal NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rat hippocampus from both sexes.

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

*Chemicals.* Nucleotides (ATP, ADP, AMP), HEPES, Trizma Base and EDTA were obtained from Sigma Chemical CO. (ST. Louis, MO, USA). Percoll was obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden) and was routinely filtered through millipore AP 15 pre-filters to remove aggregated, incompletely coated particles. All others reagents were of analytical grade.

*Subjects.* Male and female Wistar rats (age 70-90 days; 200-280 g) from our breeding stock were used in the study. Animals were maintained at a constant temperature ( $23 \pm 2$  °C) in a 12 h light dark cycle and had free access to food and water throughout the experiment. Just females in the diestrus state were used. Determination of the phase of estrous cycle was made by the type of vaginal cells observed in the microscope (x 200). Procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations of Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council).

*Step-down inhibitory avoidance task.* Rats were gently placed on a 2.5-cm high, 7.0-cm wide, 25.0 long Formica platform at the left side of a 50 x 25 x 25-cm apparatus, the floor of which was series of parallel 0.1-cm caliber stainless-steel bars spaced 1.0 cm apart. Immediately after stepping down, placing the four paws on the grid, animals received a 0.5 mA, 2-s scrambled foot-shock and were removed from the training apparatus.

*Isolated foot-shock.* In order to examine the possibility that the foot-shock could alter the enzyme activities, rats (shocked group) were placed directly on the grid and received a 0.5 mA, 2-s scrambled foot-shock, after which they were removed. A barrier was placed in order to avoid animals seeing an escape route to the platform.

*Synaptosomes preparation.* The rats were killed by decapitation in two different times (0 and 30 minutes) and their hippocampi were removed to an ice-cold medium solution (320 mM sucrose, 5.0 mM HEPES, pH 7.5, and 0.1 mM EDTA). Structures were gently homogenized in five volumes of ice-cold medium solution with a motor-driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described previously by Nagy and Delgado-Escueta (37). Briefly, 0.5 ml of the crude mitochondrial fraction were mixed with 4.0 ml of an 8.5% Percoll solution and layered onto an isoosmotic Percoll/sucrose discontinuous gradient (10/16%). The synaptosomes that banded at the 10/16% Percoll interface were collected with wide tip disposable plastic transfer pipettes. The synaptosomal fractions were then washed twice at 15,000x g for 20 minutes with the same ice-cold medium to remove the contaminating Percoll. The synaptosome pellet was resuspended to a final protein concentration of approximately 0.5 mg/ml. The material was prepared fresh daily and maintained at 0-4°C throughout preparation.

*Enzyme assays.* The reaction medium used to assay ATP and ADP hydrolysis was essentially as described previously (38) and contained 5.0 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM TRIS-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µL. The reaction medium used to assay 5'-nucleotidase activity contained 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 0.15 M sucrose in a final volume of 200 µL. The synaptosomal fractions (10-20 µg protein) were added to the reaction mixture, preincubated for 10 minutes and incubated for 20 minutes at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP, ADP or AMP to a final concentration of 1.0 mM and stopped by the addition of 200 µL 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 minutes and aliquots were taken for the assay of released inorganic phosphate



(Pi) (39). Incubation times and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct nonenzymatic hydrolysis of the substrates.

*Protein determination.* Protein was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (40).

*Statistical analysis.* The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. Data were analyzed by two-way ANOVA and one-way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference with statistical analysis used. All analyses were performed with an IBM compatible computer using the SPSSPC software.

## RESULTS

ATP hydrolysis in hippocampal synaptosomes from male rats trained and killed immediately (0 minutes) or 30 minutes after the training session in step-down inhibitory avoidance task decreased 37% and 36%, respectively, when compared to the respective shocked group (Fig. 1A). These effects are in agreement with results published by Bonan et al. (36). However, in female rats, there were no observed changes in ATP hydrolysis either immediately or 30 minutes after training session (Fig 1B).

The results obtained about the ADP hydrolysis showed a 38% decrease in this activity when male rats were trained and killed immediately after the training session (0 minutes), but there were no differences when the animals were trained and killed 30 minutes after the training. The effect was considered significant ( $P < 0.05$ ) when compared to the respective shocked group (Fig 2A). In this condition, the sex difference was also observed and there were no differences in ADP hydrolysis between shocked and trained groups for female rats (Fig 2B).

We also compared the effects of the step-down inhibitory avoidance task on ecto-5'-nucleotidase activity in hippocampal synaptosomes from male and female rats. As observed for Bonan et al. (36), our results showed a significant inhibition of 5'-nucleotidase activity immediately after training session (0 minutes) for male rats (Fig 3A). The results showed a 32% inhibition of 5'-nucleotidase activity for males, but there were no changes in the enzyme activity for females (Fig 3B). The group killed at 30 minutes after the training session did not present significant changes on 5'-nucleotidase activity for both sexes. There were no significant differences either for males or for females in the enzyme activities studied between the control group (normal rats) and the shocked groups killed at the corresponding times

## DISCUSSION

The present results demonstrate that inhibitory avoidance task produces distinct effects on ectonucleotidase activities from hippocampal synaptosomes of male and female rats.

There is increasing evidence to suggest that memory function is linked to the female reproductive states and it may be due to altered function of the hippocampus (22). Step-down inhibitory avoidance learning in the rat triggers biochemical events in the hippocampus that are necessary for the retention of this task (40). The events are similar in many ways to those described for LTP and other forms of neural plasticity (42,43, 44). It was observed that estrogen levels are involved in memory formation. Estradiol can enhance learning and memory (13,45, 46), but an acute administration of estradiol is associated with impaired learning on hippocampal-dependent tasks, including the Morris water task (47, 48) and avoidance memory tasks (49, 50).

In the present work and in previous studies from our laboratory (36), we demonstrated that ATP, ADP and AMP hydrolysis decreased immediately after the training session (0 minutes) in hippocampal synaptosomes of male rats submitted to inhibitory avoidance task. It has also been demonstrated here and by Bonan et al. (36) that ATP hydrolysis decreased in hippocampal synaptosomes of male rats killed at 30 minutes after the training session. The inhibitory effect observed could be due to some allosteric modulation of the enzyme activities involved in the adenine nucleotides degradation or other possible mechanisms, like protein phosphorylation. The biochemical cascade of memory consolidation involves, beyond activation of signaling system, the pre- and postsynaptic activation of protein kinases A and C and calcium/calmodulin kinase II into hippocampus (41). If protein kinases play a role in the maintenance of the early stages of memory consolidation, the participation of extracellular ATP as a substrate in ecto-protein phosphorylation (36,42) could be necessary, at least, in male rats. However, our study has shown that there were no changes in ectonucleotidase activities from hippocampal synaptosomes of female rats trained and killed immediately and 30 minutes after inhibitory avoidance task. Then, in relation to the ecto-nucleotidases in central nervous system, there is a marked difference between sexes during the consolidation of an aversive memory.

It is becoming clear that these dichotomies fail to account for the complexity of estrogen actions. Some evidences indicates that neuroactive steroids, apart from their well-documented genomics effects, are potent modulators of the plasma membrane receptors that may interact with different effector systems in neuronal membranes (51, 52). Subsequent research has identified that estrogen may influence neuronal excitability in the hippocampus through modulation of NMDA, AMPA and GABA receptor-mediated currents (53, 54). In the proestrus, estrogen levels are high, the NMDA receptor-mediated

$\text{Ca}^{+2}$  transients are enhanced, LTP is augmented and LTD was severely attenuated (21). In this study, we evaluated the effect of inhibitory avoidance task on ectonucleotidase activities using females at diestrus of estrous cycle, when estrogen is relatively low. It has been demonstrated that at diestrus the LTP induction was lower than at proestrus (21). Since at diestrus the LTP induction is decreased and it is a partial model of memory consolidation, it could contribute to the lack of an inhibitory effect on ATP hydrolysis in females, as observed in males. Then, we can suggest that the possible increase in ATP levels observed in males could be not necessary to the biochemical mechanisms related to synaptic plasticity in females, at least in the diestrus phase. Moreover, at diestrus, it has been shown that LTD was clearly manifested, but unlike LTP, LTD requires activation of protein phosphatases (55, 56). These findings provide additional support for the idea that there are biochemical differences in the modulation of ectonucleotidase activities during synaptic plasticity events related to learning between males and females.

These biochemical differences between genders to inhibitory avoidance task led us to suggest that this distinction probably exists more by natural and sex-specific mechanisms than cognitive abilities, since we did not evaluate memory. It is hoped that the biochemical findings presented in this study can provide a framework for development of hypotheses and strategies for future studies about comparative memory processing in males and females.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from CNPq, CAPES and PRONEX.

## REFERENCES

1. Cimadevilla, J.M., Fenton, A.A. and Bures, J. 2000. Continuous place avoidance task reveals differences in spatial navigation in male and female rats. *Behav. Brain Res.* 107: 161-169.
2. Bray, J., Cragg, P. Macknight, A., Mills, R. and Taylor, W. 1994. *Lecture notes in human physiology*. 3 rd edition. Blackwell Scientific Publ. Pp. 302.
3. Murphy, D.D and Segal, M. 1996. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J. Neurosci.* 16: 4059-4068.
4. Stewart, j. and Kolb, B. 1994. Dendritic branching in cortical pyramidal cells in response to ovariectomy in adult female rats: Suppression by neonatal exposure to testosterone. *Brain Res.* 654:149-154.
5. Wooley, C. S. 1998. Oestrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm. Behav.* 34: 140-148.
6. Gibbs, R.B. 2000. Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. *Neuroscience* 101: 931-938.
7. Luine, V.N., Richards, S.T., Wu, V.Y. and Beck, K.D. 1998. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm. Behav.* 34: 149-162.
8. Weiland, N.G. 1992. Estradiol selectively regulates agonist binding sites on the NMDA receptor complex in the CA1 region of the hippocampus. *Endocrinology* 131: 662-668.

9. Cordoba Montoya, D.A. and Carrer, H.F. 1997. Oestrogen facilitates induction of long-term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res.* 778, 430-438.
10. Desmond, N. L., Zhang, D.X., and Levy, W.B. 2000. Estradiol enhances the induction of homosynaptic long-term depression in the CA1 region of the adult ovariectomized rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 73:180-187.
11. Good, M., Day, M. and J.L. 2000. Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur. J. Neurosci.* 11: 4476-4480.
12. White, N.M., and McDonald, R.L. 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 77: 125-184.
13. Luine, V.N. 1997. Steroid hormone modulation of hippocampal dependent spatial memory. *Stress* 2: 21-36.
14. Duff, S.J., and Hampson, E. 2000. A beneficial effect of oestrogen on working memory in postmenopausal woman taking hormone replacement therapy. *Horm. Behav* 38: 262-276.
15. Korol, D.L. and Kolo, L.L. 2002. Oestrogen-induced changes in place and response learning in young adult female rats. *Behav. Neurosci.* 116: 411-420.
16. O'Neal, M.F., Means, L.W., Poole, M.C. and Hamm, R.J. 1996. Oestrogen affects performance of ovariectomized rats in a two-choice water-escape working memory task. *Psychoneuroendocrinol.* 21:51-65.
17. Packard, M.G. and Teather, L.A. 1997. Intra-hippocampal estradiol infusion enhances memory in ovariectomized rats. *Neuroreport* 8: 3009-3013.

18. Izquierdo, I. and McGaugh J.L. 2000. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav. Pharmacol.* 11: 517-534.
19. Pockett, S., Brookes, N.H. and Bindman, L.J. 1990. Long-term depression at synapses in slices of rat hippocampus can be induced by bursts of postsynaptic activity. *Exp Brain Res.* 80: 196-200.
20. Tsumoto, T. 1990. Long-term potentiation and depression in the cerebral neocortex. *Jpn. J. Physiol.* 40: 573-593.
21. Good, M., Day, M. and Muir J.L. 1999. Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur. J. Neurosci.* 11: 4476-4480.
22. Barraclough, D.J., Ingram, C.D. and Brown, M.W. 1999. Chronic treatment with oestradiol does not alter in vitro LTP in subfield CA1 of the female rat hippocampus. *Neuropharmacol.* 38: 65-71.
23. Bonan, C.D., Roesler, R., Quevedo, J., Battastini, A.M.O., Izquierdo, I. and Sarkis, J.J.F. 1998. Effects of suramin on hippocampal apyrase activity and inhibitory avoidance learning of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63: 153-158.
24. Phillis, J.W. and Wu, P.H. 1981. The role of adenosine and its nucleotides in the central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16: 187-239.
25. Cunha, R.A., Vizi, E.S., Ribeiro, J.A. and Sebastião, A.M. 1996. Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high-

- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 67: 2180-2187.
26. Fujii, S., Kato, H. Kuroda, Y. 1999. Extracellular adenosine 5'triphosphate plus activation of glutamatergic receptors induces long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 276: 21-24.
27. Wieraszko, T.N. and Ehrlich, Y.H. 1994. On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Neurochem.* 63: 1731-1738.
28. Bonan, C.D., Roesler, R., Pereira, G.S., Battastini, A.M.O., Izquierdo, I. and Sarkis, J.J.F. 2000. Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. *Brain Res.* 854: 253-256.
29. Bonan, C.D., Schetinger, M.R.C., Battastini, A.M.O. and Sarkis, J.J.F. 2001. Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: Implications in Physiological and Pathological conditions. *Drug Develop. Res.* 52: 57-65
30. Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Moreira, C.M., Bonan, C.D. and Sarkis, J.J.F., Dias, R.D. 1995. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from rat brain plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 209-219.
31. Sarkis, J.J.F. and Saltó, C. 1991. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26: 871-876.



32. Zimmermann, H. 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285: 345-365
33. Cunha, R.A. 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38: 107-125.
34. De Mendonça, A. and Ribeiro, J.A. 1997. Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.* 60: 245-251.
35. Zimmermann, H., Braun, N., Kegel, B. and Heine, P. 1998. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem. Int.* 32: 421-425.
36. Bonan, C.D., Dias, M.M., Battastini, A.M.O., Dias, R.D. and Sarkis, J.J.F. 1998. Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. *Neurochem. Res.* 23: 979-984.
37. Nagy, A.K. and Delgado-Escueta, A.V., 1984. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using a non-toxic isoosmotic gradient (Percoll). *J. Neurochem.* 43: 1114-1123.
38. 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.) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 209-219.
39. Chan, K., Delfert, D. and Junges, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>+2</sup>-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157: 375-380.

40. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 218-254.
41. Izquierdo, I. and Medina, J.H. 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68(3): 285-316.
42. Chen, W., Wieraszko, A., Hogan, M.V., Yang, H.A., Kornecki, E., Ehrlich, Y.H. 1996. Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8688-8693.
43. Bliss, T.V.P. and Collingridge G.L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-38.
44. Izquierdo, I. and Medina, J.H. 1993. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26: 573-89.
45. Fader, A.J., Hendricson, A.W. and Dohanich, G.P. 1998. Estrogen improves performance of reinforced T-maze alternation and prevents the amnesic effects of scopolamine administered systemically or intrahippocampally. *Neurobiol. Learn. Mem.* 69: 225-240.
46. Gibbs, R.B., Burke, A.M. and Johnson, D.A. 1998. Estrogen replacement attenuates effects of scopolamine and lorazepam on memory acquisition and retention. *Horm. Behav.* 34: 112-125.

47. Frye, C.A. 1995. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiol. Behav.* 57: 5-14.
48. Warren, S.G. and Juraska, J.M. 1995. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav. Neurosci.* 111: 259-266.
49. Diaz-Veliz, G., Urresta, F., Dussaubat, N. and Mora, S. 1991. Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. *Physiol. Behav.* 50: 61-65.
50. McEwen, B.S., Alves, S.E., Bulloch, K., Weiland, N.G. 1997. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology* 48: S8-S15.
51. Zylinska, L. and Legutko, B. 1998. Neuroactive steroids modulate in vitro the  $Mg^{2+}$ -dependent  $Ca^{2+}$ -ATPase activity in cultured rat neurons. *Gen. Pharmacol.* 30: 533-536.
52. Zylinska, L. Gromadzinska, E., Lachowicz, L. 1999. Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical  $Ca^{2+}$ -ATPase activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1437: 257-264.
53. Wong, M. and Moss, R.L. 1992. Long-term and short-term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties hippocampal CA1 neurons. *J. Neurosci.* 12: 3217-3225.
54. Foy, M.R., Xu, J., Xie, X., Brinton, R.D., Thompson, R.F. and Berger, T.W. 1999. 17  $\beta$ -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J. Neurophysiol.*, 81: 925-929.

55. Mulkey, R.M., Herron, C.E. and Malenka, R.C. 1993. Essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 261: 1051-1055.
56. Bear, M.F. and Abraham, W.C. 1996. Long-term depression in hippocampus. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 437-462.

## LEGENDS TO FIGURES

FIG. 1: Effect of training session in a step-down inhibitory avoidance task on ATP hydrolysis by synaptosomal NTPDase of hippocampus from male (A) and female (B) rats. Control represents normal rats; shocked group represents the animals that received only a foot-shock and were killed at 0 and 30 minutes after this conditioning. Trained group represents the animals that were trained in a step-down inhibitory avoidance task and were killed 0 and 30 min after the training. Bars represent the means  $\pm$  SD of at least five animals. (\*) Significantly different from control ( $P<0.05$ ). (a) Significantly different from shocked group ( $P<0.05$ ).

FIG. 2: Effect of training session in a step-down inhibitory avoidance task on ADP hydrolysis by synaptosomal NTPDase of hippocampus from male (A) and female (B) rats. Control represents normal rats; shocked group represents the animals that received only a foot-shock and were killed at 0 and 30 minutes after this conditioning. Trained group represents the animals that were trained in a step-down inhibitory avoidance task and were killed 0 and 30 min after the training. Bars represent the means  $\pm$  SD of at least five animals. (\*) Significantly different from control ( $P<0.05$ ). (a) Significantly different from shocked group ( $P<0.05$ ).

FIG. 3: Effect of training session in a step-down inhibitory avoidance task on AMP hydrolysis by synaptosomal ecto-5' nucleotidase of hippocampus from male (A) and female (B) rats. Control represents normal rats; shocked group represents the animals that received only a foot-shock and were killed at 0 and 30 minutes after this conditioning. Trained group represents the animals that were trained in a step-down inhibitory avoidance task and were killed 0 and 30 min after the training. Bars represent the means  $\pm$  SD of at least five animals. (\*) Significantly different from control ( $P < 0.05$ ). (a) Significantly different from shocked group ( $P < 0.05$ ).

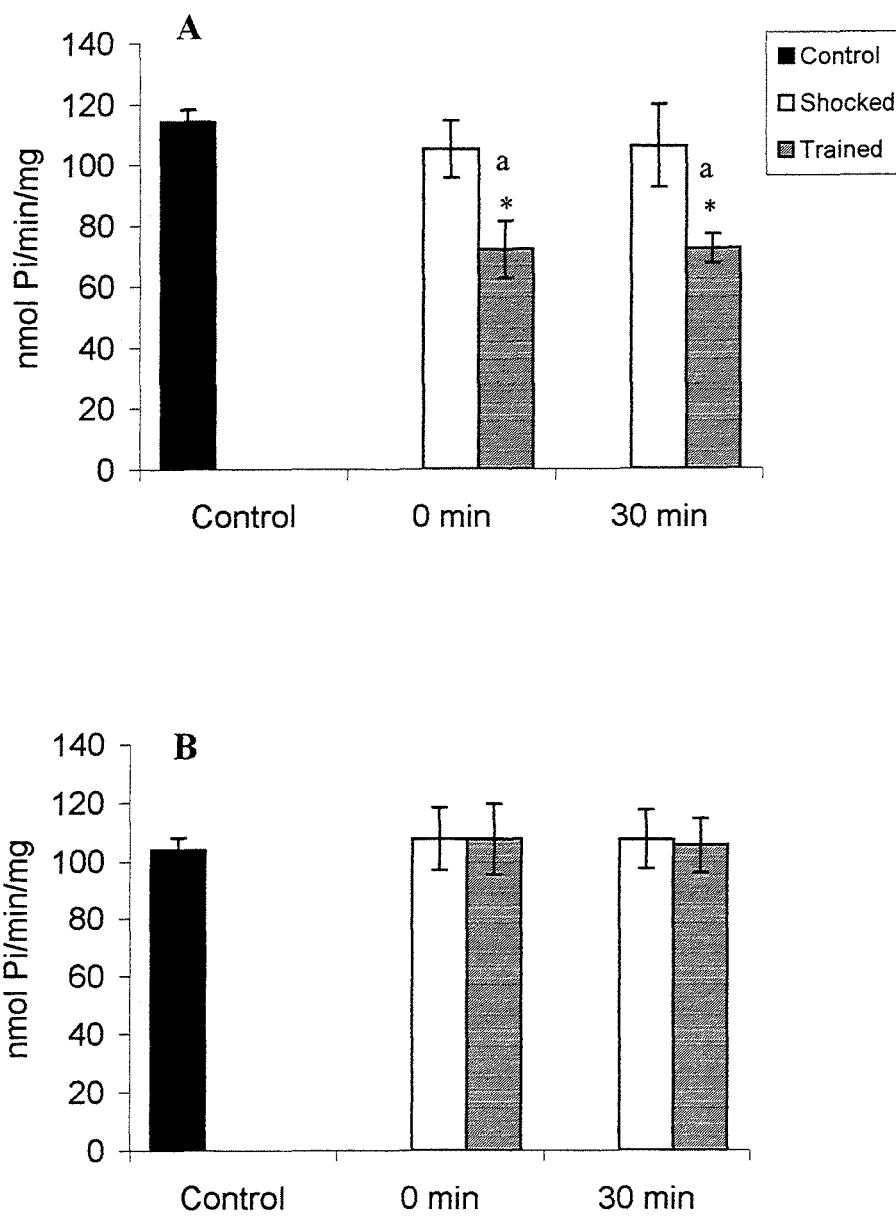


FIG.1

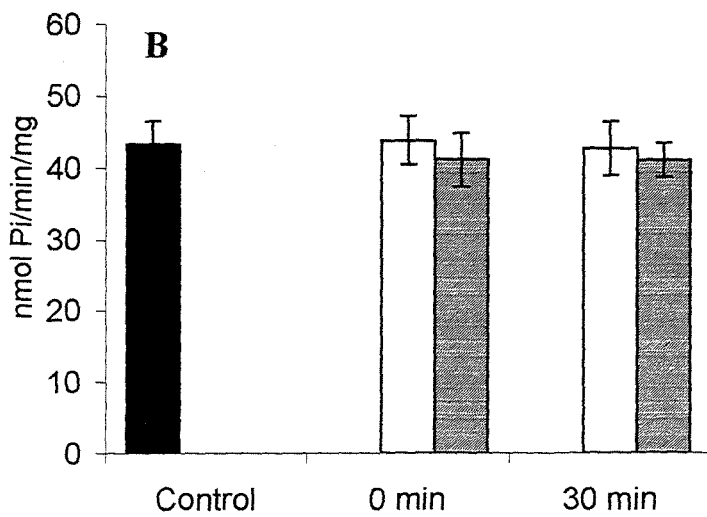
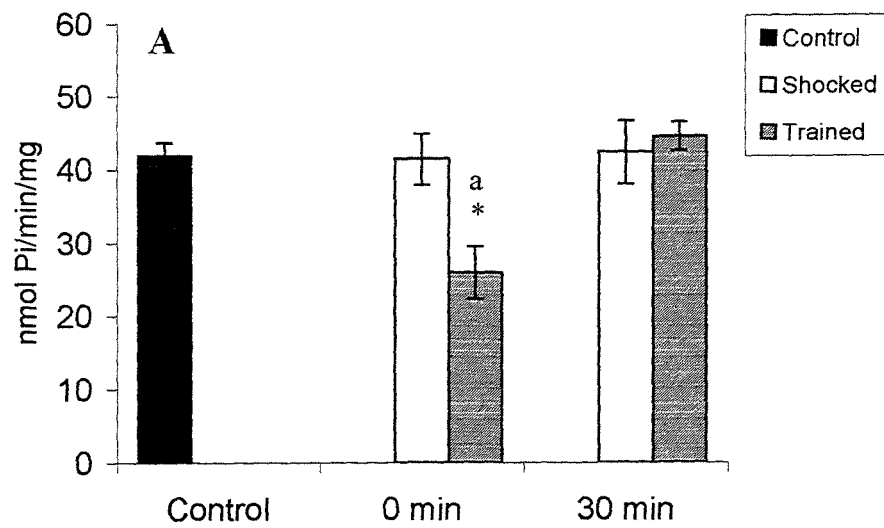


FIG.2



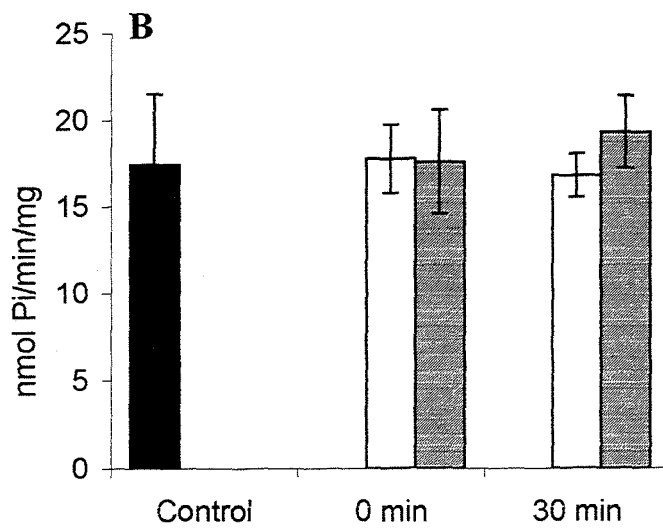
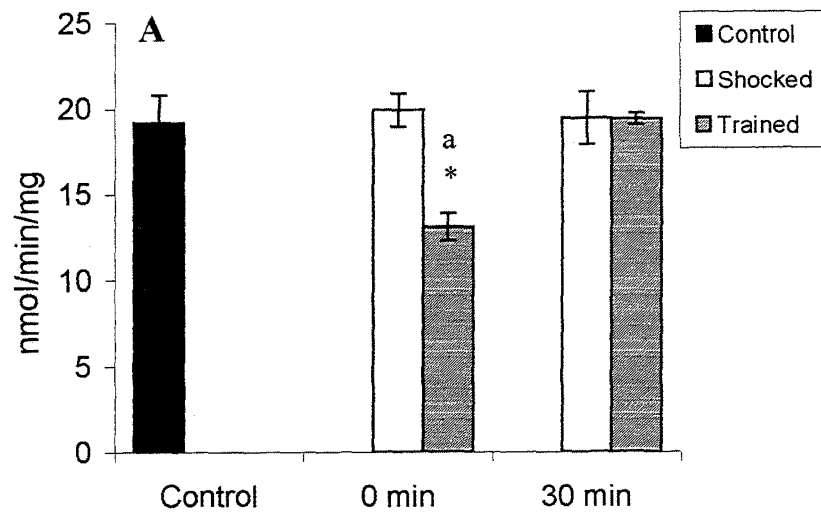


FIG.3

### 3. DISCUSSÃO

Estudos anteriores mostram algumas evidências de que esteróides neuroativos podem afetar a atividade e a expressão de ATPases (ZYLINSKA, 1995; ZYLINSKA & LEGUTKO, 1998; ZYLINSKA et al., 1999; NEDELJKOVIC et al., 2000; CARIO-TOUMANIANTZ et al., 1998; LIU et al., 2001). No entanto, não existem trabalhos mostrando os efeitos dos hormônios esteróides sobre outras ectonucleotidases, como a ATP difosfohidrolase e a 5'-nucleotidase. Assim, primeiramente, investigamos os efeitos dos hormônios esteróides sobre a atividade de ectonucleotidases de sinaptossomas de córtex e hipocampo em ratas castradas. Posteriormente, trabalhamos com as evidências de que os hormônios esteróides podem influenciar em tarefas de memória e de que estudos do nosso laboratório mostram que as ectonucleotidases também podem ser alteradas em tarefas de memória, em machos. Dessa forma, mostramos as diferenças entre ratos machos e fêmeas na atividade das ectonucleotidases na tarefa de esquiva inibitória em sinaptossomas de hipocampo.

No capítulo 1 desta dissertação, obtivemos resultados que demonstraram uma alteração na atividade da ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex de ratas castradas. A ovariectomia aumentou a atividade da 5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex quando comparada aos grupos controle (fase de diestro) e sham-operados, mostrando que este efeito se deve à deprivação hormonal através da castração e que não há nenhum efeito proveniente do estresse da cirurgia.

Diversas manipulações fisiológicas podem aumentar a adenosina extracelular no cérebro, e isto parece ser consequência da regulação de enzimas chaves, como a 5'-nucleotidase (DUNWIDDIE & MASINO, 2001). Nosso estudo mostrou haver um aumento da atividade da 5'-nucleotidase nas ratas ovariectomizadas, o que nos faz pensar que está

havendo um aumento dos níveis de adenosina no cérebro destas ratas. Este aumento de adenosina pode ser um importante fator, já que este nucleosídeo tem sido considerado um importante agente neuroprotetor e neuromodulador (BONAN et al., 2001; CUNHA, 2001; DUNWIDDIE & MASINO, 2001; RIBEIRO et al., 2003). Além disso, a adenosina é capaz de modular a atividade do sistema nervoso pré-sinápticamente, pela inibição ou facilitação da liberação de neurotransmissores, e pós-sinápticamente, através da hiperpolarização ou despolarização de neurônios e/ou exercendo efeitos não sinápticos (RIBEIRO et al., 2003). Assim, o aumento da adenosina poderia ser um importante mecanismo compensatório para controlar um possível desequilíbrio causado pela deprivação hormonal.

O estudo da 5'-nucleotidase é de particular interesse em sistema nervoso central, devido à sua distribuição regional altamente específica (HEYMANN et al., 1984.) Além disso, devemos lembrar que os efeitos da adenosina dependerão da densidade relativa de receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  presentes na região estudada (MOREAU & HUBER, 1999; RIBEIRO, 1999). Neste trabalho, observamos uma mudança da atividade da 5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas castradas, porém o mesmo não foi observado em hipocampo. Como o córtex e o hipocampo se assemelham em relação à distribuição da enzima e de receptores, sendo os do tipo  $A_1$  os mais expressados (RIBEIRO et al., 2003), esta diferença encontrada pode estar relacionada com outros fatores. Estudos mostram que entre as regiões cerebrais mais protegidas pelo estrogênio está o córtex, seguido do estriado (DHANDAPANI & BRANN, 2002a; DHANDAPANI & BRANN, 2002b). Assim, podemos pensar que esta diferença ocorreu por causa da ação diferencial dos hormônios nas diferentes regiões estudadas.

Para investigarmos se o aumento na hidrólise do AMP em córtex foi consequência de uma maior expressão da enzima, foram determinados e comparados os níveis de mRNA

para ecto-5' nucleotidase/CD73 em córtex dos três grupos testados: controle, sham-operado e OVX (ovariectomia). A análise do RT-PCR confirmou que o aumento da atividade da enzima nas ratas castradas ocorreu devido a uma maior expressão da enzima nestes animais. Estes resultados estão de acordo com a proposta clássica de que os hormônios esteróides atuam modulando a expressão gênica via receptores nucleares (BEATO et al., 1995; PARKER & WHITE, 1996). Além disso, testamos três hormônios *in vitro* (17 $\beta$ -estradiol, DHEAS e sulfato de pregnenolona), os quais não alteraram a hidrólise dos nucleotídeos, sugerindo mais uma vez que, nestas preparações, os hormônios esteróides não são capazes de atuar via mecanismos não genômicos.

Por último, resolvemos testar o efeito da terapia de reposição hormonal com estrogênio sobre a atividade das ectonucleotidases em ratas castradas. Observamos que o efeito da ovariectomia sobre a atividade da 5'-nucleotidase foi revertido, ou seja, houve uma diminuição da hidrólise de AMP até os níveis de controle em sinaptossomas de córtex. Como a adenosina tem sido considerada um importante agente neuroprotetor e neuromodulador, esta reposição hormonal poderia estar alterando um importante mecanismo compensatório para aumentar os níveis de adenosina nas ratas castradas. Além disso, os efeitos da reposição hormonal no cérebro parecem ser influenciados pelo tipo de hormônio utilizado, pela duração do tratamento, pelos tipos de testes realizados e pela região testada (GENAZZANI, 2002). Isto explicaria os resultados que obtivemos, nos quais mais uma vez ocorreram mudanças na hidrólise de AMP apenas em córtex e não em hipocampo durante o tratamento de reposição com estrogênio.

O efeito dos hormônios esteróides, principalmente do estrogênio, sobre o cérebro e corpo das mulheres tem recebido uma enorme atenção nos últimos anos. Contudo, a

heterogeneidade entre os estudos dificulta uma generalização, e a recomendação de uma terapia de reposição hormonal tornou-se extremamente discutível. Recentes estudos publicados (VISCOLI et al., 2001; HULLEY et al., 1998; MULNARD et al., 2000; WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS, 2002) têm demonstrado que a terapia de reposição hormonal pode não ser a melhor indicação. A relação entre os efeitos tróficos do estrogênio e sua ação neuroprotetora permanece incerta. Crescentes evidências indicam que o estradiol influencia no aparecimento de riscos de choque cerebrovascular e que, além disso, pode estar envolvido na extensão da injúria cerebral após insultos isquêmicos causados por doenças cardiovasculares e choques cerebrovasculares (WISE, 2003). Assim, um primeiro trabalho mostra que há uma possível relação entre os hormônios esteróides e a 5'-nucleotidase e que as alterações nos níveis de adenosina podem prover algum entendimento a respeito dos efeitos indesejáveis que os últimos trabalhos têm demonstrado a respeito da reposição hormonal.

No capítulo 2 desta dissertação, em um outro artigo, demonstramos que a tarefa de esquivar inibitória provoca efeitos distintos na atividade das ectonucleotidases entre ratos machos e fêmeas.

Diversos estudos mostraram que os níveis de estrogênio estão envolvidos na formação da memória. Alguns trabalhos mostram que o estradiol pode melhorar a memória e o aprendizado (LUINE, 1997; FADER et al., 1998; GIBBS et al., 1998); no entanto, por outro lado, uma administração aguda de estradiol foi associada com uma diminuição no aprendizado em tarefas hipocampo-dependentes, incluindo a tarefa aquática de Morris (FRYE, 1995; WARREN & JURASKA, 1995) e tarefas aversivas de memória (DIAZ-VELIZ et al., 1991; McEWEN et al., 1997).

Estudos recentes sugerem que a memória está ligada ao estágio do ciclo reprodutivo em ratas fêmeas, o que pode ocorrer devido a alterações na função do hipocampo (BARRACLOUGH et al, 1999). Assim, para evitarmos uma variação hormonal durante os experimentos, utilizamos apenas ratas em fase de diestro, ou seja, quando a concentração de estradiol se encontra diminuída. Além disso, utilizamos o hipocampo destas ratas para o estudo, já que este tem sido bastante utilizado como modelo para o estudo do mecanismo envolvido na plasticidade sináptica, como potenciação de longa duração (LTP) (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Este fenômeno, que tem sido repetidamente proposto como um modelo molecular envolvido em certas formas de aprendizado e memória, constitui-se em uma modificação da eficiência sináptica de longa duração (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO & MEDINA, 1995).

Para avaliarmos possíveis mudanças nas atividades das ectonucleotidases comparando machos e fêmeas durante o processo de memória, utilizamos a tarefa de esquiva inibitória, que em ratos desencadeia uma série de eventos bioquímicos no hipocampo que são necessários para a retenção desta tarefa. Estes eventos são similares àqueles descritos para LTP e outras formas de plasticidade neural (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; MAREN & BAUDRY, 1995; IZQUIERDO E MEDINA, 1995, 1997a).

O ATP é conhecido por exercer potentes efeitos no sistema nervoso central, onde pode agir como neurotransmissor ou como modulador, regulando a atividade de outras estruturas de neurotransmissão (BONAN ET AL., 1998; PHILLIS & WU, 1981). Existem evidências de que o ATP extracelular tem um importante papel em eventos de plasticidade sináptica, como a LTP (CUNHA et al., 1996; FUJII et al., 1999; WIERASZKCO & EHRLICH, 1994). As ações sinalizadoras induzidas pelo ATP extracelular estão

diretamente correlacionadas com a atividade de ectonucleotidases, já que estas são as responsáveis pela conversão enzimática extracelular do ATP até adenosina, controlando, assim, os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos na fenda sináptica (BONAN et al., 2000).

A adenosina é um nucleosídeo endógeno que também exerce um importante papel na transmissão sináptica e na regulação da excitabilidade neuronal (RIBEIRO, 1996). Através da ativação dos receptores  $A_1$ , a adenosina modula fenômenos de plasticidade sináptica como a potenciação de longa duração (LTP) (DE MENDONÇA & RIBEIRO, 1994b), a depressão de longa duração (LTD) e a depotenciação (DE MENDONÇA et al., 1997). Assim, a ação conjunta de uma NTPDase e uma 5'-nucleotidase é capaz de regular os níveis extracelulares de nucleotídeos/nucleosídeos (ZIMMERMANN et al., 1998), que provavelmente são muito importantes para os processos de formação da memória (BONAN et al., 1998).

Recentemente, estudos do nosso laboratório demonstraram que a tarefa de esquiva inibitória está associada com uma diminuição tempo-dependente na atividade de ectonucleotidases de hipocampo em ratos machos adultos (BONAN et al., 1998). Para explorarmos se a via das ectonucleotidases é modulada durante o processo de formação da memória em fêmeas, assim como foi observado em machos, nós avaliamos o efeito do treino de esquiva inibitória sobre a atividade sinaptossomal da NTPDase e da 5'-nucleotidase de hipocampo em ratos de ambos os sexos.

Nossos resultados confirmaram os resultados de BONAN et al. (1998) e demonstraram mais uma vez que a hidrólise de ATP, ADP e AMP diminui imediatamente após a sessão de treino (0 minutos) em sinaptossomas de hipocampo de ratos machos submetidos à tarefa de esquiva inibitória. Além disso, foi demonstrado aqui e por BONAN et al. (1998) que ocorre um decréscimo na hidrólise do ATP em sinaptossomas de

hipocampo de ratos machos adultos mortos 30 minutos após a sessão de treino. Acreditamos que este efeito inibitório observado seja consequência ou de alguma modulação alostérica da atividade de enzimas que estão envolvidas na degradação dos nucleotídeos, ativando desta maneira mecanismos que necessitem de fosforilação.

A fosforilação de proteínas é considerada um mecanismo fundamental nos processos envolvidos na indução de mudanças de longa duração da atividade sináptica, como ocorre na formação do aprendizado e memória (CHEN et al., 1996; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a). Dessa forma, se as proteínas quinases têm um importante papel na manutenção de estágios iniciais da consolidação da memória, a participação do ATP extracelular como substrato na fosforilação de ecto-proteínas (BONAN et al., 1998; CHEN et al., 1996) poderia ser necessário, pelo menos em ratos machos.

No entanto, nosso estudo demonstrou não haver mudanças nas atividades das ectonucleotidases hipocampais de ratas treinadas e mortas imediatamente ou 30 minutos após o treino de esquivas inibitórias, o contrário do observado para machos, onde houve inibição das enzimas. Com isso, pelo menos em relação às ectonucleotidases de sistema nervoso central, existe uma marcada diferença entre os sexos durante a consolidação de uma memória aversiva.

Os mecanismos devido aos quais ocorre diferença entre os sexos em modelos de aprendizado e memória ainda são incertos. Podemos pensar que o que deve estar influenciando nesta diferença entre machos e fêmeas, são os hormônios esteróides. Existem evidências claras de que o estrogênio pode afetar a cognição através de ações diretas ou indiretas no hipocampo (DOHANICH et al., 1994; FADER et al., 1998; GIBBS, 1999; PACKARD & TEATHER, 1997). Isto inclui diferenças no desenvolvimento fisiológico, ou seja, influência hormonal no desenvolvimento do hipocampo e/ou na sua forma



organizacional (LABUDA et al., 2002; WILLIANS et al., 1990; ROOF & HAVENS, 1992).

Torna-se claro que as dicotomias ocorrem devido à complexidade das ações dos hormônios esteróides. Como já comentamos anteriormente, algumas evidências indicam que esteróides neuroativos, além dos seus bem documentados efeitos genômicos, são potentes moduladores de receptores de membrana plasmática e podem interagir com diferentes sistemas efetores nas membranas neuronais (ZYLINSKA & LEGUTKO, 1998; ZYLINSKA et al., 1999). Estudos comprovam que o estrogênio pode influenciar a excitabilidade no hipocampo através da modulação de receptores como NMDA, AMPA e GABA (WONG & MOSS, 1992; FOY et al., 1999). Na fase de proestro, os níveis de estrogênio estão elevados, os receptores de NMDA mediados por  $Ca^{+2}$  estão aumentados, a LTP está aumentada e a LTD é severamente diminuída (GOOD et al., 1999). Neste estudo nós avaliamos o efeito da esquiva inibitória sobre a atividade de ectonucleotidases utilizando fêmeas no período de diestro do ciclo estral, quando as concentrações de estrogênio se encontram relativamente baixas. Tem sido demonstrado que na fase de diestro a indução de LTP é menor do que na fase de proestro (GOOD et al., 1999). Já que na fase de diestro a indução da LTP é diminuída, e este é um modelo parcial de consolidação da memória, isto poderia explicar a perda do efeito inibitório sobre a hidrólise do ATP em fêmeas. Então, nós podemos sugerir que o possível aumento observado em machos poderia não ser necessário para mecanismos bioquímicos relacionados a eventos de plasticidade sináptica em fêmeas, pelo menos na fase de diestro. Além disso, tem sido demonstrado que, durante este período do ciclo, a LTD foi claramente manifestada e que, ao contrário da LTP, a LTD necessita da ativação de proteínas fosfatases (MULKEY et al., 1993; BEAR & ABRAHAN, 1996). Assim, esses achados provêm suporte adicional para a idéia de que

existem diferenças bioquímicas entre machos e fêmeas na modulação de ectonucleotidases durante eventos de plasticidade sináptica relacionados ao aprendizado.

Estas diferenças bioquímicas entre os gêneros na tarefa de esQUIVA inibitória levam-nos a sugerir que esta distinção provavelmente existe mais por diferenças naturais e mecanismos sexo-específicos do que por diferenças em habilidades cognitivas. Esperamos que estes achados bioquímicos apresentados neste segundo capítulo possam prover uma estrutura para o desenvolvimento de hipóteses e estratégias para futuros estudos sobre a comparação de processos de memória entre machos e fêmeas.

Diante dos resultados destes dois trabalhos, esperamos que estudos futuros sejam realizados para melhorar o entendimento e tentar explicar o envolvimento das ectonucleotidases e dos hormônios esteróides na modulação de diversos processos fisiológicos e/ou patológicos, como os que ocorrem durante a menopausa ou durante os processos de formação da memória.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem observar que os hormônios esteróides e o sistema purinérgico possivelmente interagem entre si e podem modular diversos processos, fisiológicos ou não, como os que ocorrem durante uma deprivação hormonal, terapia de reposição hormonal ou durante os processos que envolvam a formação da memória.

Esta conclusão está evidenciada nos resultados que demonstraram alterações nas ectonucleotidases sinaptossomais de córtex após a indução cirúrgica de uma menopausa, ou seja, de uma deprivação hormonal e novamente da mudança na hidrólise do AMP após a reposição hormonal com o estrogênio. Além disso, a mudança de expressão da 5'-nucleotidase após a OVX mostrou haver uma possível interação entre o sistema hormonal e a atividade da enzima.

Adicionalmente, nossos resultados demonstram que as ectonucleotidases podem participar de eventos relacionados ao aprendizado e memória e que ratos machos e fêmeas respondem diferentemente à tarefa de esquivas inibitória quando medimos a hidrólise de nucleotídeos nestes animais. Portanto, nossos resultados permitem que apresentemos as seguintes conclusões:

#### CAPÍTULO 1

1. A deprivação hormonal, causada pela remoção cirúrgica dos ovários, causa um aumento na hidrólise de AMP em córtex cerebral de ratas, possivelmente elevando os níveis de

adenosina nestes animais, a qual pode ser necessária para restabelecer um equilíbrio durante o evento da falta de hormônios.

2. A análise do RT-PCR confirmou que o aumento da atividade da 5'-nucleotidase nas ratas castradas ocorreu devido a uma maior expressão da enzima nestes animais, o que está de acordo com a proposta clássica de que os hormônios esteróides atuam modulando a expressão gênica via receptores nucleares. Este resultado sugere mais uma vez que pode haver uma ligação entre os hormônios esteróides e as ectonucleotidases.
3. Testamos três hormônios *in vitro* (17 $\beta$ -estradiol, DHEAS e sulfato de pregnenolona), os quais não alteraram a hidrólise dos nucleotídeos, sugerindo que, nestas preparações, os hormônios esteróides não são capazes de atuar via mecanismos não-genômicos.
4. Observamos que o efeito da ovariectomia sobre a atividade da 5'-nucleotidase foi revertido com a terapia de reposição hormonal com estrogênio, ou seja, houve uma diminuição da hidrólise de AMP até os níveis de controle em sinaptossomas de córtex, sugerindo mais uma vez haver uma interação entre ectonucleotidases e hormônios esteróides. Acreditamos que este efeito pode estar alterando um importante mecanismo compensatório para aumentar os níveis de adenosina nas ratas castradas.
5. Os resultados apresentados neste primeiro trabalho devem ser considerados importantes, já que existem muitas controvérsias sobre a terapia de reposição hormonal

e visto que ainda pouco se sabe sobre o envolvimento entre a adenosina e os hormônios esteróides.

## CAPÍTULO 2

1. Confirmamos resultados anteriores do nosso laboratório os quais demonstram que a sessão treino da tarefa de esquiva inibitória produziu uma inibição significativa na atividade da ATP difosfoilrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo de ratos sacrificados imediatamente após o treino. Foi observada uma inibição significativa somente para a hidrólise de ATP 30 minutos após o treino. No entanto, nosso estudo demonstrou não haver mudanças nas atividades das ectonucleotidases hipocampais de ratas treinadas e mortas imediatamente ou 30 minutos após o treino de esquiva inibitória. Observamos com estes resultados que, em relação às ectonucleotidases de sistema nervoso central, existe uma marcada diferença entre os sexos durante a consolidação de uma memória aversiva.
2. Avaliamos o efeito da esquiva inibitória sobre a atividade de ectonucleotidases utilizando fêmeas no período de diestro do ciclo estral, quando as concentrações de estrogênio se encontram relativamente baixas. Como já foi demonstrado que na fase de diestro a indução de LTP é menor do que na fase de proestro e que na fase de diestro a indução da LTP é diminuída, sendo este um modelo parcial de consolidação memória, acreditamos que isto poderia explicar a perda do efeito inibitório sobre a hidrólise do ATP em fêmeas. Então, podemos sugerir que o possível aumento observado em machos poderia não ser necessário para mecanismos bioquímicos relacionados a

eventos de plasticidade sináptica em fêmeas, pelo menos durante a fase que utilizamos neste trabalho.

3. Esperamos que os achados bioquímicos deste segundo trabalho possam prover algum entendimento para o desenvolvimento de hipóteses e estratégias para estudos futuros sobre o processamento da memória em machos e fêmeas.

## 5. PERSPECTIVAS

- Avaliar as atividades de ectonucleotidases em sinaptossomas de sistema nervoso central de ratas durante deprivação e reposição hormonal, submetidas à tarefa de esquiva inibitória.
- Avaliar as atividades de ectonucleotidases em sinaptossomas de sistema nervoso central de ratas durante as diferentes fases do ciclo estral, submetidas à tarefa de esquiva inibitória.
- Avaliar as atividades de ectonucleotidases em sinaptossomas de sistema nervoso central de ratas em outras tarefas de memória, principalmente nas que envolvam memória espacial.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO, M.P.; CERUTI, S.; BARBIERI, D.; FRANCHESCHI, C.; MALORNI, W.; BIONDO, L. & CATTABENI, F. (1995). A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 908-915.
- AGRANOFF, B.W.; COTMAN, C.W. & UHLER, M.D. (1998). Learning and Memory. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, 6<sup>th</sup> Ed., Siegel GJ, Agranoff BW, Alberts RW, Fischer SK, Uhler MD (Eds.). Lippincott-Raven Publishers, pp 1027-1052.
- ALKAYED, N.J.; HARUKUNI, I.; KIMES, A.S.; LONDON, E.D.; TRAYSTMAN, R.J. & HURN, P.D. (1998). Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* 31: 155-160.
- ALONSO-SOLEIS R.; ABREU, P.; LEOPEZ-COVIELLA I.; HERNANDEZ, G. & FAJARDO, N. (1996). Gonadal steroid modulation of neuroendocrine transduction: a transynaptic view. *Cell. Mol. Neurobiol.* 3: 357-382.
- AU LOIS, N.C.; NIQUET, J.; BEN-ARI, Y. & REPRESA, A. (1997). Cellular plasticity. In: *Epilepsy: a comprehensive textbook*, Jr. Engel J, Pedley TA (Eds.). Lippincott-Raven Publishers, pp. 387-396.
- BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T.; BARCELLOS, C.K.; DIAS, R.D. & SARKIS, J.J.F. (1991). Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 209-219.



- BATTASTINI, A.M.O.; OLIVEIRA, E.M.; MOREIRA, C.M.; BONAN, C.D.; SARKIS, J.J.F. & DIAS, R.D. (1995). Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from rat brain plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37, 209-219.
- BERNE, R.M.; WINN, H.R. & RUBIO, R. (1981). The local regulation of cerebral blood flow. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 24: 243-260.
- EDELMAN, G.M. & MOUNTCASTLE, V.B. (1978). *The Mindfull Brain*, MIT press.
- BARRACLOUGH, D.J.; INGRAM, C.D. & BROWN, M.W. (1999). Chronic treatment with oestradiol does not alter in vitro LTP in subfield CA1 of the female rat hippocampus. *Neuropharmacol.* 38: 65-71.
- BEAR, M.F. & ABRAHAN, W.C. (1996). Long-term depression in hippocampus. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 437-462.
- BEATO, M.; HERRLICH, P. & SCHUTZ, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 83 (6): 851-857.
- BI, R.; BROUTMAN, G.; FOY, M.R.; THOMPSON, R.F. & BAUDRY, M. (2000). The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3602-3607.
- BI, R.; FOY, M.R.; VOUMBA, R.M.; THOMPSON, R.F. & BAUDRY, M. (2001). Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13391-13395.
- BLISS, T.P.V. & LOMO, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 331-356.

- BLISS, T.P.V. & COLLINGRIDGE, G.L (1993). A synaptic model of memory: long-term-potential in the hippocampus. *Nature (London)* 361: 31-39.
- BOHUS, B. (1994). Humoral modulation of learning and memory process: physiological significance of brain and peripheral mechanisms. In: *The memory Systems of the Brain*. Delacour J (Ed). Singapore: World Scientific, pp. 337-364.
- BONAN, C.D.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J.; BATTASTINI, A.M.O.; IZQUIERDO, I. & SARKIS, J.J.F. (1998). Effects of suramin on hippocampal apyrase activity and inhibitory avoidance learning of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63: 153-158.
- BONAN, C.D.; ROESLER, R.; PEREIRA, G.S.; BATTASTINI, A.M.O.; IZQUIERDO, I. & SARKIS, J.J.F. (2000). Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. *Brain Res.* 854: 253-256.
- BONAN, C.D.; WALZ, R.; PEREIRA, G.S., WORM, P.V.; BATTASTINI, A.M., CAVALHEIRO, E.A.; IZQUIERDO, I. & SARKIS, J.J.F. (2000). Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 39: 229-238.
- BONAN, C.D.; SCHETINGER, M.R.C.; BATTASTINI, A.M.O. & SARKIS, J.J.F. (2001). Ectonucleotidases and synaptic plasticity: implications in physiological and pathological conditions. *Drug Develop. Res.* 52: 57-65.
- BRAUN, N.; ZHU, Y.; KRIEGLSTEIN, J.; CULMSEE, C. & ZIMMERMANN, H. (1998). Upregulation of the enzymes chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.* 18: 4891-4900.
- BRAUNEWELL, K.H. & MANAHAN-VAUGHANS (2001). Long-term depression: a cellular basis for learning? *Rev. Neurosci.* 12: 121-140.

- BROWN, T.J.; MACLUSKY, N.J.; SHANABROUGH, M. & NAFTOLIN, F. (1990). Comparison of age- and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progesterin receptor induction in the rat brain. *Endocrinol.* 126: 2965-2972.
- BRUNO, A.N.; OSES, J.P.; BONAN, C.D.; WALZ, R.; BATTASTINI, A.M.O. & SARKIS, J.J.F. (2002). Increase of nucleotide activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol. *Neurosci. Res.* 43: 283-288.
- CAHILL, L. & MCGAUGH, J.L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosci.* 21: 294-299.
- CARIO-TOUMANIANTZ, C.; LOIRAND, G.; FERRIER, L. & PACAUD, P. (1998). Non-genomic inhibition of human P<sub>2X7</sub> purinoceptor by 17  $\beta$ -oestradiol. *J. Physiol.* 508: 659-666.
- CHEN, W.; WIERASKO, A.; HOGAN, M.V.; YANG, H.A.; KORNECKI, E. & ERLICH, Y.H. (1996). Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Proc. Atl. Acad. Sci. USA* 93: 8688-8693.
- COMMUNI, D.; GONZALEZ, N.S. & DETHEUX, M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to Gi. *J. Biol. Chem.* 276: 41479-41485.
- CORDOBA-MONTOYA, D.A. & CARRER, H.F. (1997). Oestrogen facilitates induction of long-term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res.* 778, 430-438.
- CUNHA, R.A. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38: 107-125.
- CUNHA, R.A.; VIZI, E.S., SEBASTIÃO, A.M. & RIBEIRO, J.A. (1996). Preferential

- release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 67: 2180-2187.
- CUNHA, R.A. & RIBEIRO, J.A. (2000). Adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. *Neurosci. Lett.* 289: 127-130.
- CZAJKOWSKI, R. & BARANSKA, J. (2002). Cross-talk between the ATP and ADP nucleotide receptor signalling pathway in glioma C6 cells. *Acta Biochem. Polonica* 49: 877-889.
- DECKERT, J. & JORGENSEN, M.B. (1997). Evidence for pre- and postsynaptic localization of adenosine A1 receptor in the CA1 region of rat hippocampus: a quantitative autoradiograph study. *Brain Res.* 446:161-164.
- DE MENDONÇA, A. & RIBEIRO, J.A. (1994a) Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.* 60: 245-251.
- DE MENDONÇA, A. & RIBEIRO, J.A. (1994b). Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neurosci.* 62: 385-390.
- DE MENDONÇA, A.; ALMEIDA, T. & BASHIR, Z.I. (1997). Endogenous adenosine attenuates long-term depression and depotentiation in the CA1 region of the rat hippocampus. *Neuropharmacol.* 36: 161-167.
- DESMOND, N. L.; ZHANG, D.X. & LEVY, W.B. (2000). Estradiol enhances the induction of homosynaptic long-term depression in the CA1 region of the adult ovariectomized rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 73:180-187.
- DHANDAPANI, K.M. & BRANN, D.W. (2002a). Estrogen-Astrocyte interactions: implications for neuroprotection. *BMC Neurosci.* 7: 6.

- DHANDAPANI, K.M. & BRANN, D.W. (2002b). Protective effects of estrogens and receptor modulators in the brain. *Biol. Reprod.* 67: 1379-1385
- DIAZ-VELIZ, G.; URRESTA, F.; DUSSAUBAT, N. & MORA, S. (1991). Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. *Physiol. Behav.* 50: 61-65.
- DI ORIO, P.; BALLERINI, P.; CACIAGLI, F. & CICCARELLI, R. (1998). Purinoceptor mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacol. Res.* 37: 169-178.
- DOHANICH, G.P. (2002). Gonadal steroids, learning and memory. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RI, eds. Hormones, brain and behavior. San Diego: Academic Press; pp 265-327.
- DOHANICH, G.P.; FADER, A.J. & JAVORSKY, D.J. (1994). Estrogen and estrogen-progesterone treatments counteract the effect of scopolamine on reinforced T-maze alternation in female rats. *Behav. Neurosci.* 108: 988-992.
- DRAGUNOW, M. & FAULL, R.L. (1988). Neuroprotective effects of adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 193-194.
- DUBAL, D.B.; KASHON, M.L.; PETTIGREW, L.C.; REN, J.M.; FINKLESTEIN, S.P.; RAU, S.W. & WISE, P.M. (1998). Estradiol protects against ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 1253-1258.
- DUBAL, D.B. & WISE, P.M. (2001). Neuroprotective effects of estradiol in middle-age female rats. *Endocrinol.* 142: 43-48.

- DUNWIDDIE, T.V. & HOFFER, B.J. (1980). Adenine nucleotides and synaptic transmission in vitro rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 69: 59-68.
- DUNWIDDIE, T.V. & MASINO, S.A. (2001). The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 31-55.
- EDWARDS, F. A.; GIBB, A.J. & COLQUHOUN, D. (1992). ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359: 144-147.
- EHRlich, Y.H. & KORNECKI, E. (1999) Ecto-protein kinases as mediators for the action of secreted ATP in the brain. *Prog. Brain Res.* 120: 411-426.
- EVANS, R.J.; DERKACH, V. & SURPRENANT, A. (1992). ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357: 503-505.
- FADER, A.J.; HENDRICSON, A.W. & DOHANICH, G.P. (1998). Estrogen improves performance of reinforced T-maze alternation and prevents the amnesic effects of scopolamine administered systemically or intrahippocampally. *Neurobiol. Learn. Mem.* 69: 225-240.
- FIEDLER, J.L., POLLARD, H.B. & ROJAS, E. (1992). Quantitative analysis of depolarisation-induced ATP release from mouse brain synaptosomes: external calcium dependent and independent process. *J. Memb. Biol.* 127(1): 21-33.
- FOY, M.R.; XU, J.; XIE, X.; BRINTON, R.D.; THOMPSON, R.F. & BERGER, T.W. (1999). 17  $\beta$ -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J. Neurophysiol.* 81: 925-929.
- FREEMAN, M. E. (1988). The ovarian cycle of the rat. In: E. Knobil & J. Neil (eds.), *Physiology of reproduction*. Raven Press Ltd., New York, pp. 1893-1928.

- FRYE, C.A. (1995). Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiol. Behav.* 57: 5-14.
- FRYE, C.A. & RHODES, M.E. (2002). Enhancing effects of estrogen on inhibitory avoidance performance may be in part independent of intracellular estrogen receptors in the hippocampus. *Brain Res.* 956: 285-293.
- FUGGER, H.N.; FOSTER, T.C.; GUSTAFSSON, J-A. & RISSMAN, E.F. (2000). Novel effects of estradiol and estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  on cognitive function. *Brain Res.* 883: 258-264.
- FUJII, S.; KATO, H. & KURODA, Y. (1999). Extracellular adenosine 5'-triphosphate plus activation of glutamatergic receptors induces long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 276: 21-24.
- FUKADA, K.; YAO, H.; IBAYASHI, S.; NAKAHURA, T.; UCHIMURA, H.; FUJISHIMA, M. & HALL, E.D. (2000). Ovariectomy exacerbates and estrogen replacement attenuates phototrombotic focal ischemic brain injury in rats. *Stroke* 29: 159-166.
- GAMARO, G.D.; PREDIGER, M.E., LOPES, J.B. & DALMAZ, C. (2003). Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and serum leptin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76:327-333.
- GARCIA-SEGURA, L.M.; AZCOITIA, I. & DONCARLOS, L.L. (2000). Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.* 63, 29-60.
- GENAZZANI, A.R.; PETRAGLIA F. & PURDY R.H. (1996). The brain: source and target for sex steroid hormones. *The Parthenon Publishing Group.* p. 251-253.
- GENAZZANI, A.R.; MONTELEONE, P. & GAMBACCIANI, M. (2002). Hormonal

- influence on the central nervous system. *Maturitas* 43 (1): 11-17.
- GIBBS, R.B. (1999). Estrogen replacement enhances acquisition of spatial memory task and reduces deficits associated with hippocampal muscarinic receptor inhibition. *Horm. Behav.* 29: 106-125.
- GIBBS, R.B. (2000a). Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. *Neurosci.* 101: 931-938.
- GIBBS, R.B. (2000b). Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats. *Neurobiol. Aging* 21: 107-116.
- GIBBS, R.B.; BURKE, A.M. & JOHNSON, D.A. (1998). Estrogen replacement attenuates effects of scopolamine and lorazepam on memory acquisition and retention. *Horm. Behav.* 34: 112-125.
- GOLD, P.E. (1991). An integrate memory regulation system: From blood to brain. In: *Peripheral signalling of the brain*. Fredrickson RCA, McGaugh JL & Felten DL (Eds.). Toronto: Hogrefe & Huber, pp. 391-419.
- GOLD, P.E. (1995). Modulation of emotional and nonemotional memories: Same pharmacological systems, different neuroanatomical systems. In: *Brain and memory: Modulation and mediation of neural plasticity*. McGaugh JL, Weinberg N & Lynch G (Eds.). New York: Oxford University Press, pp. 41-74.
- GOLD, P.E. & MCCARTY, R.C. (1995). Stress regulation of memory process. Role of peripheral catecholamines and glucose. In: *Neurobiological and clinical consequences of stress*. Friedman MJ, Charney DS, Deutch AY (Eds.). Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 151-162.



- GOOD, M.; DAY, M. & MUIR, J.L. (2000). Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur. J. Neurosci.* 11: 4476-4480.
- GRIGORYAN, G.; HODGES, H.; MITCHELL, S.; SINDEN, J.D. & GRAY, J.R. (1996). 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens accentuate memory deficits in animals with lesions to the forebrain cholinergic projection system: Effects of nicotine administration on learning and memory of the water maze. *Neurobiol. Learn. Mem.* 65: 135-153.
- HANDA, M. & GUIDOTTI, G. (1996). Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys. Res. Commun.* 218: 916-923.
- HEINE, P.; BRAUN, N. & 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.
- HEYMANN, D. REDDINGTON, M. & KREUTZBERG, G.W. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43: 971-978, 1984.
- HOAR, W. & HICKMAN, C. P. (1975). Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W. Hoar & C. P. Hickman (eds.), *General and comparative physiology*. 2. ed. Prentice-Hall, New Jersey, pp. 260-265.
- HULLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B. & VITTINGHOFF, E. (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 280: 605-613.
- IZQUIERDO, I. (1989). Different forms of post-training memory processing. *Beh. Neural Biol.* 51: 171-202.

- IZQUIERDO, I. (1994). Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *FASEB J.* 8:1139-1145.
- IZQUIERDO, I. & MCGAUGH, J.L. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Beh. Pharmacol.* 11: 517-534.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. (1995). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63: 19-32.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. (1997a). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68: 285-316.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. (1997b). The biochemistry of memory and its regulation by modulatory processes. *Psychobiology* 25: 1-9.
- KACZMAREK, E.; KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; SIEGEL, J.B.; ANRATHER, J.; BEAUDOIN, A.R.; BACH, F.H. & ROBSON, S.C. (1996). Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 271: 33116-33122.
- KEGEL, B.; BRAUN, N.; HEINE, P.; MALISZEWSKI, C.R. & ZIMMERMANN, H. (1997). An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacol.* 36: 1189-1200.
- KIRLEY, T.L. (1997). Complementary DNA cloning and sequence of the chicken muscle ecto-ATPase – homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J. Biol. Chem.* 272: 1076-1081.

- LA BUDA, C.J.; MELLGREN, R.L. & HALE, R.L. (2002). Sex differences in the acquisition of aradial maze task in the CD-1 mouse. *Physiol. Behav.* 76: 213-217.
- LEVIN, E.R. (2002). Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 67: 471-475.
- LINDEN, D.J. (1994). Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 12: 457-472.
- LIU, P-S.; HSIEH, H-L. & LIN, C-M. (2001). Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) supresses P2X purinoceptor-coupled responses in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 39: 193-198.
- LONG, J. A. & EVANS, H. M. (1922). The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univers. Calif.* 6: 1-148.
- LUINE, V.N.; RICHARDS, S.T.; WU, V.Y. & BECK, K.D. (1998). Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm. Behav.* 34: 149-162.
- MANDL, A. M. (1951). The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *J. Exp. Biol.* 28: 576-584.
- MATEO, J.; HARDEN, T.K. & BOYER, J.L (1999). Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* 128: 396-402.
- MARCONDES, F. K.; MIGUEL, K.; MELO, L. L. & SPADARI-BRATFISCH, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.*, 74(4-5): 435-440
- MAREN, S. & BAUDRY, M. (1995). Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationship to learning and memory. *Neurobiol.*

*Learn. Mem.* 63: 1-18.

MARKOWSKA, A.L. & SAVONENKO, A.V. (2002). Effectiveness of estrogen replacement in restoration of cognitive function after long-term estrogen withdrawal in aging rats. *J. Neurosci.* 22:10985-10995.

McEWEN, B.S & WOOLEY, C.S. (1994). Estradiol and progesterone regulate neuronal structure and synaptic connectivity in adult as well as developing brain. *Exp. Geront.* 29: 431-436.

McEWEN, B.S.; ALVES, S.E.; BULLOCH, K. & WEILAND, N.G. (1997). Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology* 48: S8-S15.

McGAUGH, J.L. (1989). Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annual Review of Neuroscience* 12: 255-287.

McGAUGH, J.L. (1996). Time-dependent process in memory storage. *Science* 153: 1351-1358.

McGAUGH, J.L.; CAHILL, L.; PARENT, M.B.; MESCHES, M.H.; COLEMAN-MESCHES, K. & SALINA, J.A. (1995). Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage. In: *Plasticity in the central nervous system: Learning and Memory*. McGaugh JL, Bermúdez-Rattoni F & Prado-Alcalá RA (Eds.). Mahwah, NJ: Erlbaum, pp. 17-39.

MILLER, M.M.; HYDER, S.M.; ASSAYAG, R.; PANARELLA, S.R.; TOUSIGNANT, P. & FRANKLIN K.B. (1999). Estrogen modulates spontaneous alternation and the cholinergic phenotype in the basal forebrain. *Neuroscience* 91: 1143-1153.

MOREAU, J-L & HUBER, G. (1999). Central adenosine A2A receptors: an overview. *Brain Res. Rev.* 31: 65-82.

- MULKEY, R.M.; HERRON, C.E. & MALENKA, R.C. (1993). Essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 261: 1051-1055.
- MULNARD, R.A.; COTMAN, C.W.; KAWAS, C.; VAN DYCK, C.H.; SANO, M.; DOODY, R.; KOSS, E.; PFEIFFER, E.; JIN, S.; GARNST, A.; GRUNDMAN, M.; THOMAS, R. & THAL, L.J. (2001). Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer's disease. *JAMA* 283: 1007-1015.
- MURPHY, D.D. & SEGAL, M. (1996). Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J. Neurosci.* 16: 4059-4068.
- MURPHY, D.D.; COLE, N.B.; GREENBERGER, V. & SEGAL, M. (1998). Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18: 2550-2559.
- NAGY, A. SHUSTER, T.A.; DELGADO-ESCUETA, S.V. (1986). Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymatic characterization. *J. Neurochem.* 47: 976-986.
- NEDELJKOVIC, N.; DJORDEVIC, V.; HORVAT, A.; NIKEZIC, G. & KANAZIR, D.T. (2000). Effect of steroid hormone deprivation on the expression of ecto-ATPase in distinct brain regions of female rats. *Physiol. Res.* 49: 419-426.
- NORMILE, H.J. & BARRACO, R.A. (1991). N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A<sub>1</sub> receptors. *Brain Res. Bull.* 27(1): 101-104.
- PACKARD, M.G. & TEATHER, L.A. (1997). Intra-hippocampal estradiol infusion enhances memory in ovariectomized rats. *Neuroreport* 8: 3009-3013.
- PANAY, N.; SANDS, R.H. & STUDD, J.W.W. (1996). Oestrogen and behavior. In: Genazzani, A.R.; Petraglia F.; Purdy R.H., editors. The brain: source and target for sex

steroid hormones. *The Parthenon Publishing Group*. p. 257-256.

PARKER, M.G. & WHITE, R. (1996). Nuclear receptors spring into action. *Nat. Struct. Biol.* 3: 113-115.

PEREIRA, G.S.; MELLO E SOUZA, T.; BATTASTINI, A.M.O.; IZQUIERDO, I.; SAKIS, J.J.F. & BONAN, C.D. (2001). Effects of inhibitory avoidance training and/or isolated foot-shock on ectonucleotidase activities in synaptosomes of the anterior and posterior cingulate cortex and the medial precentral area of adult rats. *Behav. Brain Res.*

PEREIRA, G.S.; MELLO E SOUZA, T.; VINADE, E.R.; CHOI, H.; RODRIGUES, C.; BATTASTINI, A.M.O.; IZQUIERDO, I.; SAKIS, J.J.F. & BONAN, C.D. (2002). Blockade of adenosine A<sub>1</sub> receptor in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 437: 151-154.

PHILLIS, J.W. & WU, P.H. (1981). The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16: 187-239.

QUILLFELDT, J.A. (1994). O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas. Tese de Doutorado do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

RATHBONE, M.P.; MIDDLEMIS, P.L.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, C.; HERMAN, M.A.R.; REED, J.K.; CICCARELLI, R.; DI ORIO, P. & CACIAGLI, F. (1999). Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59: 663-690.

RALEVIC, V. & BURNSTOCK, B. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rew.* 50: 413-492.

RIBEIRO, J.A. (1995). Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central

- nervous system. *Pharmacol. Toxicol.* 77: 299-305.
- RIBEIRO, J.A. (1999). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. *Eur. J. Pharmacol.* 375: 101-113.
- RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M. & DE MENDONÇA, A. (2003). Adenosine receptors in the central nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 68: 377-392.
- RICHARDSON, P.J. & BROWN, S.J. (1987). ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J. Neurochem.* 48 (2): 622-630.
- ROOF, R.L. & HALL, E.D. (2000). Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J. Neurotrauma* 17: 367-388.
- ROOF, R.L. & HAVENS, M.D. (1992). Testosterone improves performance and induces development of male hippocampus in females. *Brain Res.* 572: 310-313.
- SARKIS, J.J.F. & SALTÓ, C. (1991). Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26, 871-876.
- SATTIN, A. & RALL, T.W. (1970). The effect of adenosine and adenine nucleotides on cyclic adenosine 3'5'-phosphate content guinea pig cerebral cortex slices. *Mol. Pharmacol.* 6: 13-23.
- SCHETINGER, M.R.; BARCELLOS, C.K.; BARLEM, A.; ZWETSCH, G.; BERTUOL, C.; ARTENI, N.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. & NETTO, C.A. (1998). Activity of synaptosomal ATP diphosphohydrolase from hippocampus of rats tolerant to forebrain ischemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 1123-1128.
- SCHOEN, S.W. & KREUTZBERG, G.W. (1994). Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult dentate gyrus. *Exp. Neurol.* 127: 106-

118.

SCHWARTZ, N. B. (1964). Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. *Am. J. Physiol.* 107: 1251-1259.

SIMPKINS, J.W.; RAJAKUMAR, G.; ZHANG, Y.Q.; SIMPKINS, C.E.; GREENWALD, D.; YU, C.J.; BODOR, N. & DAY, A.L. (1997). Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rats. *J. Neurosurg.* 87: 724-730.

SINGH, M.; MEYER, E.M.; MILLARD, W. J. & SIMPKINS, J.W. (1994). Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 644: 305-312.

SMITH, T.M. & KIRLEY, T.L. (1998). Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPase and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys. Acta* 1386: 65-78.

SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D. & DAVID, A. A. (1999). Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anat. Rec.* 254: 116-126.

STEWART, J. & KOLB, B. (1994). Dendritic branching in cortical pyramidal cells in response to ovariectomy in adult female rats: suppression by neonatal exposure to testosterone. *Brain Res.* 654:149-154.

TODOROV, L.D.; MIHAAYLOVA-TODOROVA, S.; WESTFALL, T.D.; SNEDDON, P.; KENNEDY, C.; BJUR, R.A. & WESTFALL, T.D. (1997). Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387: 76-79.



- TORRES, I.L.S.; BUFFON, A.; SILVEIRA, P.P.; DUARTE, M.Z.D.; BASSANI, M.G.; OLIVEIRA, S.S.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F.; DALMAZ, C. & FERREIRA, M.B.C. (2002). Effect of chronic and acute stress on ectonucleotidases activities in spinal cord. *Physiol. Behav.* 75:1-5.
- VALVERDE, M.A. & PARKER, M.G. (2002). Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *Trends Biochem. Sci.* 27 (4): 172-173.
- VASCONCELOS, E.G.; FERREIRA, S.T.; DE CARVALHO, T.M.U.; DE SOUZA, W.; KETLUN, A.M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M.A. & VERJOVSKI-ALMEIDA, S. (1996). Partial modification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* – immunological cross-reactives with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *J. Biol. Chem.* 271: 22139-22145.
- VISCOLI, C.M.; BRASS, L.M.; KERNAN, W.N.; SARREL, P.M.; SUISSA, S. & HORWITZ, R.I. (2001). A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 345: 1243-1249.
- WANG, T.F. & GUIDOTTI, G. (1996). CD39 is an ecto-(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)-apyrase. *J. Biol. Chem.* 271: 9898-9901.
- WARREN, S.G. & JURASKA, J.M. (1995). Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav. Neurosci.* 111: 259-266.
- WIERASZKO, A. & EHRLICH, Y.H. (1994). On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Neurochem.* 63: 356-359.
- WIERASZKO, A. & SEYFRIED, T.N. (1989). ATP-induced synaptic potentiation in hippocampal slices. *Brain Res.* 491: 356-359.

- WILLIAMS, C.L.; BARNETT, A.M. & MECK, W.H. (1990). Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. *Behav. Neurosci.* 104: 84-97.
- WISE, P.M. (2002). Estrogens and neuroprotection. *Trends in Endocrinol. & Metab.* 13 (6): 229-230.
- WISE, P.M. (2003). Estrogens: protective or risk factors in brain function? *Prog. Neurobiol.* 69: 181-191.
- WONG, M. & MOSS, R.L. (1992). Long-term and short-term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties hippocampal CA1 neurons. *J. Neurosci.* 12: 3217-3225.
- WOOLEY, C. S. (1998). Oestrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm. Behav.* 34: 140-148.
- WOOLEY, C. S.; WENZEL, H.J. & SCHWARTZKROIN, P.A. (1996). Estradiol increases the frequency of multiple synapse boutons in the hippocampal CA1 region of the adult female rat. *J. Comp. Neurol.* 373: 108-117.
- WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 288: 321-333.
- YAFFE, K.; LUI, L.Y.; GRADY, D.; CAULEY, J.; KRAMER, J. & CUMMINGS, S.R. (2000). Cognitive decline in woman in relation to non-protein-bound oestradiol concentrations. *Lancet* 356: 708-712.
- YAFFE, K.; LUI, L.Y.; ZMUDA, J. & CAULEY, J. (2002). Sex hormones and cognitive function in older man. *J. Am. Geriatr. Soc.* 50: 707-712.

- YOUNG, W. C.; BOLING, J. L. & BLANDAU, R. (1941). The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *Anat. Rec.* 80: 37-45.
- ZHANG, Y.Q.; SHI, J.; RAJAKUMAR, G.; DAY, A.L. & SIMPKINS, J.W. (1998). Effects of gender and estradiol treatment on focal brain ischemia. *Brain Res.* 784: 321-324.
- ZIMMERMANN, H. (1994). Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17: 420-426.
- ZIMMERMANN, H. (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49: 589-618.
- ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B. & HEINE, P. (1998). New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem. Int.* 32: 421-425.
- ZIMMERMANN, H. & BRAUN, N. (1999). Ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the central nervous system. *Prog. Brain Res.* 120: 371-385.
- ZIMMERMANN, H. (2001). Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature. *Drug Develop. Res.* 52: 44-56.
- ZORNETZER, S.F. (1978). Neurotransmitter modulation and memory: A new pharmacological phenology? In: *Psychopharmacology: A generation of progress*. Lipton MA, DiMascio A & Killam KF (Eds.). New York: Raven, pp. 637-649.
- ZYLINSKA, L.; REBAS, E.; GROMADZINSKA, E. & LACHOWICZ, L. (1995). Neuroactive steroids modulate *in vivo* the  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ -ATPase activity in rat cortical and cerebellar synaptosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 176-183.

ZYLINSKA, L. & LEGUTKO, B. (1998). Neuroactive steroids modulate *in vitro* the  $Mg^{2+}$ -dependent  $Ca^{2+}$ -ATPase activity in cultured rat neurons. *Gen. Pharmacol.* 30 (4): 533-536.

ZYLINSKA, L.; GROMADZINSKA, E. & LACHOWICZ, L. (1999). Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical  $Ca^{2+}$ -ATPase activity. *Bioch. Bioph. Acta.* 1437: 257-264.