

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**ECTONUCLEOTIDASES E PLASTICIDADE SINÁPTICA:**

**PAPEL DAS ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DE**

**NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES NA MEMÓRIA E**

**EM MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIA**

**CARLA DENISE BONAN**

**Orientador:**

**PROF. DR. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS**

**Co-orientador:**

**PROFA. DRA. ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI**

**Tese 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 grau de Doutor em  
Bioquímica.**

**Porto Alegre**

**2000**

**Ao Ricardo e à minha família,**

**minhas fontes de saber emocional.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Sarkis, pela orientação clara e objetiva, pela amizade e exemplo de dedicação profissional e pela confiança depositada na minha capacidade e nas minhas decisões.

À Ana, pela orientação, pelo apoio constante e fundamental em momentos importantes deste trabalho e pelo muito que aprendi ao seu lado durante este período.

Ao Prof. Izquierdo, por possibilitar a realização deste trabalho junto ao seu laboratório. A todo o pessoal do Centro de Memória pela hospitalidade e espírito cooperativo, em especial, ao Rafael, Roger, João e aos bolsistas Olavo, Paulo e Izabel, por terem acreditado em uma idéia e colaborado de forma decisiva para a realização deste trabalho.

Ao Renato, pelo conhecimento, pela amizade, pelo grande incentivo e confiança em mim depositada em momentos importantes da minha vida profissional.

A todos os colegas do grupo de pesquisa dos laboratórios 22 e 24, em especial à Márcia, Egna, Sharon, Andréia, Simone e a todos os bolsistas de iniciação científica do laboratório que me acompanharam neste período, pela ajuda, amizade, companheirismo e pelos momentos de alegria e descontração vividos no nosso dia-a-dia.

A Grace, pela amizade, companheirismo e por sua preciosa ajuda na realização deste trabalho.

A Rosinha e Silvana pela amizade e força no início deste trabalho.

Aos colegas professores, Renato, Graça, Berenice, Maurício, Cyntia e bolsistas José Alfredo, Laura, Fernanda e Rosane do Laboratório de Pesquisa Bioquímica da PUCRS, pela convivência harmoniosa, pelo constante apoio e incentivo e pelas ausências compreendidas neste último e árduo semestre.

Aos colegas professores do curso de Farmácia da ULBRA pelo apoio e incentivo.

A todas as pessoas do Departamento de Bioquímica da UFRGS, que de alguma forma colaboraram para a execução deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPERGS, FINEP, CNPq e PRONEX pelo auxílio à pesquisa.

A todas as pessoas do meu convívio particular que se empenharam em tornar as relações humanas mais verdadeiras e positivas.

A Deus, por ter me dado forças e iluminado o meu caminho nos momentos mais difíceis.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABELAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
I.1. PLASTICIDADE SINÁPTICA.....	01
I.2. MEMÓRIA E POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO.....	02
I.2.1. ESQUIVA INIBITÓRIA.....	05
I.3. EPILEPSIA.....	07
I.3.1. MODELO DA PILOCARPINA.....	09
I.3.2. MODELO DO ÁCIDO CAÍNICO.....	11
I.3.3. ABRASAMENTO (KINDLING).....	12
I.4. ATP E TRANSMISSÃO PURINÉRGICA.....	14
I.5. ADENOSINA E SEUS RECEPTORES.....	19
I.6. ATP DIFOSFOIDROLASE (APIRASE, EC 3.6.1.5).....	25
I.7. 5'-NUCLEOTIDASE (EC 3.1.3.5).....	31
I.8. OBJETIVOS.....	35
<b>II. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>37</b>
<b>II.1. CAPÍTULO 1 - <u>BONAN, C.D.</u>; DIAS, M.M.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Inhibitory Avoidance Learning inhibits ectonucleotidases activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. <b>Neurochemical Research</b> 23 (7), 979-984, 1998.....</b>	<b>37</b>

<b>II.2. CAPÍTULO 2 - <u>BONAN, C.D.</u>; ROESLER, R.; PEREIRA, G.S.; BATTASTINI, A.M.O.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F.</b> Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. <b>Brain Research</b> (in press).....	44
<b>II.3. CAPÍTULO 3 - <u>BONAN, C.D.</u>; ROESLER, R.; QUEVEDO, J.; BATTASTINI A.M.O.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F.</b> Effects of suramin on hippocampal apyrase activity and inhibitory avoidance learning of rats. <b>Pharmacology, Biochemistry and Behavior</b> , 63(1), 153-158, 1999.....	49
<b>II.4. CAPÍTULO 4 -<u>BONAN, C.D.</u>; WALZ, R.; PEREIRA, G.S.; WORM, P.V.; BATTASTINI, A.M.O.; CAVALHEIRO, E.A.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F.</b> Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. Sumetido ao <b>Epilepsy Research</b> .....	56
<b>II.5. CAPÍTULO 5 - <u>BONAN, C.D.</u>; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, I. C.; WALZ, R.; BATTASTINI, A. M.O.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J. J.F.</b> Altered ATP Hydrolysis Induced By Pentylene-tetrazol Kindling In Rat Brain Synaptosomes. Submetido ao <b>Neurochemical Research</b> .....	80
<b>III. DISCUSSÃO</b> .....	97
<b>IV. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	115
<b>V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	119
<b>VI. ANEXOS</b> .....	137

## RESUMO

Várias evidências sugerem o papel do ATP extracelular na plasticidade sináptica. O ATP pode induzir potenciação de longa duração (LTP) e sua participação na fosforilação de proteínas extracelulares é considerada um sinal para mudanças de longa-duração na atividade sináptica. O ATP evoca respostas através de dois subtipos de receptores P2, P2X e P2Y. As ações sinalizadoras induzidas pelo ATP extracelular podem estar correlacionadas à atividade de um grupo de ectoenzimas, as ectonucleotidases, que promovem a conversão enzimática de ATP, controlando os níveis do nucleotídeo na fenda sináptica. O neurotransmissor ATP pode ser hidrolisado até adenosina, um neuromodulador importante, pela ação conjugada deste grupo de ectonucleotidases, do qual fazem parte uma ecto-ATPase (EC 3.6.1.3), uma ATP difosfohidrolase (apirase, EC 3.6.1.5) e uma 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5). O controle dos níveis de ATP e adenosina promovido pelas ectonucleotidases pode ser importante para a modulação dos mecanismos relacionados à plasticidade sináptica. Nossos resultados demonstraram que as atividades ectonucleotidásicas são moduladas em situações fisiológicas e patológicas capazes de induzir plasticidade sináptica, tais como memória e epilepsia. A ATP difosfohidrolase e a 5'-nucleotidase de sinaptossomas de hipocampo apresentam-se inibidas imediatamente após sessão de treino na tarefa de esquivas inibitória em ratos. Além disso, uma diminuição significativa na hidrólise do ATP foi também observada 30 minutos após a sessão de treino na tarefa. As atividades enzimáticas estudadas não demonstraram diferenças significativas após a sessão de teste na tarefa de esquivas inibitória. Nossos resultados indicaram que a modulação das atividades ectonucleotidásicas pode participar nos mecanismos de aquisição da memória, mas não tem efeito na evocação. Além disso, é possível sugerir a participação das ectonucleotidases na fase da consolidação da memória, desde que uma inibição da ATP difosfohidrolase foi observada 180 minutos pós-treino. Determinou-se também estas atividades em outras estruturas cerebrais envolvidas na formação da memória, como córtex entorrinal e córtex parietal. Nossos resultados mostraram uma inibição da ATP difosfohidrolase em córtex entorrinal de ratos imediatamente, mas não 180 e 360 min após a sessão de treino. As alterações observadas em hipocampo e córtex entorrinal poderiam representar um mecanismo bioquímico importante relacionado à aquisição da memória. Ectonucleotidases de córtex parietal não demonstraram mudanças significativas, sugerindo que estas enzimas não são relevantes para a formação da memória de esquivas inibitórias em córtex parietal. Para investigar o envolvimento do sistema purinérgico nesta condição, nós analisamos o efeito da suramina na retenção da tarefa de esquivas inibitórias. Além de ser um antagonista de receptores de P2 e NMDA, nossos resultados demonstraram que a suramina é um inibidor não-competitivo da apirase, com valores de  $K_i$  na faixa de micromolar. A infusão intra-hipocampal de suramina imediatamente pós-treino reduziu a retenção da tarefa em um efeito dose-dependente. O efeito amnésico é provavelmente devido à sua ação antagonista em receptores P2 e NMDA. Considerando que a adenosina tem potentes efeitos anti-convulsivantes, nós determinamos as atividades ectonucleotidásicas após a indução de epilepsia por vários modelos animais, como os modelos da pilocarpina, ácido cáinico e kindling. As atividades da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase de sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral de ratos aumentaram significativamente 48-52 horas, 7-9 dias e 45-50 dias após a indução do estado epiléptico (EE) por pilocarpina ou pelo modelo do ácido cáinico. Porém, somente a atividade da 5'-nucleotidase permaneceu elevada 100-110 dias após o tratamento com ácido cáinico. A regulação da via das ectonucleotidases pode desempenhar um papel modulatório durante a evolução das mudanças comportamentais e patofisiológicas induzidas pelo EE. Não foram observadas mudanças nas atividades ectonucleotidásicas em diferentes períodos de tempo após uma única injeção convulsivante de pentilenotetrazol (PTZ). Porém, ratos com maior resistência ao kindling induzido por PTZ apresentaram um aumento na hidrólise do ATP em sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral. Estas mudanças podem representar um mecanismo importante na modulação da atividade epiléptica crônica. A demonstração de que as ectonucleotidases apresentaram as atividades diferentemente alteradas após a aquisição de uma tarefa de memória ou após a indução de epilepsia por diferentes modelos animais, sugere que estas enzimas podem agir na regulação da atividade sináptica, controlando os níveis de ATP e adenosina, de acordo com a plasticidade sináptica desenvolvida, em situações fisiológicas ou patológicas.

## ABSTRACT

Several evidences suggest a role of extracellular ATP in the synaptic plasticity. ATP is able to induce long-term potentiation (LTP) and its participation in extracellular protein phosphorylation has been suggested as a signal for long-lasting changes in synaptic activity. ATP evokes responses through two subclasses of P2-purinoreceptors, P2X and P2Y. The signaling actions induced by extracellular ATP are directly correlated to the activity of a group of ectoenzymes, ectonucleotidases, which trigger enzymatic conversion of ATP, controlling the nucleotide levels in the synaptic cleft. The neurotransmitter ATP can be hydrolyzed to adenosine, an important neuromodulator, by the conjugated action of this group of ectonucleotidases, that includes an ecto-ATPase (EC 3.6.1.3), an ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) and a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5). The control of ATP and adenosine levels promoted by ectonucleotidases can be important to the modulation of the mechanisms related to synaptic plasticity. Our results showed that ectonucleotidases activities are modulated in physiological and pathological situations able to induce synaptic plasticity, such as memory and epilepsy. ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities from hippocampal synaptosomes were inhibited immediately after the training session in a step-down inhibitory avoidance task in rats. Furthermore, a significant decrease of ATP hydrolysis was observed 30 minutes after the training session. The enzyme activities studied did not present significant changes after test session of the task. Our results indicated that the modulation of ectonucleotidase activities can participate in the mechanisms of memory acquisition, but has no effect on retrieval. Furthermore, it is possible to suggest the participation of ectonucleotidases in the consolidation phase of memory, since an inhibition of ATP diphosphohydrolase activity was observed at 180 minutes post-training. We also determined these activities in other brain structures involved in memory formation, such as entorhinal cortex and parietal cortex. Our results showed an inhibition of ATP diphosphohydrolase in entorhinal cortex of rats immediately, but not at 180 and 360 min after training session. The alterations observed in hippocampus and entorhinal cortex could represent an important biochemical mechanism related to memory acquisition. Ectonucleotidases from parietal cortex did not show significant changes, suggesting that these enzymes are not relevant to formation of inhibitory avoidance memory in parietal cortex. In order to investigate the involvement of purinergic system in this condition, we investigate the effect of suramin on the retention of step-down inhibitory avoidance task. Besides to be an antagonist of P2 and NMDA receptors, our results showed that suramin is a non-competitive inhibitor of apyrase activity, with  $K_i$  values in the range of micromolar. Intrahippocampal infusion of suramin immediately post-training reduced the retention of the task in a dose-dependent effect. The amnesic effect is probably due its antagonist action on P2 and NMDA receptors. Considering that adenosine has potent anticonvulsant effects, we determined ectonucleotidase activities after the induction of epilepsy by several animal models, such as pilocarpine, kainic acid and kindling models. ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities from synaptosomes of hippocampus and cerebral cortex of rats significantly increased at 48-52 hours, 7-9 days and 45-50 days after induction of status epilepticus (SE) by pilocarpine or kainic acid models. However, only 5'-nucleotidase activity remains elevated at 100-110 days after the treatment with kainic acid. The regulation of ectonucleotidase pathway may play a modulatory role during the evolution of behavioral and patophysiological changes induced by status epilepticus. Changes in ectonucleotidase activities were not seen at different times after a single convulsant pentylenetetrazol (PTZ) injection. However, in PTZ kindling, rats showing greater resistance to the kindling presented an increase in ATP hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex. These changes may represent an important mechanism in the modulation of chronic epileptic activity. The demonstration that ectonucleotidases presented the activities differently altered after the acquisition of a memory task or after the induction of different animal models of epilepsy, suggest that these enzymes can act in the regulation of synaptic activity, controlling ATP and adenosine levels, according the synaptic plasticity developed, in physiological or pathological situations.



## ÍNDICE DE FIGURAS

**FIGURA 1.1.** Funções do ATP liberado em um terminal nervoso e sua hidrólise até adenosina no espaço extracelular.....34

### CAPÍTULO 1

**FIGURA 1.1.** Effect of training session in a step-down inhibitory avoidance task on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by the ATP diphosphohydrolase of synaptosomes of the rat hippocampus..... 40

**FIGURA 1.2.** Effect of the training session in a step-down inhibitory avoidance task on 5'-nucleotidase activity in synaptosomes from the rat hippocampus .....41

### CAPÍTULO 2

**FIGURA 2.1.**Effect of training session in a step-down inhibitory avoidance task on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by ATP diphosphohydrolase in synaptosomes from hippocampus of rats.....46

**FIGURA 2.2.** Effect of training session in a step-down inhibitory avoidance task on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by ATP diphosphohydrolase in synaptosomes from entorhinal cortex of rats.....47

### CAPÍTULO 3

**FIGURA 3.1.** Effect of suramin on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by the apyrase activity in synaptosomes from hippocampus of rats.....52

**FIGURA 3.2.** Kinetic analysis of the inhibition of apyrase by suramin in hippocampal synaptosomes of rats .....52

**FIGURA 3.3.** Effect of intrahippocampal infusion of suramin (0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 µg/side) on retention of step-down inhibitory avoidance task.....53

## CAPÍTULO 4

**FIGURA 4.1.** Effects of pilocarpine model on ATP (■), ADP (●) and AMP (▲) hydrolysis in synaptosomes from hippocampus (A) and cerebral cortex (B) at different times after the induction of status epilepticus in adult rats.....78

**FIGURA 4.2.** Effects of kainate model on ATP (■), ADP (●) and AMP (▲) hydrolysis in synaptosomes from hippocampus (A) and cerebral cortex (B) at different times after the induction of status epilepticus in adult rats.....79

## ÍNDICE DE TABELAS

**TABELA 1.** Principais agonistas e antagonistas dos receptores P2..... 18

### **CAPÍTULO 5**

**TABELA 5.1.**Effect of PTZ kindling on ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus of rats..... 95

**TABELA 5.2.**Effects of PTZ kindling on ectonucleotidase activities in synaptosomes from cerebral cortex of rats..... 96

## 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  
AMPPNP - adenilimido-difosfato  
ATP – adenosina 5'-trifosfato  
ATP- $\gamma$ -S - adenosina 5'-O-(3-tiotrifosfato)  
CaMKII – proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina II  
CGS 21680 – hidrocloreto de 2-p-(2-carboxietil)fenetilamino-5'-N-  
etilcarboxamidoadenosina  
CHA – cicloexiladenosina  
CPA - ciclopentiladenosina  
CREB- proteína de ligação de elemento em resposta ao AMPc  
8-CPT- ciclopentilteofilina  
GMPc – guanosina monofosfato cíclico  
LTP- potenciação de longa duração  
 $\alpha,\beta$ -meATP -  $\alpha,\beta$ -metileno adenosina 5'-trifosfato  
2MeSATP - 2-metiltio- adenosina 5'-trifosfato  
NMDA- N-metil-D-aspartato  
PKA – proteína quinase A, proteína quinase dependente de AMP cíclico  
PKC – proteína quinase C  
PKG – proteína quinase G , proteína quinase dependente de GMP cíclico  
PTZ – pentilenotetrazol  
UMP – uridina monofosfato  
SNC- sistema nervoso central  
Outras abreviaturas encontram-se detalhadas no texto.

## I. INTRODUÇÃO

### I.1. PLASTICIDADE SINÁPTICA

Plasticidade é um conceito amplo que inclui todas as formas de reorganização duradoura que ocorrem no cérebro. Essas reorganizações podem envolver redes de neurônios ou sinapses. Este processo pode ser considerado sob o aspecto fisiológico (propriedades funcionais adquiridas pelos neurônios), morfológico (morfologia e a ultraestrutura de neurônios e glia) ou bioquímico (atividades enzimáticas, transdução de sinal e mudanças na expressão gênica) (AU LOIS et al., 1997).

Após seu desenvolvimento, o sistema nervoso deve ser mantido e até mesmo modificado para manter suas funções. Uma vez que neurônios maduros não se dividem, eles requerem reparos, através de processos de regeneração e migração. Recentes estudos demonstram que o cérebro tem a extraordinária capacidade de desenvolver respostas plásticas durante a vida, sendo que a plasticidade funcional está acoplada a mudanças estruturais de longa duração (AU LOIS et al., 1997). Nos últimos anos, estudos indicam que o sistema nervoso central pode exibir plasticidade sináptica sutil e específica em resposta a uma dada atividade, como por exemplo, o aprendizado de uma nova tarefa. Além disso, o cérebro tem a capacidade de reparação após perda celular devido a injúria ou uma doença neurodegenerativa (COTMAN, 1998).

Em sistema nervoso central de mamíferos, dois importantes fenômenos plásticos têm sido descritos: a potenciação de longa duração (do inglês "long-term potentiation" ou LTP), considerado um possível mecanismo envolvido na memória, e a plasticidade induzida por epilepsia (AU LOIS et al., 1997).

## I.2. MEMÓRIA E POTENCIAÇÃO DE LONGA-DURAÇÃO (LTP)

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).

O aprendizado é quantificado experimentalmente como a probabilidade com que um organismo responderá, diferentemente, ao mesmo estímulo após sua repetição. Esta probabilidade alterada está baseada na memória daquilo que foi aprendido pelo organismo após uma sessão de treino. Assim, não é possível considerar aprendizado sem memória, ou memória sem aprendizado. A memória necessária para o aprendizado é definida como memória de curta duração ou aquisição. Já a evocação de um comportamento horas ou semanas depois, envolve a formação da memória de longa duração. Assim durante e logo após a sessão de treino, o desempenho do sujeito em relação a um determinado comportamento está baseado na memória de curta duração; após períodos de tempo mais prolongados, tal desempenho é mediado pela evocação de uma memória de longa duração (AGRANOFF et al., 1998). Estudos demonstram que as memórias de curta duração e de longa duração são, em parte, processos distintos (IZQUIERDO et al., 1998).

A formação do aprendizado e da memória envolve mudanças estruturais no cérebro, sendo que existe um grande interesse em identificar e compreender os mecanismos envolvidos na memória e aprendizado de mamíferos. DONNALD HEBB (1949) no seu clássico livro "The Organization of Behavior" preconizou que o aprendizado poderia ser uma forma de promover o fortalecimento de conexões sinápticas. Além disso, HEBB postulou que o aprendizado envolveria a ativação sináptica coincidente de dois ou mais neurônios, fortalecendo a conexão sináptica entre eles. Este tipo de ativação ficou conhecido como sinapse de Hebb (BEGGS et al., 1999).

Em 1973, BLISS, GARDNER-MEDWIN & LØMMO demonstraram um aumento na eficiência sináptica após específica estimulação elétrica de hipocampo de coelho (BLISS & GARDNER-MEDWIN, 1973; BLISS & LØMMO, 1973). Esta forma de plasticidade sináptica de longa duração é conhecida por potenciação de longa duração (LTP). Após uma série de estímulos curtos de alta frequência, 100 por segundo, a amplitude das respostas sinápticas aumenta e pode ser mantida *in vivo* por dias ou semanas (BEGGS et al., 1999). Originalmente observada no hipocampo, a LTP tem sido estudada *in vivo* e *in vitro* em diferentes sinapses e estruturas. A estrutura mais profundamente estudada é o giro denteado, cuja integridade é essencial para o aprendizado espacial e cujas sinapses são relativamente fáceis de serem estimuladas e registradas (JEFFERY, 1997).

Considerando o grande número de estudos sobre LTP, ainda permanece um desafio explicar como este processo ocorre fisiologicamente. Os mecanismos envolvidos na LTP são divididos em três fases: indução, manutenção e expressão da LTP (BEGGS et al., 1999). Estudos demonstram que glutamato e seus receptores desempenham um papel fundamental na indução da LTP (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Durante a estimulação sináptica de alta frequência, a despolarização acoplada à liberação pré-sináptica de glutamato, resulta na ativação dos receptores NMDA e na liberação do bloqueio promovido por  $Mg^{2+}$  no canal iônico. Os receptores NMDA normalmente tornam-se ativos somente após despolarização causada pelo efeito do glutamato sobre receptores AMPA, os quais ativam um canal de  $Na^{+}$ , que produz um rápido potencial excitatório pós-sináptico. A ativação de NMDA resulta em um aumento do cálcio pós-sináptico e estimula a liberação de  $Ca^{+2}$  do retículo endoplasmático, amplificando o sinal. A ativação de receptores metabotrópicos também é importante na fase de indução da LTP. O aumento do cálcio intracelular produz a

ativação de uma série de cascatas enzimáticas mediadas por proteínas quinases, tais como PKC, CaMKII, PKA e PKG, que conduzem à persistente alteração da eficiência sináptica (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; MAREN & BAUDRY, 1995). A LTP pode ser mantida na ausência de estimulação por mecanismos que incluem uma liberação pré-sináptica aumentada de glutamato e síntese protéica na pós-sinapse (MAREN & BAUDRY, 1995; BEGGS et al., 1999). A via de sinalização mediada pelo AMPc, PKA e CREB modula a ativação gênica e a síntese protéica necessária para a manutenção de diversas formas de plasticidade. CREB é uma família de fatores de transcrição que regulam a síntese de diversas proteínas e fatores de transcrição induzíveis, quando na forma fosforilada CREB-P (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; BEGGS et al., 1999). Além disso, a ativação pós-sináptica de cascatas enzimáticas conduz à alterações de longa duração nas propriedades dos receptores AMPA, um processo que pode aumentar a sensibilidade destes receptores e contribuir para a expressão da LTP. Entretanto, os mecanismos envolvidos na expressão e manutenção de longa duração da eficiência sináptica não foram completamente elucidados (BEGGS et al., 1999).

Embora a LTP ainda não tenha sido claramente associada com qualquer modificação comportamental observada em um animal intacto, diversas evidências sugerem seu envolvimento com o aprendizado e a memória. Análise farmacológica da LTP e da memória demonstra muitas similaridades, de forma que importantes correlações podem ser estabelecidas entre esses dois fenômenos (IZQUIERDO & MEDINA, 1995). A potenciação de longa duração compartilha diversas propriedades com a memória: rápida indução (aquisição), grande labilidade no período pós-indução (consolidação), especificidade em relação ao estímulo e imediata expressão em resposta ao estímulo original (IZQUIERDO & MEDINA, 1995).



### I.2.1. ESQUIVA INIBITÓRIA

A tarefa de esquiva inibitória envolve o aprendizado de uma tarefa aversiva onde, na sessão de treino, o animal ao descer de uma plataforma recebe um choque de baixa intensidade. Na sessão de teste, que ocorre após um determinado tempo, o animal é testado, avaliando-se o tempo de latência em que permanece na plataforma e, conseqüentemente, a retenção da tarefa. Trata-se de um aprendizado adquirido em uma única tentativa, tornando-o ideal para o estudo de processos iniciados no treino (GOLD, 1986; IZQUIERDO & MEDINA, 1997). O aprendizado de esquiva inibitória envolve a repressão específica de uma tendência natural dos ratos de explorarem o ambiente, sem afetar o comportamento exploratório enquanto se encontram sobre a plataforma (IZQUIERDO & MEDINA, 1997).

O aprendizado de esquiva inibitória em ratos desencadeia uma série de eventos bioquímicos que são necessários para a retenção desta tarefa. Os eventos são similares àqueles descritos para outras formas de plasticidade neural (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; MAREN & BAUDRY, 1995; IZQUIERDO & MEDINA, 1995, 1997a). Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória desta tarefa no hipocampo envolvem ativação de receptores ionotrópicos NMDA e AMPA, receptores metabotrópicos e um aumento nos níveis de NMDA1 e GluR1, subunidades dos receptores NMDA e AMPA, respectivamente (IZQUIERDO & MEDINA, 1995; CAMMAROTA et al., 1996; RIEDEL, 1996). Além disso, cascatas bioquímicas desencadeadas por proteínas quinases participam na formação da memória de esquiva inibitória. Evidências indicam que a ativação das cascatas mediadas por proteína quinase G, CaMKII, proteína quinase C e proteína quinase A é fundamental na fase inicial da plasticidade de longa duração induzida pela esquiva inibitória, minutos após a

realização do treino (BERNABEU et al., 1995, 1996, 1997; CAMMAROTA et al., 1997; ITO et al., 1991; IZQUIERDO & MEDINA, 1997).

Entretanto, como ocorre na LTP em hipocampo de ratos, os eventos bioquímicos desencadeados pelo aprendizado nesta tarefa envolvem a intervenção tardia, em torno de 3 a 6 horas após o treino, da via de sinalização mediada pela proteína quinase A (AMPC/ PKA/CREB) (BERNABEU et al., 1997).

Os eventos bioquímicos são regulados logo após o treino por mecanismos hormonais relacionados com a ansiedade e estresse e modulados por sinapses GABAérgicas, colinérgicas, noradrenérgicas e por mensageiros retrógrados. A fase mais tardia, 3-6 horas após o treino, é modulada por mecanismos relacionados ao humor e afeto, envolvendo vias dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas (IZQUIERDO & MEDINA, 1997, 1997a).

O hipocampo, a amígdala e o córtex entorrinal são interconectados e, além disso, o córtex entorrinal está ligado ao córtex parietal posterior e córtex pré-frontal (WITTER et al., 1989; HYMAN et al., 1990), sendo que estas estruturas desempenham um papel na memória, provavelmente de uma forma integrada (IZQUIERDO et al., 1997). O córtex entorrinal e o córtex parietal posterior participam na consolidação da memória após o início dos eventos bioquímicos hipocampais, através de processos mediados pelo receptor NMDA, sendo que a intervenção de ambas estruturas é necessária para a completa consolidação da memória. Além disso, a participação do hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e córtex parietal parece ser fundamental para a evocação da memória nesta tarefa, após diferentes períodos de tempo (IZQUIERDO et al., 1997; QUILLFELDT et al., 1996; ZANATTA et al., 1996).

As mudanças bioquímicas observadas após o treino de esquivas inibitórias são bastante significativas, sendo algumas delas específicas para uma determinada estrutura

cerebral e a maioria parece ser específica em relação ao aprendizado (não são observadas em animais expostos ao choque ou ao ambiente da tarefa). Existem consideráveis evidências de que o aprendizado provoca mudanças neuroplásticas envolvendo moléculas de adesão celular neural (NCAM e L1) (MURPHY & REGAN, 1998, RØNN et al., 1998). Tem sido atribuído a NCAM um papel regulatório na indução e manutenção da LTP hipocampal (LÜTHI et al., 1994). A curva de tempo para expressão da NCAM, identificada nos paradigmas de esQUIVA passiva em ratos e pintos, apresenta um pico de síntese de glicoproteínas ocorrendo de 6 a 8 horas após o treino (DOYLE et al., 1992; SCHOLLEY et al., 1993; ARAMI et al., 1996). Os mecanismos moleculares através dos quais NCAM e L1 regulam a plasticidade neural ainda não foram completamente esclarecidos. Entretanto, evidências *in vitro* sugerem um importante papel na regulação da transdução de sinal associada à reorganização sináptica (MURPHY & REGAN, 1998).

Embora a ativação de receptores de glutamato e das cascatas intracelulares controladas por proteínas quinases sejam eventos considerados necessários para a indução da LTP e para a formação da memória no hipocampo, muitos outros fatores, tais como ácido araquidônico (BLISS et al., 1991), óxido nítrico, monóxido de carbono (ZHUO et al., 1993) e ATP extracelular (WIERASZKO, 1996) podem estar envolvidos na plasticidade sináptica induzida pelo aprendizado.

### I.3. EPILEPSIA

A epilepsia refere-se a um grupo diverso, etiologicamente e clinicamente, de transtornos neurológicos resultantes da atividade neuronal encefálica hypersincrônica, paroxística e anormal de neurônios, resultando em uma crise epiléptica convulsiva ou não-convulsiva repetitiva (MELDRUM & CHAPMAN, 1998). Trata-se de um tipo de

disfunção cerebral caracterizada clinicamente por alterações subjetivas ou comportamentais súbitas (crises epiléticas), com tendência a se repetirem ao longo da vida do paciente (DUNCAN et al., 1995). Estas crises refletem uma atividade elétrica anormal, de início súbito, acometendo uma ou várias áreas do córtex cerebral, causada por diversas patologias estruturais ou neuroquímicas (PALMINI et al., 1991; DUNCAN et al., 1995).

A prevalência da epilepsia na população humana é da ordem de 0,5-1% (SHORVON, 1990; PALMINI & COSTA, 1998; SANDER & SILLANPÄÄ, 1998), o que a torna um problema de dimensões consideráveis. Aproximadamente 70% dos pacientes epiléticos têm suas crises controladas pelo uso de drogas anti-epiléticas (PALMINI & COSTA, 1998). Os restantes constituem um grupo de alta morbidade, na medida em que suas crises epiléticas persistem a despeito do uso de fármacos.

A epilepsia de lobo temporal apresenta alta incidência, gravidade e importância clínica, atingindo preferentemente indivíduos adultos. Caracteriza-se por crises focais, apresentando ou não generalização secundária e por comprometimento da consciência (SHORVON, 1990).

O aumento da suscetibilidade do tecido nervoso às crises epiléticas tem sido ligado a uma anormalidade na neurotransmissão do SNC, através de um aumento na transmissão excitatória, ou por uma diminuição na transmissão inibitória, ou por ambos mecanismos. Em consequência, a transdução de sinal anormal tem sido investigada, uma vez que a neurotransmissão inadequada induz modificações no metabolismo da célula neuronal (MELDRUM, 1984; NAFFAH-MAZACORATTI, 1998).

Para entender esta disfunção, inúmeras abordagens têm sido feitas, tanto pelo estudo do tecido epilético humano, obtido após remoção cirúrgica do foco epilético, como através do estudo de tecidos cerebrais, provenientes de animais submetidos a

diferentes modelos de epilepsia. A busca de medicamentos e o entendimento dos processos envolvidos na epileptogênese baseiam-se em grande parte nos modelos animais de epilepsia (MODY & SCHWARTZKROIN, 1997).

Os modelos experimentais de epilepsia são denominados agudos, quando o animal apresenta crises convulsivas somente durante a vigência do agente indutor. Estes modelos incluem a aplicação tópica ou injeção localizada de compostos que interferem com o balanço neuroquímico responsável pela excitabilidade neuronal (MODY & SCHWARTZKROIN, 1997). Os modelos mais comumente utilizados são: bloqueadores dos aminoácidos inibitórios (antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub>); estimulantes da excitabilidade (agonistas de glutamato); estimulação elétrica (in vitro); eletrochoque e o modelo do pentilenotetrazol.

Os modelos de epilepsia são ditos crônicos quando as crises recorrem a intervalos variados de tempo, não sendo necessário o estímulo precipitante exógeno para desencadear cada crise. Estes modelos caracterizam-se por apresentar um fator casual conhecido, que induz o processo de epileptogênese, o qual, após determinada latência, culmina com crises epiléticas espontâneas (NAFFAH-MAZZACORATTI, 1998). Os modelos mais utilizados são aqueles que mimetizam a epilepsia do lobo temporal, o tipo mais freqüente de epilepsia encontrado na população humana. São exemplos: o modelo da pilocarpina (TURSKI et al., 1983); o modelo do ácido cáinico (BEN-ARI, 1985) e o abrasamento (Kindling) (GODDARD, 1967).

### I.3.1. MODELO DA PILOCARPINA

A relação entre o sistema colinérgico e a epilepsia tem sido objeto de intenso estudo nas últimas décadas. TURSKI et al. (1983a) demonstraram que a ocorrência de atividade epilética após injeção intra-amigdaliana ou sistêmica de altas doses de

agonistas muscarínicos colinérgicos em ratos e camundongos era acompanhada por lesões em todo o prosencéfalo. Posteriormente, a pilocarpina, outro agonista colinérgico muscarínico, foi administrada sistemicamente em ratos, resultando em uma série de alterações comportamentais (TURSKI et al., 1983).

A administração de altas doses de pilocarpina (300-380mg/Kg) induz uma série de alterações comportamentais e eletrográficas, indicativas do estado de mal epilético. A indução da crise se dá pelo efeito agonista colinérgico e sua manutenção se deve a mecanismos excitatórios do tipo glutamatérgicos (CAVALHEIRO, 1995; AVANZINI et al., 1997). Imediatamente após a administração de pilocarpina, os animais apresentam automatismos faciais associados à salivação moderada e tremores generalizados. Cerca de 15-25 minutos após, este comportamento progride para crises motoras límbicas, onde os animais apresentam intensa salivação, clonias de patas dianteiras e queda. Essas crises motoras límbicas ocorrem a cada 2 a 8 minutos, culminando em estado de mal epilético em 50 a 60 minutos. Esse estado chega a durar 18 horas e ao final desse período, os animais tornam-se irresponsivos a estímulos ambientais, retornando a seu comportamento normal dentro de 24 horas. A mortalidade é em torno de 30-50%. Estes episódios caracterizam a fase aguda do modelo induzido por pilocarpina (TURSKI et al., 1983; CAVALHEIRO, 1995).

Em 1990, LEITE et al. caracterizaram os períodos silencioso e crônico deste modelo. O período silencioso inicia-se de 4 a 44 dias após a administração de pilocarpina e é caracterizado pela normalização das alterações comportamentais e eletrográficas. Já o período crônico, apresenta crises espontâneas, que ocorrem numa frequência de 2 a 4 crises por semana e mantém-se por toda a vida do animal.

O estudo eletrográfico mostra que a origem das descargas epiléticas ocorre na região hipocampal difundindo-se para a amígdala e córtex (CAVALHEIRO, 1995).

Histopatologicamente, observa-se uma perda neuronal no hipocampo, amígdala, tálamo, córtices piriforme e entorrinal, neocórtex e substância negra (TURSKI et al., 1983). Após o quarto dia, identificam-se brotamentos supra-granulares de fibras musgosas que atingem a máxima intensidade em 100 dias, sendo que a perda celular no hipocampo é mais significativa nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (MELLO et al., 1993). A perda neuronal é proporcional à duração do estado de mal epiléptico (TURSKI et al., 1983), mas não à severidade da epilepsia (número de crises) no período crônico (LEMONS & CAVALHEIRO, 1995). Esse modelo de epilepsia parcial com generalização secundária oferece vantagens sobre os demais modelos existentes por apresentar estabilidade e não remissão das crises (LEITE et al., 1990).

### I.3.2. MODELO DO ÁCIDO CAÍNICO

O ácido caínico (cainato) é um análogo do glutamato, que além de sua ação estimulante direta sobre receptores do glutamato, induz a liberação do mesmo (BEN-ARI, 1985). Sua administração sistêmica ou localizada leva à epilepsia persistente. Em torno de uma hora após a injeção (sistêmica ou intra-hipocampal) ocorre uma parada na movimentação associada a clônus faciais. As crises podem aumentar de intensidade em horas, podendo chegar a um estado epiléptico focal (BEN-ARI, 1985).

O curso clínico e eletroencefalográfico após a injeção intra-hipocampal, pode ser divididos em fases: 1) aguda (0-10 dias), em que ocorrem descargas no hipocampo, propagadas para a região frontal; 2) ativa (10-30 dias), na qual ocorrem crises curtas (descargas hipocampais com clônus motor generalizado, seguido de rápida recuperação); 3) latente (30-90 dias) ocorre desaparecimento das crises e diminuição da atividade interictal; 4) crônica (mais de 90 dias) quando ressurgem crises que tendem a aumentar de intensidade e frequência com o passar do tempo, podendo tornar-se

generalizadas (BEN-ARI, 1985; MATHERN et al., 1993). A administração sistêmica de cainato causa lesões corticais e sub-corticais variáveis, incluindo o córtex piriforme, entorrinal, hipocampo, amígdala e tálamo (BEN-ARI, 1985). A administração intra-hipocampal promove degeneração no giro denteado, CA1 E CA3 (MATHERN et al., 1993; AVANZINI et al., 1997). A análise do hipocampo e giro denteado de ratos tratados com cainato tem revelado a presença de brotamentos das fibras musgosas na camada molecular interna do giro denteado entre 10 e 30 dias após a primeira crise (MATHERN et al., 1993; MEIER & DUDEK, 1996).

### I.3.3.ABRASAMENTO (KINDLING)

No modelo de kindling, a aplicação de estímulos químicos ou elétricos inicialmente subconvulsivantes resultam em crises progressivamente mais intensas ao longo das subseqüentes estimulações (GODDARD et al., 1969; MASON & COOPER, 1972). A estimulação elétrica inicial pode passar despercebida, mas à medida que os estímulos vão sendo subseqüentemente administrados, surge a chamada pós-descarga. Esta descarga localiza-se inicialmente na região em que é realizada a estimulação, tornando-se mais intensa e finalmente propagando-se para o córtex como um todo, acarretando uma crise generalizada (RACINE, 1972; MC NAMARA & WADA, 1997). Uma vez estabelecido o processo convulsivo, este pode ser desencadeado meses ou mesmo anos após terminada a estimulação inicial (RACINE, 1972; MC NAMARA & WADA, 1997).

Em 1972, RACINE descreveu diferentes estágios de progressão do kindling através de características clínicas e comportamentais: 1) clônus facial; 2) movimentação de flexão e extensão da cabeça; 3) clônus de patas contra-laterais ao hemisfério estimulado; 4) respostas de orientação, onde o animal permanece de pé apenas sobre as



patas traseiras (“rearing”); 5) “rearing” seguido de queda. Interessantemente, uma vez que atingido o estágio 5, os animais podem permanecer um longo espaço de tempo, possivelmente toda a vida, sem serem estimulados, e uma vez repetido o mesmo estímulo, ele apresenta uma crise do estágio 5. Além do estímulo elétrico, a repetida administração sistêmica de agentes convulsivantes pode também induzir o kindling, entre eles o pentilenotetrazol (PTZ), presumivelmente um inibidor da transmissão GABAérgica a nível de receptor (MC NAMARA & WADA, 1997). Os mecanismos de plasticidade neuronal envolvidos na epileptogênese que ocorre no kindling ainda não estão completamente elucidados. Uma hipótese para explicar a hiperexcitabilidade do cérebro após o kindling é a de que um novo circuito sináptico é formado. Esta hipótese está baseada na demonstração de que o kindling é acompanhado de brotamento dos axônios das fibras musgosas de células granulares de hipocampo (SUTULA et al., 1988). Uma hipótese alternativa sugere que a hiperexcitabilidade no kindling é devido a uma função aumentada de uma subpopulação de sinapses glutamatérgicas, via receptores NMDA (MC NAMARA, 1994).

As repercussões de uma crise epiléptica estão associadas às despolarizações e hiperpolarizações de populações neuronais. Em decorrência disto podem surgir respostas imediatas (segundos a minutos) e tardias (horas, dias, meses ou anos) tanto à nível neuronal quanto glial. Os efeitos imediatos estão relacionados com a liberação de neurotransmissores e a interação com seus receptores, incluindo modificações na condutância de canais iônicos e a produção, liberação, recaptção e degradação de neuromoduladores, tais como adenosina. Estas respostas podem levar a modificações intracelulares, tais como ativação de proteínas quinases e fosfatases através de segundos mensageiros (cálcio, AMPc, GMPc) e modificações na transcrição gênica (NAFFAH-MAZACORATTI, 1998).

#### I.4. ATP E TRANSMISSÃO PURINÉRGICA

As primeiras evidências indicando o ATP como neurotransmissor surgiram dos estudos de HOLTON & HOLTON (1954) e HOLTON (1959), que demonstraram a liberação desta substância a partir de nervos sensoriais. Mais tarde, BURNSTOCK (1972) propôs que o ATP é o neurotransmissor liberado de nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos, na musculatura lisa do intestino e da bexiga urinária. Então, foi proposto que, além da transmissão colinérgica e noradrenérgica, existe no sistema nervoso autônomo a transmissão purinérgica, onde o ATP é o principal neurotransmissor (BURNSTOCK, 1972).

O ATP é armazenado nos terminais nervosos e co-liberado com diversos neurotransmissores, em diferentes preparações biológicas, em uma forma  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente (PHILLIS & WU, 1981). RICHARDSON & BROWN (1987) demonstraram que o ATP é liberado com acetilcolina em terminais colinérgicos de estriado de ratos. Além disso, o ATP pode ser co-liberado com outros neurotransmissores, como a noradrenalina em nervos aferentes primários (VON KUEGELGEN & STARKE, 1991; RATHBONE et al., 1999) e serotonina em vesículas serotoninérgicas (POTTER & WHITE, 1980).

Em sistema nervoso central, estudos têm demonstrado que o ATP pode ser liberado a partir de preparações sinaptossomais pela estimulação com  $\text{K}^+$  (WHITE, 1978) e a partir de aferentes colaterais-comissurais de Schaffer de fatias hipocâmpais por estimulação elétrica (WIERASZKO et al., 1989). Além disso, ATP induz a formação de correntes sinápticas rápidas em neurônios de hipocampo em cultura (INOUE et al., 1992), bem como em fatias de habenula medial (EDWARDS et al., 1992; EDWARDS et al., 1997). Dependendo da concentração usada, o ATP exógeno

pode exercer diferentes efeitos sobre as propriedades celulares. O ATP é capaz de induzir a potenciação de longa duração, registrada em fatias hipocâmpais de camundongo e cobaia (WIERASZKO & SEYFRIED, 1989; NISHIMURA et al., 1990; FUJII et al., 1999). Estes resultados sugerem que o ATP extracelular pode estar envolvido na modulação da eficiência sináptica. Além disso, estudos têm demonstrado que a liberação de ATP é maior após estimulação de alta frequência (frequências usadas para induzir LTP), enquanto que, após estimulação de baixa frequência (frequências usadas para induzir LTD), ocorre preferencialmente a liberação de adenosina (CUNHA et al., 1996).

Evidências indicam que o ATP extracelular pode induzir a liberação de glutamato e um aumento no cálcio intracelular através da estimulação de receptores purinérgicos em neurônios hipocâmpais de ratos (INOUE et al., 1992, 1995). Entretanto, a subpopulação de células que responderam a ATP corresponde somente a 20% do total analisado (INOUE et al., 1992). Na maioria dos neurônios testados, uma diminuição na concentração do cálcio intracelular foi detectada após a estimulação por ATP (KOIZUMI & INOUE, 1997), demonstrando que ATP inibe a liberação de glutamato em hipocampo de ratos, via receptores purinérgicos pré-sinápticos (INOUE, 1998). Além disso, sabe-se que ATP estimula a liberação de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), um neurotransmissor que inibe a função excitatória de glutamato (INOUE, 1998a). Portanto, os efeitos do ATP podem ser inibitórios ou estimulatórios nas funções hipocâmpais, dependendo do sítio de ação e do subtipo de receptores para ATP estimulado (INOUE, 1998).

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

apoptose (ZIMMERMANN, 1994; ABBRACCHIO et al., 1995; DI ORIO et al., 1998; RATHBONE et al., 1999). Além disso, 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 fosforilação de proteínas de superfície pelo ATP extracelular liberado durante estimulação repetitiva dos terminais nervosos, tem sido sugerida como um sinal para mudanças de longa duração na eficiência sináptica (EHRLICH et al., 1988, 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).

O ATP extracelular também pode influenciar a atividade sináptica ao interagir com receptores específicos. Os nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina podem exercer seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos subdivididos em dois grandes grupos: P1 e P2. Os purinoreceptores P1 são ativados com o potencial agonista na ordem adenosina > AMP > ADP > ATP, enquanto que os purinoreceptores P2 são ativados por ATP > ADP > AMP > adenosina (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

Após sua liberação, o ATP extracelular produz suas respostas através de duas subclasses de purinoreceptores P2: P2X e P2Y. A subclasse P2X está dividida, até o momento, em sete subtipos (P2X<sub>1-7</sub>) clonados, caracterizados farmacologicamente e considerados ionotrópicos, porque eles abrem canais cátion-específicos através da ativação por um agonista. A subclasse P2Y pertence à família de receptores acoplados às proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G), promovendo a modulação de efetores intracelulares. Os subtipos P2Y<sub>1-4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, e P2Y<sub>11</sub> foram clonados e caracterizados, sendo considerados membros dos receptores de ATP

acoplados a proteína G (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Os sistemas de segundos mensageiros modulados pela ativação destes receptores envolvem a ativação da fosfolipase C, que cliva os fosfatidilinosítóis da membrana plasmática, gerando os segundos mensageiros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, 1993). O inositol-1,4,5-trifosfato promove a mobilização do cálcio do retículo endoplasmático, elevando a concentração de cálcio no citosol e o diacilglicerol ativa proteínas quinases, como a PKC (NESTLER et al., 1984). A investigação da biologia molecular dos purinoreceptores tem avançado rapidamente nos últimos anos. Entretanto, até o presente momento, não existem agonistas ou antagonistas capazes de diferenciar adequadamente os receptores P2X e P2Y e seus respectivos subtipos. A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais agonistas e antagonistas para estas duas famílias de receptores.

O envolvimento do sistema purinérgico nos mecanismos de potenciação de longa duração induzidos eletricamente e por ATP foi investigado (WIERASZKO & EHRLICH, 1994). Estes autores demonstraram que o ATP extracelular e seu análogo ATP- $\gamma$ -S amplificaram permanentemente a magnitude das respostas sinápticas. Entretanto, este efeito não foi observado na presença de outros análogos de ATP, tais como AMPPNP, 2MeSATP,  $\alpha,\beta$ -meATP e o antagonista Cibacron Blue 3G (WIERASZKO & EHRLICH, 1994). Estes autores propõe que a remoção do fosfatogama de ATP e ATP- $\gamma$ -S por uma ecto-proteína quinase poderia ser necessária para a ocorrência do efeito facilitatório sobre a LTP (WIERASZKO & EHRLICH, 1994). Entre os ligantes dos receptores P2, suramina tem sido utilizada como um antagonista não-seletivo de receptores P2 (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998), além de possuir um efeito inibitório sobre a atividade das enzimas de degradação de ATP de várias fontes (MARTÍ et al., 1996; MEGHJI & BURNSTOCK, 1995; ZIGANSHIN et al., 1995).

TABELA 1. Principais agonistas e antagonistas dos receptores P2

Receptores		P2X	P2Y
Tipo de receptor		Ionotrópico	Acoplado a proteína G
Efetores		$Ca^{+2} > Na^{+} > K^{+}$	$\uparrow IP_3$ , $\uparrow Ca^{+2}$ , $\uparrow DAG$
Agonistas	Não-seletivos	ATP ATP $\gamma$ S 2MeSATP Ap <sub>4</sub> A	ATP ATP $\gamma$ S 2MeSATP Ap <sub>4</sub> A
	Seletivos a P2X/P2Y	$\alpha, \beta$ -meATP $\beta, \gamma$ -meATP BzATP	ADP UTP UTP $\gamma$ S UDP 2MeSADP ADP $\beta$ S
Antagonistas	Não-seletivos	Suramina PPADS Reactive Blue 2	Suramina PPADS Reactive Blue 2
	Seletivos a P2X/P2Y	NF023 NF279 KN-62	ARL67085 FPL 66096 A3P5PS

Adaptado a partir de RALEVIC & BURNSTOCK (1998).

Abreviações usadas: *AMPc*, adenosina 3',5',monofosfato cíclico; *ADP $\beta$ S*, adenosina 5'-O-(2-tiodifosfato); *A3P5PS*, adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato; *ARL 67085*, 6-N,N-dietil-D- $\beta, \gamma$ -dibromometileno ATP; *ATP $\gamma$ S*, adenosina 5'-O-(3-tiotrifosfato); *BzATP*, 3'-O-(4-benzoil)benzoil ATP; *DAG*, diacilglicerol; *Ap<sub>4</sub>A*, P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-diadenosina tetrafosfato; *FPL 66096*, 2-propiltio-D- $\beta, \gamma$ -difluorometileno ATP; *IP<sub>3</sub>*, inositol 1,4,5-trifosfato;  *$\alpha, \beta$ -meATP*,  $\alpha, \beta$ -metileno ATP;  *$\beta, \gamma$ -meATP*,  $\beta, \gamma$ -metileno ATP; *2MeSADP*, 2-metiltio ADP; *2MeSATP*, 2-metiltio ATP; *PPADS*, ácido piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico; *NF023*, 3'-uréia simétrica do ácido 8-(benzamido) naftaleno-1,3,5-trisulfônico; *NF279*, 8,8'-(carbonilbis (imino-4,1-fenilenocarbonilimino-4,1-fenilenocarbonilimino)) bis(ácido 1,3,5-naftalenotrisulfônico); *KN-62*, 1-{n,O-bis(5-isoquinolinosulfonil)-N-metil-L-tirosil}-4-fenilpiperazina; *UTP $\gamma$ S*, uridina 5'-O-(3-tiotrifosfato).

Apesar destas ações, suramina produziu um efeito facilitatório sobre as respostas sinápticas registradas em fatias hipocâmpais (WIERASZKO, 1995), utilizando mecanismos que também participam na indução e manutenção da LTP.

Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que a suramina prejudica as respostas condicionadas de medo em ratos (ZOU et al., 1998). Tal efeito provavelmente se deve ao fato de que a suramina pode atuar como um antagonista de receptores NMDA (ONG et al., 1997). A dissociação observada entre os efeitos promovidos pela suramina sobre a LTP e nos estudos comportamentais acima referidos, provavelmente se deve ao amplo espectro de efeitos biológicos promovidos por esta droga.

Após a liberação no espaço extracelular e a ativação de receptores específicos, os nucleotídeos da adenina podem ser metabolizados pela ação de ecto-enzimas que fazem a conversão destes nucleotídeos até adenosina (ZIMMERMANN, 1996). Nosso laboratório tem estudado que a degradação do ATP extracelular envolve um conjunto de enzimas ligadas à superfície celular, que constituem a via das ectonucleotidases, da qual podem participar a ecto-ATPase (EC 3.6.1.3), a ecto-apirase (EC 3.6.1.5) e a ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (BATTASTINI et al., 1991,1995). A hidrólise extracelular de ATP por esta via resulta na formação de ADP, AMP e adenosina. Esta degradação pode inativar a sinalização mediada pelo ATP através dos receptores P2, contribuindo para a sinalização mediada pela adenosina através dos receptores P1.

## I.5. ADENOSINA E SEUS RECEPTORES

A adenosina é um nucleosídeo que produz diversos efeitos fisiológicos no sistema nervoso central. As primeiras evidências de que a adenosina apresentava atividade fisiológica foram obtidas através dos estudos de DRURY & SZENT-GYORGYI (1929), que observaram significativos efeitos da adenosina no coração.

Desde então, tem se tornado claro que a adenosina pode exercer vários efeitos através da interação com receptores específicos de superfície celular (SATTIN & RALL, 1970; BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997). No sistema nervoso central, a adenosina altera os níveis de AMP cíclico (SATTIN & RALL, 1970), inibe a atividade sináptica e neuronal (DUNWIDDIE & HOFFER, 1980) e modula o fluxo sanguíneo cerebral (BERNE et al., 1981). Sua liberação durante a isquemia cerebral conduziu à hipótese de que a adenosina age como um neuroprotetor, prevenindo a excitotoxicidade e danos isquêmicos (DRAGUNOW & FAULL, 1988). Com o avanço nos estudos sobre o tema, evidências têm apontado para o envolvimento da adenosina na epilepsia (ZHANG et al., 1993; GLASS et al., 1996), no pré-condicionamento da isquemia cerebral (HEURTEAUX et al., 1995) e nas respostas imunes no cérebro (SAJJADI et al., 1996). Entretanto, o preciso mecanismo através do qual as células liberam adenosina e os eventos implicados no papel modulatório deste composto necessitam ser elucidados.

A adenosina pode ser formada nos espaços intracelular e extracelular. Entretanto, a adenosina não é considerada um neurotransmissor, pois não há evidências de que ela seja armazenada em vesículas sinápticas (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997). Apesar disto, a adenosina está presente no espaço extracelular e é liberada das células neurais por vários tipos de estímulos.

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



por vias que metabolizam a adenosina intracelular: a fosforilação até 5'-AMP catalisada por uma adenosina quinase e a desaminação até inosina catalisada pela adenosina desaminase (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997)

A adenosina também pode ser sintetizada e degradada no espaço extracelular. O ATP liberado pode originar adenosina pela ação de ecto-enzimas: ecto-ATPases, ecto-apyrases e ecto-5'-nucleotidases (BATTASTINI et al., 1995; PLESNER, 1995; DUNWIDDIE et al., 1997; ZIMMERMAN et al., 1998). Com relação à degradação da adenosina, foi identificada a presença de ecto-adenosina desaminases (FRANCO et al., 1997). A adenosina também pode ser removida do espaço extracelular através da sua captação pelo sistema transportador de nucleosídeos (RATHBONE et al., 1999).

Foi estimado que a concentração basal de adenosina no espaço extracelular está na faixa de nanomolar (DUNWIDDIE & DIAO, 1994). Entretanto, diversas situações podem conduzir à significativa elevação da sua concentração extracelular. A liberação de adenosina dos tecidos cerebrais pode ocorrer em resposta à hipóxia (LLOYD et al., 1993), à isquemia (PEDATA et al., 1993) e à estimulação elétrica (LLOYD et al., 1993; CUNHA et al., 1996). A adenosina é também liberada por estimulação nervosa não-patológica, pela ativação dos receptores NMDA (MANZONI et al., 1994).

Uma das evidências que ajudou a identificar a adenosina como um modulador da atividade celular foi a identificação dos subtipos de receptor para adenosina. Os receptores de adenosina (purinoreceptores P1) estão divididos em quatro subtipos, que foram identificados e clonados: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> e pertencem à família de receptores acoplados às proteínas G (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997).

Os receptores A<sub>1</sub> são os mais abundantes receptores de adenosina em sistema nervoso central, têm os mais proeminentes efeitos sobre a atividade neuronal e ligam a adenosina com a mais alta afinidade. Os receptores A<sub>1</sub> estão localizados em todo o

cérebro, particularmente em altas concentrações no hipocampo, córtex, cerebelo e tálamo (STEHLE et al., 1992). Os receptores  $A_1$ , via proteína  $G_i$ , inibem a atividade da adenilato ciclase e a conseqüente formação de AMP cíclico. Este segundo mensageiro pode ativar proteínas quinases dependentes de AMP cíclico que catalisam a fosforilação de várias proteínas, regulando a atividade celular e a expressão gênica. Entre as ações da adenosina, uma das mais significativas é a capacidade de inibir a liberação de diversos neurotransmissores, tais como, dopamina, noradrenalina, glutamato e acetilcolina (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997). Na maioria dos sistemas acredita-se que este efeito seja mediado pelos receptores  $A_1$  pré-sinápticos .

Embora os receptores  $A_1$  controlem a maioria dos efeitos fisiológicos da adenosina no cérebro, os receptores  $A_2$  desempenham um importante papel modulatório em algumas áreas do cérebro. Os receptores  $A_2$  estimulam a atividade da adenilato ciclase e aumentam a formação do AMP cíclico (PARKINSON & FREDHOLM, 1990).

Os receptores  $A_2$  têm sido divididos em  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ , conforme a afinidade dos agonistas, apesar destes subtipos já estarem clonados (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Os receptores  $A_{2A}$  ligam a adenosina com alta afinidade e estão concentrados no caudato-putamen, nucleus accumbens, tubérculo olfatório, cortex cerebral e hipocampo (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997). Os efeitos fisiológicos destes receptores não estão bem esclarecidos como os dos receptores  $A_1$ . Os receptores  $A_{2B}$  produzem um aumento nos níveis de AMP cíclico em fatias cerebrais com altas concentrações de adenosina (LUPICA et al., 1990). Com base na afinidade extremamente baixa dos receptores  $A_{2B}$  para adenosina (BRUNS et al., 1986), tem sido postulado que estes receptores possam mediar efeitos neuroprotetores quando os níveis extracelulares de adenosina encontram-se excepcionalmente altos.

Os receptores  $A_3$  foram recentemente caracterizados e seus efeitos na fisiologia neuronal são pouco conhecidos. Os agonistas de receptores  $A_3$  estimulam a formação de fosfoinositóis de membrana em fatias de hipocampo e estriado, sugerindo que eles podem ativar a fosfolipase C (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997).

Considerando que a adenosina é um nucleosídeo endógeno que, por ativar receptores de membrana, exerce um importante papel na regulação da excitabilidade neuronal, foi proposto que a adenosina pode modular a plasticidade sináptica (DE MENDONÇA & RIBEIRO, 1997). Existe um particular interesse nas formas de plasticidade que envolvem mudanças na atividade sináptica, tais como a potenciação de longa-duração, desde que estes mecanismos podem estar envolvidos na base neurofisiológica do aprendizado e da memória. Estudos demonstraram que o análogo da adenosina, 2-cloroadenosina (CADO), produziu uma diminuição na LTP em células granulares do giro dentado e na área CA1 de hipocampo de ratos (DOLPHIN, 1983; DE MENDONÇA & RIBEIRO, 1990). Os efeitos inibitórios da adenosina sobre a LTP são mediados pela ativação de receptores  $A_1$ , sendo que este efeito é observado durante ou poucos segundos após a estimulação de alta frequência, sugerindo que a adenosina afeta a indução da LTP (DE MENDONÇA & RIBEIRO, 1997).

A adenosina endógena é capaz de modular a LTP, pois este fenômeno foi facilitado na presença de um antagonista seletivo de receptor  $A_1$ , 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). Por sua vez, a LTP pode ser aumentada na presença de uma agonista seletivo de receptor  $A_{2A}$ , hidrocloreto de 2-p-(2-carboxietil)fenetilamino-5'-N-etilcarboxamidoadenosina (CGS 21680), sugerindo que a ativação destes receptores pode ter efeitos facilitatórios sobre a

LTP (DE MENDONÇA & RIBEIRO, 1994). Além disso, tem sido demonstrado que a ativação seletiva de receptores  $A_1$  em hipocampo pode prejudicar a performance na retenção de uma resposta, influenciando o processamento da memória e aprendizagem (NORMILE & BARRACO, 1991).

Devido à sua ação neuromoduladora, a adenosina tem sido considerada um anti-convulsivante endógeno. MAITRE et al. (1974) primeiramente relataram que a adenosina administrada intraperitonealmente protegia contra crises audiogênicas em camundongos geneticamente suscetíveis. As ações anti-convulsivantes de análogos da adenosina também foram observados quando administrados na amígdala, hipocampo e núcleo caudado após kindling (BARRACO et al., 1984; ROSEN & BERMAN, 1987).

Em 1985, TURSKI et al. demonstraram que o análogo 2-cloroadenosina (CADO) bloqueava o surgimento de crises induzidas por pilocarpina e prevenia a ocorrência de danos cerebrais em ratos, sendo estes efeitos provavelmente mediados pelos receptores  $A_1$ . Crises únicas ou repetidas induzidas por PTZ estão associadas a um aumento de receptores  $A_1$  no córtex, hipocampo e cerebelo (ANGELATOU et al., 1990). Além disso, a afinidade dos receptores  $A_1$  a um ligante específico, CHA, está aumentada no hipocampo de ratos após kindling (SIMONATO et al., 1994). O antagonista de receptor  $A_1$ , 8-CPT, produziu estado epiléptico em ratos ao ser administrado sistemicamente, mas seus agonistas CPA ou CHA, evitaram o desenvolvimento do estado epiléptico (YOUNG & DRAGUNOW, 1994). Entretanto, uma menor densidade de receptores  $A_1$  foi encontrada em ratos com crise de ausência induzida geneticamente (EKONOMOU et al., 1998).

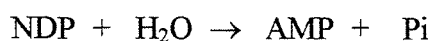
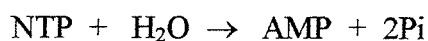
Estudos mais recentes têm demonstrado que a administração periférica de um agonista de receptor  $A_{2A}$ , CGS 21680, protege o hipocampo contra a excitotoxicidade induzida por ácido caínico (JONES et al., 1998).

Estudos realizados em humanos verificaram que os níveis de adenosina aumentam significativamente (30 vezes) durante crises convulsivas em pacientes com epilepsia de lobo temporal (DURING & SPENCER, 1992). Além disso, uma diminuição na afinidade de receptores A<sub>1</sub> foi observada em córtex temporal de humanos com epilepsia (GLASS et al., 1996). Evidências sugerem que uma diminuição significativa nos níveis de adenosina ou alterações no sistema adenosinérgico podem desempenhar um papel fundamental na etiologia do estado epilético (YOUNG & DRAGUNOW, 1994).

#### I.6. ATP DIFOSFOIDROLASE (APIRASE, EC 3.6.1.5)

A sinalização mediada pelos nucleotídeos requer mecanismos efetivos para a inativação do seu sinal. Devido à alta densidade de carga, os nucleotídeos não podem passar as membranas e a captação celular de nucleotídeos não foi ainda demonstrada. Entretanto, existe um conjunto de enzimas ligadas à superfície celular capazes de hidrolisar e inativar a sinalização mediada pelos nucleotídeos extracelulares. Estas enzimas são chamadas de ectonucleotidases. Dentro do grupo das ectonucleotidases, podemos destacar a presença da ecto-ATP difosfoidrolase ou ecto-apirase (EC 3.6.1.5), da ecto-ATPase (EC 3.6.1.3) e da ecto-5'-nucleotidase (3.1.3.5).

O termo apirase foi utilizado pela primeira vez em 1945 por MEYERHOF para descrever um grupo de enzimas envolvidas na hidrólise de nucleosídeos trifosfatados e difosfatados a seus respectivos nucleosídeos monofosfatados e fosfato inorgânico:



Inicialmente, a maioria dos estudos sobre apirases apresentava como objetivo principal o conhecimento da distribuição desta atividade enzimática, bem como de suas

características cinéticas. Desde então, várias apirases têm sido descritas na literatura, principalmente nas últimas décadas. Esta enzima apresenta uma ampla distribuição, sendo encontrada em vegetais (TRAVERSO-CORI et al., 1962; TOGNOLLI & MARRÉ, 1981; VALENZUELA et al., 1989; KETTLUN et al., 1992), invertebrados (RIBEIRO & GARCIA, 1981; SARKIS et al., 1986, RIBEIRO et al., 1990, 1991; VALENZUELA et al., 1998) e em mamíferos (FRASSETTO et al., 1993; PLESNER, 1995; BATTASTINI et al., 1995; MARCUS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 1997), podendo apresentar diferentes papéis fisiológicos, de acordo com sua localização.

As ecto-apirases, juntamente com as ecto-ATPases, constituem uma classe de enzimas chamadas de ATPases do tipo E, que possuem as seguintes características: 1) um sítio de hidrólise de nucleotídeos voltado para o espaço extracelular, (2) subunidade catalítica glicosilada, (3) atividade dependente de cátions divalentes (principalmente cálcio e/ou magnésio), (4) insensibilidade a inibidores específicos de ATPases do tipo P, F, V e (5) habilidade para hidrolisar uma ampla variedade de nucleotídeos púricos e pirimídicos tri e difosfatados (PLESNER, 1995; ZIMMERMANN et al., 1998).

Progressos consideráveis têm sido feitos com relação à estrutura molecular das ectonucleotidases. Diversas seqüências de peptídeos derivados de uma apirase purificada de placenta humana (CHRISTOFORIDIS et al., 1995) demonstraram que esta proteína de 82kDa era idêntica a um antígeno de ativação linfóide chamado CD39, que havia sido previamente clonado e seqüenciado (MALISZEWSKI et al., 1994). Além disso, estudos demonstraram que uma apirase obtida de batata *Solanum tuberosum* (HANDA & GUIDOTTI, 1996) apresentava uma seqüência de aminoácidos homóloga a CD39 e a diversas outras nucleosídeo trifosfatases recentemente identificadas, como a guanosina difosfatase de levedura (ABEIJON et al., 1993) e a NTPase de *Toxoplasma gondii* (ASAI et al., 1995). O antígeno CD39 é expresso em

linfócitos ativados, bem como no endotélio, macrófagos e células dendríticas (KANSAS et al., 1991). A identidade da CD39 e ATP difosfohidrolase foi confirmada por estudos demonstrando que a expressão da CD39 humana em células COS-7 promoveu um aumento na atividade ATPásica e ADPásica dependente de cálcio e magnésio (WANG E GUIDOTTI, 1996; KACZMAREK et al., 1996). Além disso, CD39 recombinante de humanos e camundongos inibiu a agregação plaquetária induzida por ADP (KACZMAREK et al., 1996; MARCUS et al., 1997).

Estudos posteriores isolaram o DNA complementar da apirase de cérebro de ratos e camundongos, cuja expressão em células COS-7 resultou na produção de uma proteína glicosilada com peso molecular em torno de 70–80 kDa e com atividade ATPásica e ADPásica (WANG et al., 1997). Esta proteína está presente em neurônios e astrócitos de ratos em cultura primária e a análise do genoma revelou a presença de somente um gene para a apirase (WANG et al., 1997).

A clonagem e o mapeamento de um gene isolado a partir de tecido humano, chamado CD39L1 (CD39-like-1) (CHADWICK & FRISCHAUF, 1997), demonstrou alta similaridade na seqüência de aminoácidos com uma ecto-ATPase de músculo liso de galinha e com a CD39 de humanos (KIRLEY, 1997; MALISZEWSKI et al., 1994). Entretanto, a expressão do clone de DNA complementar não foi realizada, no sentido de analisar as características bioquímicas da enzima e confirmar que o gene isolado realmente codifica uma ecto-ATPase humana (CHADWICK & FRISCHAUF, 1997).

A ecto-apirase e a ecto-ATPase de vertebrados compartilham homologia de seqüência com certas nucleotidases de plantas, protozoários e leveduras. Algumas das enzimas estão ligadas à membrana, outras são solúveis ou somente a estrutura do seu DNA complementar é conhecida. HANDA E GUIDOTTI (1996) identificaram quatro regiões que são bem conservadas entre as diversas seqüências, as quais foram chamadas

de “regiões conservadas da apirase”, que presumivelmente participam na formação do sítio catalítico destas enzimas. Além disso, KEGEL et al. (1997) demonstraram que uma ecto-ATPase e uma ecto-apirase são expressas no cérebro de ratos.

SMITH & KIRLEY (1998) clonaram e sequenciaram um gene para uma ATPase do tipo E (HB6) presente em cérebro humano, sendo que a proteína expressa em cultura de células comporta-se como uma apirase.

Estudos analisando a seqüência da ATP difosfohidrolase demonstram que se trata de uma proteína integral de membrana com dois domínios transmembranas (nas porções terminais da proteína), pequenos segmentos citoplasmáticos NH<sub>2</sub>-terminal e COOH-terminal, e um grande domínio extracelular, que provavelmente contém o sítio de ligação e hidrólise dos nucleotídeos (MALISZEWSKI et al., 1994; WANG & GUIDOTTI, 1996). Recentes estudos demonstraram que a ecto-apirase/CD39 é uma proteína tetramérica não-covalente e que os domínios transmembrana da enzima regulam a oligomerização da mesma (WANG et al., 1998). Estes autores propuseram que a inibição da ecto-apirase promovida por detergentes é causada pela dissociação dos tetrâmeros em monômeros (WANG et al., 1998).

A ecto-apirase de cérebro humano é uma proteína altamente glicosilada com sete sítios potenciais de glicosilação, sugerindo que a glicosilação é necessária para a oligomerização e para a regulação da atividade de hidrólise de nucleotídeos (SMITH & KIRLEY, 1999). Na porção C-terminal da proteína, é possível identificar possíveis sítios de fosforilação para a ação de proteína quinase C e proteína quinase dependente de AMP cíclico, sugerindo que as apirases podem ser moduladas por fosforilação citoplasmática e podem estar envolvidas nas vias de transdução de sinal através da membrana (SMITH & KIRLEY, 1998). Recentemente, nosso laboratório tem apresentado evidências de que a ecto-apirase de cérebro de ratos é uma proteína



fosforilada, sugerindo que a fosforilação poderia ser um dos mecanismos envolvidos na modulação desta enzima em diferentes condições fisiológicas e patológicas (WINK, 1999).

Muitos trabalhos têm sido dedicados ao estudo das ectonucleotidases solúveis ou associadas à membrana em sistema nervoso central (TODOROV et al., 1997; BATTASTINI et al., 1991, 1995), desde que o ATP extracelular tem sido considerado um neurotransmissor excitatório (EDWARDS et al., 1992; EVANS et al., 1992) e diversas classes de purinoreceptores têm sido descobertas (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Estas enzimas poderiam ter um papel essencial na regulação das concentrações e da disponibilidade de ligantes (ATP, ADP, AMP e adenosina) na fenda sináptica para estes receptores. A desfosforilação do nucleotídeo pela ação das ectonucleotidases, poderia inativar a sua ação neurotransmissora de modo direto, através da conversão de um agonista (ATP) em um composto inativo (ADP ou AMP), ou de modo indireto, tal como a conversão de um agonista (ATP) em um composto (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).

Tem sido identificado que a ecto-apirase/CD39 é expressa em sinaptossomas isolados bem como em cultura de neurônios primários de córtex cerebral e astrócitos (BATTASTINI et al., 1991; WANG et al., 1997). Estudos imunohistoquímicos têm demonstrado que a ecto-apirase é amplamente distribuída no cérebro de ratos, encontrando-se presente em neurônios de córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, bem como em células gliais e células endoteliais (WANG & GUIDOTTI, 1998).

As ATPases do tipo E estão também relacionadas a uma molécula de adesão celular neuronal (NCAM) em sistema nervoso central, sugerindo o possível

envolvimento de ecto-enzimas nas funções de adesão celular (DZHANDZHUGAZYAN & BOCK, 1997). A NCAM desempenha um papel importante no desenvolvimento e regeneração neuronal, plasticidade sináptica e invasão tumoral.

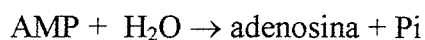
Diversos estudos têm demonstrado a participação das ectonucleotidases em uma série de condições fisiológicas e patológicas. NAGY e cols.(1990) demonstraram uma significativa diminuição na atividade ecto-ATPásica de córtex temporal de indivíduos epiléticos. Entretanto, um substancial aumento desta atividade foi observado na parte posterior do hipocampo destes pacientes. É interessante observar que o gene para CD39 de humanos (10q23.1 to q24.1) (MALISZEWSKI et al., 1994) está co-localizado com o gene envolvido na epilepsia parcial humana com sintomas audiogênicos (10q22 to 24) (OTTMAN et al., 1995). Embora existam muitos outros genes na região que coincidem com CD39, a ecto-apirase está provavelmente envolvida na epilepsia, uma vez que significativas alterações foram observadas nestas atividades em pacientes epiléticos (NAGY et al., 1990). Trabalhos mais recentes têm demonstrado uma redução na ecto-ATPase de córtex cerebral de ratos durante prolongado estado epilético induzido pela administração seqüencial de lítio e pilocarpina (NAGY et al., 1997).

Além das alterações observadas na epilepsia, as ectonucleotidases podem ter suas atividades alteradas em outras condições patológicas. A expressão da ecto-apirase/CD39 encontra-se aumentada em melanomas diferenciados de humanos, apresentando uma gradual diminuição com progressão do tumor (DZHANDZHUGAZYAN et al., 1998). Nosso laboratório tem relatado alterações destas atividades enzimáticas em diferentes condições patológicas. Demonstrou-se que ratos submetidos a episódios isquêmicos isolados ou duplos apresentam significativas alterações nas atividades da ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas hipocampais e plaquetas de ratos (FRASSETTO, 1998; SCHETINGER et al., 1998). Nossos resultados, em sistema

nervoso central, foram posteriormente confirmados por estudos histoquímicos e análise de RNA mensageiro, demonstrando um seletivo aumento nas atividades enzimáticas em áreas injuriadas do hipocampo (BRAUN et al., 1998). Além disso, nosso laboratório também descreveu o efeito da desnutrição nas enzimas de sinaptossomas de córtex cerebral de ratos (ROCHA et al., 1990), o efeito da fenilalanina e seus metabólitos (WYSE et al., 1994), bem como o efeito de metais pesados como o cloreto de mercúrio (OLIVEIRA et al., 1994), o acetato de cádmio (BARCELLOS et al., 1994) e o cloreto de alumínio (SCHETINGER et al., 1995).

#### 1.7. 5'-NUCLEOTIDASE (EC 3.1.3.5)

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). A ecto-5'-nucleotidase é uma enzima ancorada à membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol (GPI). O ancoramento da enzima pode ser clivado por uma fosfolipase C específica para GPI, dando origem às formas solúveis da enzima. Embora uma atividade 5'-nucleotidásica esteja também associada com as estruturas de algumas organelas citoplasmáticas, trata-se de uma proteína diferente das 5'-nucleotidases solúveis intracelulares (ZIMMERMANN, 1992, 1996). A ecto-5'-nucleotidase encontra-se presente na maioria dos tecidos e sua principal função é a hidrólise de nucleosídeos monofosfatados extracelulares, tais como AMP, GMP ou UMP, a seus respectivos nucleosídeos:



A estrutura primária da ecto-5'-nucleotidase foi determinada em fígado de bovinos e ratos (SUZUKI et al., 1993; MISUMI et al., 1990), placenta de humanos

(MISUMI et al., 1990a), rim de camundongos (RESTA et al., 1993) e órgão elétrico de *Torpedo marmorata* (GRONDAL & ZIMMERMANN, 1987). Esta enzima apresenta uma massa molecular aparente de 62 a 74 kDa, apresentando-se como um dímero com pontes dissulfeto entre as cadeias (ZIMMERMANN, 1996). Geralmente, AMP é o nucleosídeo hidrolisado com maior eficiência, sendo que os valores de Km estão na faixa de micromolar. ATP e ADP são inibidores competitivos da 5'-nucleotidase com valores de Ki também na faixa de micromolar (ZIMMERMANN, 1996).

Em sistema nervoso central, 5'-nucleotidase está predominantemente associada à glia, mas várias evidências têm demonstrado esta atividade associada à 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., 1995). A enzima desempenha um papel crítico na diferenciação neurítica e na sobrevivência de células PC12 e células granulares de cerebelo de rato em cultura (HEILBRONN et al., 1995; HEILBRONN E ZIMMERMANN, 1995). Sua atividade encontra-se aumentada em astrócitos, células microgliais (BRAUN et al., 1997) e em sinaptossomas de hipocampo após isquemia focal e reperfusão (SCHETINGER et al., 1998). Além disso, estudos têm demonstrado que a ecto-5'-nucleotidase, CD73, tem características de uma molécula de adesão (AIRAS et al., 1995).

A investigação da distribuição da 5'-nucleotidase em pacientes com epilepsia de lobo temporal demonstrou que a enzima encontra-se significativamente aumentada no giro denteado e nas terminações das fibras musgosas nas regiões CA4 e CA3, quando comparada com a atividade em hipocampo de humanos normais (LIE et al., 1999). Recentemente, a presença da 5'-nucleotidase foi observada nas sinapses de fibras musgosas de giro denteado de ratos após injeção sistêmica de cainato e indução de

kindling elétrico (SCHOEN et al., 1999), sendo menos detectada no grupo controle. Isto sugere que a enzima poderia ter uma função na interação célula-célula durante o processo de brotamento das fibras ou contribuindo para uma diminuição da atividade sináptica pela produção do neuromodulador inibitório adenosina (SCHOEN et al., 1999).

A associação da ecto-apirase e da 5'-nucleotidase em uma cadeia enzimática se constitui 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 I.1).

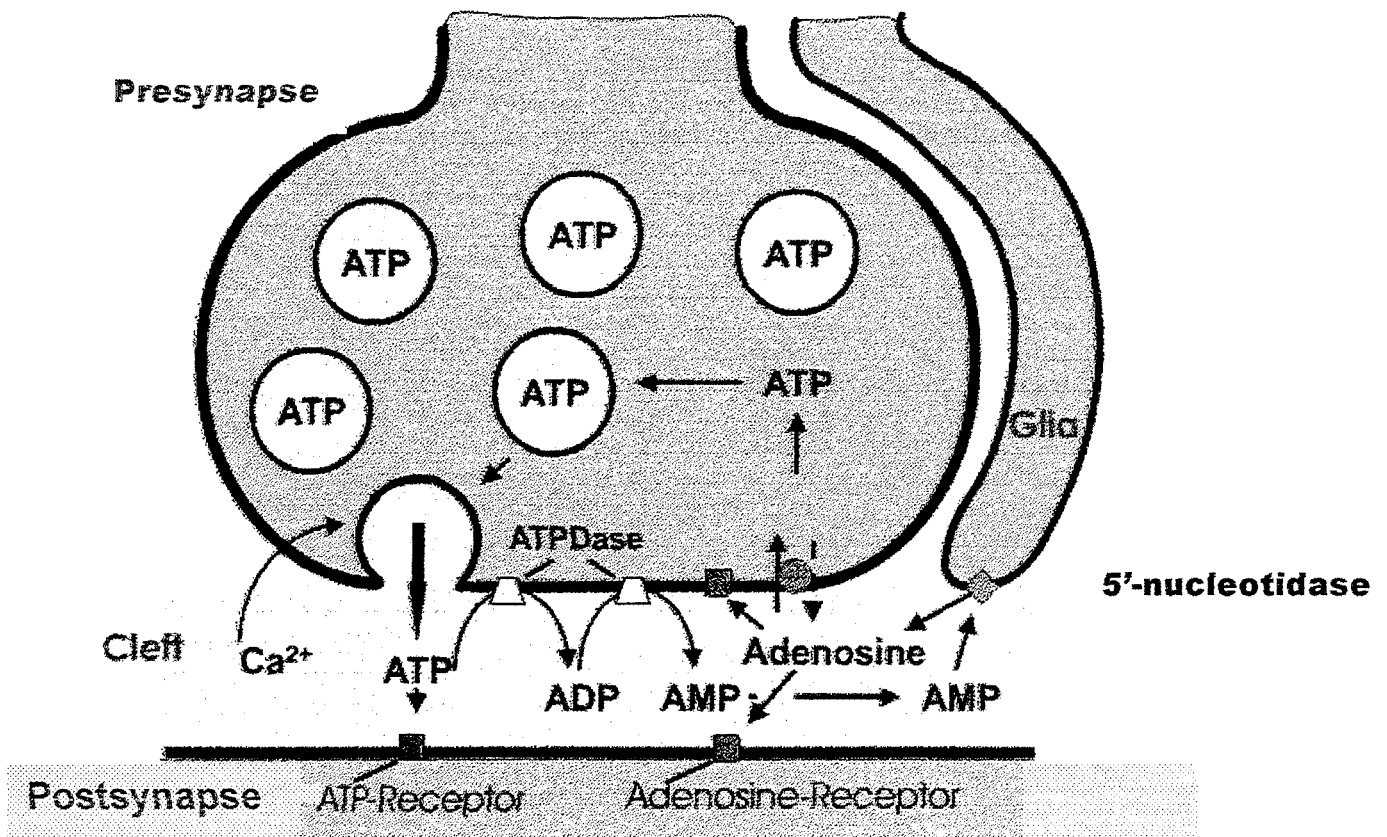


Figura I.1: Funções do ATP liberado em um terminal nervoso e sua hidrólise até adenosina no espaço extracelular. (Adaptado de [www.biozentrum.uni-frankfurt.de/prof/zimmermann](http://www.biozentrum.uni-frankfurt.de/prof/zimmermann)).

O neurotransmissor ATP é liberado na fenda sináptica, podendo ligar-se em receptores específicos do tipo P2. Após exercer seus efeitos, sua ação pode ser inativada por um conjunto de ecto-enzimas que constituem a via das ectonucleotidases. Fazem parte desta via a ecto-ATPase, a ecto-ATP difosfohidrolase e a ecto-5'-nucleotidase, que metabolizam o ATP até adenosina. Por sua vez, a adenosina também exerce seus efeitos através de um conjunto de receptores do tipo P1 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ ). Após exercer suas ações, a adenosina pode ser metabolizada extracelularmente ou recaptada por sistemas de transporte, podendo ser reutilizada na síntese de novos nucleotídeos.

## 1.8. OBJETIVOS

O objetivo principal desta tese foi estudar a participação de uma cadeia de ectoenzimas (ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase) envolvidas na hidrólise de ATP até adenosina em condições fisiológicas e patológicas capazes de induzir plasticidade sináptica, tais como memória e epilepsia.

Considerando que, (i) o ATP é um importante neurotransmissor excitatório, sendo responsável por inúmeros eventos celulares produzidos pela ativação de seus receptores; (ii) a adenosina é um neuromodulador com diversas funções no sistema nervoso central, incluindo um papel neuroprotetor e o envolvimento em fenômenos fisiológicos e patológicos, tais como memória e epilepsia; (iii) a ação conjugada da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase pode controlar os níveis de ATP e adenosina na fenda sináptica e, conseqüentemente, modular as respostas purinérgicas em diferentes condições, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

1. Estudar o efeito da sessão de treino e teste em uma tarefa de esquila inibitória sobre a atividade da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo de ratos.
2. Verificar se a sessão de treino em uma tarefa de esquila inibitória altera a atividade da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de diferentes estruturas cerebrais, como córtex entorrinal e córtex parietal.
3. Estudar o efeito "in vitro" da suramina, um antagonista de receptores P2, sobre a atividade da ATP difosfohidrolase em sinaptossomas hipocámpais de ratos e sobre o aprendizado de esquila inibitória em ratos.

4. Estudar o efeito da epilepsia induzida pelos modelos da pilocarpina e ácido caínico sobre as atividades da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral de ratos.

5. Estudar o efeito do modelo de Kindling e da administração aguda de PTZ sobre a atividade da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral de ratos.



## **II. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

**II.1. CAPÍTULO 1** - BONAN, C.D.; DIAS, M.M.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Inhibitory Avoidance Learning inhibits ectonucleotidases activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. **Neurochemical Research** 23 (7), 979-984, 1998.

## Inhibitory Avoidance Learning Inhibits Ectonucleotidases Activities in Hippocampal Synaptosomes of Adult Rats

Carla Denise Bonan,<sup>1</sup> Marcelo Medeiros Dias,<sup>1</sup> Ana Maria Oliveira Battastini,<sup>1</sup> Renato Dutra Dias,<sup>1</sup> and João José Freitas Sarkis<sup>1,2</sup>

(Accepted November 17, 1997)

Several lines of evidence indicate that ATP may play an important role in Long-Term Potentiation. In this investigation we evaluated the effect of a memory task (step-down inhibitory avoidance) on the synaptosomal ecto-enzymes (ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase) involved in the degradation of ATP to adenosine. After the training session, a decrease in the ATPase (40%) and ADPase (29%) activities of ATP diphosphohydrolase as well as was a decrease in 5'-nucleotidase activity (31%) was observed in hippocampal synaptosomes of rats trained and killed immediately after training. In synaptosomes of rats killed 30 minutes after training, a decrease in ATPase activity (28%) was observed. In the test session, no significant changes were observed in the enzyme activities studied. These results provide new information about the activity of ecto-enzymes involved in nucleotide degradation and their possible participation in mechanisms of acquisition and modulation of memory processing.

**KEY WORDS:** ATP diphosphohydrolase; 5'-nucleotidase; extracellular ATP; long-term potentiation; LTP; memory.

### INTRODUCTION

It has been proposed that both ATP and adenosine modulate synaptic transmission in the mammalian brain (1). ATP is known to be stored with acetylcholine in synaptic vesicles and, by analogy with chromaffin granules, it may also be stored in central noradrenergic vesicles (2). ATP can also be released from the glutamatergic presynaptic terminals of the Schaffer collaterals in the hippocampus in a calcium-dependent manner (3) and may mediate fast excitatory transmission (4).

It has been demonstrated that exogenous ATP at low concentrations (nM range) is able to induce long-lasting enhancement of the population spike recorded from mouse hippocampal slices (5). This enhancement of synaptic strength is called Long-Term Potentiation (LTP) (6,7). Long-Term Potentiation is a synapse-specific enhancement of excitatory postsynaptic responses and there is growing evidence that this form of synaptic plasticity underlies some forms of memory (8,9). LTP shares several properties with memory: rapid induction (acquisition), great lability in the early postinduction (consolidation) period, stimulus specificity, maintenance for very long periods in the absence of stimulation, and ready expression in response to reiteration of the original stimulus (8,10). Since LTP and memory share several pharmacologic similarities, some correlations between these two sets of studies could be established (10).

Extracellular ATP may play a role in the modulation of synaptic efficiency (11) through several possible

<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> To whom to address reprint requests. João José Freitas Sarkis, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Fax: +55(51)316-5535; e-mail address: Sarkis@plug-in.com.br.

mechanisms. ATP may be used by protein kinases located on the neuronal cell surface (12–14). The participation of ATP in mechanisms of extracellular protein phosphorylation has been suggested as a signal for long-lasting changes in synaptic activity (13). Furthermore, extracellular ATP can be hydrolyzed by a chain of ectonucleotidases (15). We have demonstrated that the neurotransmitter ATP is hydrolyzed to adenosine in the synaptic cleft of the central and peripheral nervous system (16–18) by the conjugate action of an ATP diphosphohydrolase (ATPDase, apyrase, EC 3.6.1.5) and 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5). Recently, we have reported the solubilization and characterization of ATP diphosphohydrolase from rat brain synaptic plasma membranes (19). This enzyme activity is activated by either  $\text{Ca}^{+2}$  or  $\text{Mg}^{+2}$  and it is not inhibited by known inhibitors of various intracellular ATPases, such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ -ATPase and mitochondrial ATPases (16). The presence of ATP diphosphohydrolase as an ectoenzyme in synaptosomes is important because only this enzyme is able to hydrolyze adenine triphosphonucleoside (ATP) to its equivalent monophosphonucleoside (AMP) and inorganic phosphate. Then, AMP can produce the nucleoside adenosine by the action of a 5'-nucleotidase. 5'-nucleotidase is an enzyme able to catalyze the hydrolysis of nucleosides 5'-monophosphates, being AMP the nucleoside that is hydrolyzed with the highest efficiency. ATP and ADP are competitive inhibitors of 5'-nucleotidase with the  $K_i$  values in the low micromolar range or even below that. It is very likely that in situ there is a considerable delay between the breakdown of ATP and AMP hydrolysis for the formation of adenosine (feed forward inhibition) (15). The adenosine formed can act on P1-purinoceptors and it is rapidly taken up via high-affinity uptake systems that are present in neurons and mediate the salvage of physiological purine for incorporation into cellular nucleotides. These two enzymes have a dual function in controlling the availability of ligands (ATP, ADP, AMP, adenosine) for either nucleotide or nucleoside receptors. They hydrolyze the nucleotide by controlling its life span and the duration and extent of receptor activation (15).

Because LTP is generally recognized as a possible mechanism of memory and evidences indicate that ATP may play an important role in LTP and in the modulation of synaptic transmission, a study of the possible effect of memory tasks on ATP-metabolizing enzymes would be interesting. Step-down inhibitory avoidance learning in the rat triggers biochemical events in the hippocampus that are necessary for the retention of this task. The events underlying memory formation of the inhibitory avoidance task in the hippocampus involve,

first, an activation of NMDA, AMPA and metabotropic glutamate receptors followed by changes in second messengers and biochemical cascades led by enhanced activity of protein kinases: Protein Kinase G (PKG); Protein Kinase C (PKC); calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and Protein Kinase A (PKA) (8,9). This task is usually acquired in one single trial, which makes it ideal for studying processes initiated by training, uncontaminated by prior or further trials, rehearsals, or retrievals (9).

Accordingly, the objective of the present investigation was to evaluate the influence of a memory task, step-down inhibitory avoidance on the enzyme activities (ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase) involved in the cleavage of ATP to adenosine in synaptosomal fractions from hippocampus of adult rats. With our results, we intend to provide a new information on the role of ATP and the enzymes involved in its degradation in mechanisms of acquisition and modulation of memory processing.

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

*Chemicals.* Nucleotides (ATP, ADP, AMP), HEPES, Trizma Base and EDTA were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sodium azide and sucrose were obtained from Merck (Darmstadt, FRG). Percoll was obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden) and was routinely filtered through millipore AP15 pre-filters to remove aggregated, incompletely coated particles. All other reagents were of analytical grade.

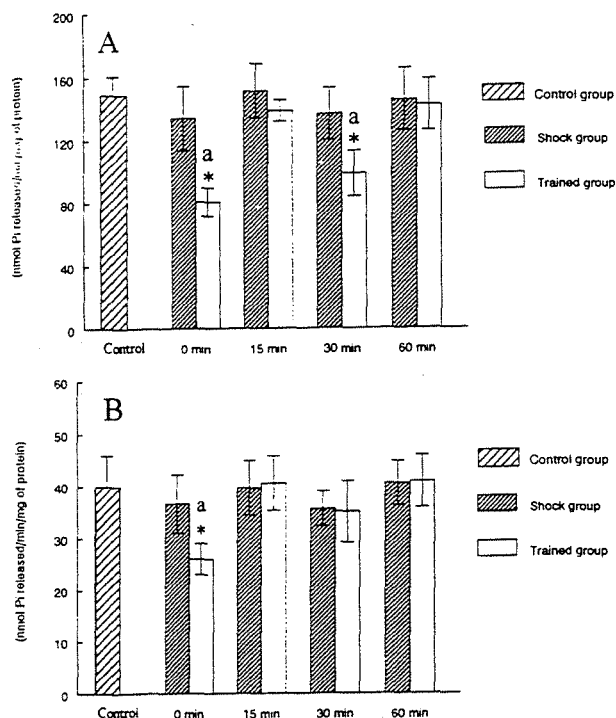
*Step-Down Inhibitory Avoidance Task.* Adult male Wistar rats (age, 70–90 days; weight, 240–280 g) were maintained at a constant temperature ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) in a 12 h light-dark cycle and had free access to food and water throughout the experiment. Animals were trained and tested in a step-down inhibitory avoidance task (20,21) in a 50 cm wide, 25 cm high and 25 cm deep acrylic box whose floor was a series of parallel 1.2 mm-caliber bronze bars spaced 1.0 cm apart. The left end of the grid was occupied by a 7 cm wide, 5 cm high formica platform. Two separate experiments were carried out.

In the first experimental condition, we investigated the effect of training in a step-down inhibitory avoidance task on ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of rats. In the training session, the animals were gently placed on the platform facing the rear left corner. On stepping down they received a 0.5 mA, 2-s scrambled footshock and were then withdrawn from the floor. The rats were killed by decapitation at different times (0, 15, 30, and 60 minutes) after training and their hippocampi were removed. In order to examine the possibility that the footshock could alter the enzyme activities, rats (shock group) were placed directly on the grid and received a 0.5 mA, 2-s scrambled footshock, and were then withdrawn from the box. As described above, the rats also were killed at different times after the footshock and their hippocampi were removed.

In the second experimental condition, we examined the effect of the test session in a step-down inhibitory avoidance task on enzyme activities studied in hippocampal synaptosomes of rats. In this exper-

## Inhibitory Avoidance Task Alters Extracellular ATP Degradation

979



**Fig. 1A and 1B.** Effect of training session in a step-down inhibitory avoidance task on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by the ATP diphosphohydrolase of synaptosomes of the rat hippocampus. Control represents normal rats; Shock group represents the animals that received only a footshock and were killed at different times (0, 15, 30, and 60 min) after this condition. Trained group represents the animals that were trained in a step-down inhibitory avoidance task and were killed at different times (0, 15, 30, and 60 min) after the training. Bars represent the means  $\pm$  SD of at least nine animals. (\*) Significantly different from control ( $p < 0.05$ ; Duncan Test). (a) Significantly different from the respective shock group ( $p < 0.05$ ; Duncan Test).

iment. rats were trained and the test session held 24 h later was similar to the training session in all aspects, except that the footshock was omitted. Test minus training step-down latency (to a ceiling of 180 s) was taken as a measure of retention of inhibitory avoidance (21). In order to examine if the footshock could alter the enzyme activities, two groups of rats received a 0.5 mA 2-s scrambled footshock in the training session and were withdrawn from the box. In the test session, 24 h later, one group of rats was left in their homecage (no exposed group) and the other group was just exposed to the box (exposed group) in order to observe if the simple exposure to the box could alter the enzyme activities studied. Immediately after the test session, the rats were killed and their hippocampi were removed.

**Subcellular Fractionation.** The hippocampi were gently homogenized in 5 volumes of an ice-cold medium consisting of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5.0 mM HEPES, pH 7.5, with a motor-driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described by Nagy and Delgado-Escueta (22). Briefly, 0.5 ml of the crude mitochondrial fraction was 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 washed at 15,000 g for 20 min with the same ice-cold medium to remove the contaminat 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 diphosphohydrolase activity was essentially as described by Battastini et al. (16) and contained 5.0 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose, 45 mM TRIS-HCl buffer, pH 8.0, and 5.0 mM sodium azide in a final volume of 200  $\mu$ l. The enzyme preparation (10–20  $\mu$ g protein) was added to the reaction mixture and preincubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to a final concentration of 1.0 mM and stopped by the addition of 200  $\mu$ l of 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 minutes and 100  $\mu$ l samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) by the method of Chan et al. (23).

The reaction medium used to assay 5'-nucleotidase activity contained 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM TRIS-HCl, pH 7.0 and 0.15 M sucrose in a final volume of 200  $\mu$ l (24). The enzyme preparation (10–20  $\mu$ g protein) was preincubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was initiated by the addition of AMP to a final concentration of 1.0 mM and stopped by the addition of 200  $\mu$ l of 10% trichloroacetic acid; 100  $\mu$ l samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) by the method of Chan et al. (23).

In both enzyme assays, incubation times and protein concentrations were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct non-enzymatic hydrolysis of the substrates. All samples were run in duplicate.

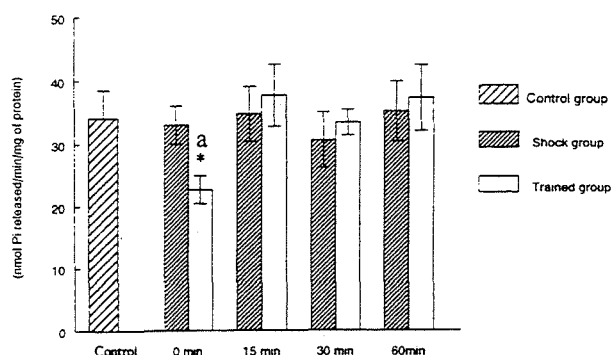
Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (25), using bovine serum albumin as standard.

**Statistical Analysis.** The data obtained for the enzyme activities are presented as mean  $\pm$  SD of a number of animals studied in each condition. The statistical analysis used in these experiments was two-way ANOVA and one-way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference in both statistical analysis used. The differences between training and test session were evaluated by the Wilcoxon test. The data are expressed as median (interquartile range).

## RESULTS

In the training session, for a step-down inhibitory avoidance task, we observed a 40% decrease in the ATPase activity of ATP diphosphohydrolase in hippocampal synaptosomes of rats. This inhibition was statistically significant ( $P < 0.05$ ) in synaptosomes of rats trained and killed immediately after the training session (0 min) when compared to the respective shock group (Fig. 1A). In hippocampal synaptosomes of rats trained and killed 30 minutes after the training session, a 28% decrease in ATPase activity was also observed compared to the respective shock group (Fig. 1A). In contrast, ATPase activity for rats trained and killed 15 and 60 minutes after the training session did not present significant changes.

The data obtained about the ADPase activity of ATP diphosphohydrolase showed a 29% decrease in this activity when the animals were trained and killed im-



**Fig. 2.** Effect of the training session in a step-down inhibitory avoidance task on 5'-nucleotidase activity in synaptosomes from the rat hippocampus. Control represents normal rats. Shock group represents the animals that received only a footshock and were killed at different times (0, 15, 30, and 60 min) after this condition. Trained group represents the animals that were trained in a step-down inhibitory avoidance task and were killed at different times (0, 15, 30, and 60 min) after the training. Bars represent the means  $\pm$  SD of at least nine animals. (\*) Significantly different from control ( $p < 0.05$ ; Duncan Test). (a) Significantly different from the respective shock group ( $p < 0.05$ ; Duncan Test).

mediately after the training session (0 min). This effect was considered significant ( $P < 0.05$ ) when compared to the respective shock group (Fig. 1B). This inhibition was probably reversed, because no significant changes in ADPase activity were observed in the other groups (15, 30, and 60 minutes) when compared to the control group and respective shock groups (Fig. 1B).

In the present study, we also determined the effect of the training session on 5'-nucleotidase activity since this enzyme, together with ATP diphosphohydrolase, participates in the complete hydrolysis of ATP to adenosine in the synaptic cleft. The effect observed on 5'-nucleotidase activity was similar to that obtained for ADPase activity of ATP diphosphohydrolase. The data reported in Fig. 2 show an 31% inhibition of 5'-nucleotidase activity in rats submitted to the training session and immediately killed (0 min) when compared to the respective shock group. The groups killed at 15, 30 and 60 minutes did not show significant changes in this enzyme activity (Fig. 2). It was observed a significant difference in ATPase, ADPase and AMPase activities between the groups (shock and trained groups) and between the different times (0, 15, 30, and 60 minutes) by two-way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences in the enzyme activities studied between the control group (normal rats) and the shock groups killed at the corresponding times.

We also evaluate the effect of the test session on the same enzyme activities. Our objective was to deter-

mine if the retrieval of a memory could promote changes in extracellular ATP degradation. The difference between the test and training session latency (to a ceiling of 180 s) to step-down, with the animal placing the 4 paws on the grid was considered to be a measure of retention of inhibitory avoidance. The median training latency for all animals ( $n = 8$ ) was 2.9 s, range 1.25 to 5.15 s. Median test latency for all animals ( $n = 8$ ) was 182.9 s, range 181.2 to 184 s. A significant difference between training and test latency was observed (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ). This result showed that animals acquired the information in the training session and there was a significant improvement of their performance in the test session, indicating the retrieval of the previously acquired memory. The test session in a step-down inhibitory avoidance task did not significantly change the ATP and ADP hydrolysis promoted by ATP diphosphohydrolase when compared to shock groups (exposed and non-exposed) and to the control group. Also, no significant changes in 5'-nucleotidase activity were observed when compared to the shock groups (exposed and non-exposed) and to the control group. There were no significant differences in the enzyme activities (ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase) between shock groups (exposed and non exposed) and the control group.

## DISCUSSION

In the present study, we investigated the enzyme activities involved in the cleavage of ATP to adenosine and their possible relation to mechanisms of memory. The extracellular catabolism of ATP constitutes a highly sophisticated pathway designed to control the rate, amount and timing of adenosine formation (26) and this nucleoside has been shown to modulate synaptic plasticity (27) by activating inhibitory  $A_1$  and facilitatory  $A_2$  adenosine receptors, which modulate synaptic transmission (28). Our results showed the occurrence of a significant inhibition of the enzyme activities involved in ATP hydrolysis to adenosine (ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase) immediately posttraining, which could promote a decrease in adenosine formation in the synaptic cleft. This effect may prevent an inhibitory action of adenosine mediated by  $A_1$  receptors on LTP and, consequently, on the mechanisms of memory acquisition. Furthermore, the significant effect observed immediately after the training session (0 min) probably did not involve protein synthesis, because there was no time enough for altered protein synthesis to occur. Therefore, it must be to some allosteric modulation of the enzyme

activities involved in the adenine nucleotides degradation or other possible mechanisms, like proteins phosphorylation. It has been showed that Ecto-ATPase of rat brain synaptosomes is largely inactivated in ATP-dependent process. This inhibitory effect observed on the synaptosomal Ecto-ATPase is likely mediated by phosphorylation of 90–95 KDa protein(s) associated with the external surface of the plasma membrane of synaptosomes (29).

Our results showed a significant decrease in ATP hydrolysis promoted by ATP diphosphohydrolase in hippocampal synaptosomes of rats trained and killed 30 minutes after training, but there were no significant changes in ADP or AMP hydrolysis promoted by ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase, respectively. Thus, the differential action observed in the enzymatic degradation of ATP and ADP can suggest that these nucleotides could be handled differently by the ATP diphosphohydrolase or their hydrolysis could be modulated by different mechanisms. Since it has been showed that an ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain (30), it is possible in our experiments the influence of an ecto-ATPase activity, mainly in relation to ATP hydrolysis, which could explain the difference observed 30 min after the training session between ATP and ADP hydrolysis. When these enzyme activities were determined in hippocampal synaptosomes of rats trained and killed 15 and 60 minutes after training, no significant differences were observed compared to the control groups. These results suggest that a modulation of the enzyme activities involved in ATP hydrolysis may participate in different events triggered during memory formation.

Protein phosphorylation is considered a key mechanism in processes underlying the induction of long-lasting changes in synaptic activity, including learning and memory formation (31,32). The presence of neuronal ecto-protein kinase (12) is able to regulate several neuronal functions, using extracellular ATP secreted from synaptic vesicles as a substrate in the ecto-protein phosphorylation (14). Addition to the extracellular medium of a monoclonal antibody termed mAb 1.9 directed to the catalytic domain of PKC, inhibited selectively this surface protein phosphorylation (ecto-protein kinase) and blocked the stabilization of LTP (30–40 min) after stimulation (33).

On the basis of these considerations, it is interesting to suggest that if an ecto-protein kinase plays a role in the maintenance phase of a stable LTP, the participation of extracellular ATP in this phase is necessary. Our results showed a decrease in ATP hydrolysis 30 minutes after the training session, which prolonged the presence

of ATP released so that it could act as a substrate for ecto-protein kinase during the maintenance phase of LTP (33). The alterations observed suggests a possible role of these enzymatic chain modulating the external concentrations of ATP and, consequently, the ATP-dependent signalling pathways.

The results obtained in the test session did not show significant differences in the enzyme activities studied. Our results indicate that the modulation of enzyme activities involved in the complete hydrolysis of ATP to adenosine in the synaptic cleft can participate in the mechanisms of memory acquisition, but has no effect on retrieval.

In summary, the results reported in this paper show that a memory task (step-down inhibitory avoidance task) can alter the ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of rats. Our results suggest a possible involvement of ATP degradation in specific biochemical events related to behavioral memory acquisition and consolidation.

## ACKNOWLEDGMENTS

Part of this work was performed in the laboratory of Dr. Ivan Izquierdo whom we thank for his hospitality. This work was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil) and from Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil). C.D.B. was the recipient of a CNPq-Brazil fellowship.

## REFERENCES

1. Phillis, J. W., and Wu, P. H. 1981. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16: 187–239.
2. Zimmermann, H. 1994. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17:420–426.
3. Wieraszko, A., Goldsmith, G., and Seyfried, T. N. 1989. Stimulation-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slices. *Brain Res.* 485:244–250.
4. Edwards, F. A., Gibb, A. J., and Colquhoun, D. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 359:144–147.
5. Wieraszko, A., and Seyfried, T. N. 1989. ATP-induced potentiation in hippocampal slices. *Brain Res.* 491:356–359.
6. Bliss, T. V. P., and Lomo, T. 1972. Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J. Physiol. (Lond).* 207:61P.
7. Bliss, T. V. P., and 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. (Lond).* 232:310–356.
8. Bliss, T. V. P., and Collingridge, G. L. 1993. A synaptic model of memory: Long-Term Potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361:31–39.
9. Izquierdo, I. 1993. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. *Drug Dev. Res.* 30:1–17.

10. Izquierdo, I., and Medina, J. H. 1995. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol. Learn. Memory*. 63:19-32.
11. Wieraszko, A. 1996. Extracellular ATP as a neurotransmitter: its role in synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Neurobiol. Exp.* 56:637-648.
12. Ehrlich, Y. H., Davis, T., Bock, E., Kornecki, E., and Lenox, R. H. 1986. Ecto-protein kinase activity on the external surface of intact neuronal cells. *Nature*. 320:67-69.
13. Ehrlich, Y. H., Snider, R. M., Kornecki, E., Garfield, M. G., and Lenox, R. H. 1988. Modulation of neuronal signal transduction system by extracellular ATP. *J. Neurochem.* 50:295-301.
14. Ehrlich, Y. H., Hogan, M., Pawlowska, Z., Naik, U., and Kornecki, E. 1990. Ecto-protein kinase in the regulation of cellular responsiveness to extracellular ATP. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 603: 401-417.
15. Zimmermann, H. 1996. Biochemistry, Localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49:589-618.
16. Battastini, A. M. O., Rocha, J. B. T., Barcellos, C. K., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. F. 1991. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16:1303-1310.
17. Schadeck, R. J. G., Sarkis, J. J. F., Dias, R. D., Araujo, H. M. M., and Souza, D. O. G. 1989. Synaptosomal apyrase in the hypothalamus of adult rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 22:303-314.
18. 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.
19. Battastini, A. M. O., Oliveira, E. M., Moreira, C. M., Bonan, C. D., Sarkis, J. J. F., and Dias, R. D. 1995. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 209-219.
20. Brioni, J. D., Nagahara, A., and McGaugh, J. L. 1989. Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. *Brain Res.* 47:105-112.
21. Da Cunha, C., Huang, C. H., Walz, R., Dias, M., Koya, R., Bianchin, M., Pereira, M. E., Izquierdo, I., and Medina, J. H. 1991. Memory facilitation by post-training intraperitoneal, intracerebroventricular and intra-amygdala injection of Ro 5-4864. *Brain Res.* 544:133-136.
22. Nagy, A., and Delgado-Escueta, A. V. 1984. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using a nontoxic isoosmotic gradient (Percoll). *J. Neurochem.* 43:1114-1123.
23. Chan, K., Delfert, D., and Junger, K. D. 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal Biochem.* 157:375-380.
24. Heymann, D., Reddington, M., and Kreutzberg, G. W. 1984. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43:971-978.
25. 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.
26. James, S., and Richardson, P. J. 1993. Production of adenosine from extracellular ATP at striatal cholinergic synapse. *J. Neurochem.* 60:219-227.
27. de Mendonça, A., and Ribeiro, J. A. 1994. Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience* 62:385-390.
28. Cunha, R. A., Johansson, B., van der Ploeg, I., Sebastião, A. M., Ribeiro, J. A., and Fredholm, B. B. 1994. Evidence for functionally important adenosine A<sub>2a</sub> receptors in the rat hippocampus. *Brain Res.* 649:208-216.
29. Martín-Romero, F. J., García-Martín, C., and Gutiérrez-Merino, C. 1996. Inactivation of ecto-ATPase activity of rat brain synaptosomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1283:51-59.
30. Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C. R., and Zimmermann, H. 1997. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacol.* 36: 1189-1200.
31. Kandel, E. R., and Schwartz, J. H. 1982. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* 218:433-442.
32. Neary, J., Crow, T., and Alkon, D. L. 1981. Change in a specific phosphoprotein band following associative learning in *Hermisenda*. *Nature (Lond)*. 293:658-660.
33. Chen, W., Wieraszko, A., Hogan, M. V., Yang, H. A., Kornecki, E., and 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. USA*, 93: 8688-8693.

**II.2. CAPÍTULO 2 - BONAN, C.D.; ROESLER, R.; PEREIRA, G.S.; BATTASTINI, A.M.O.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F.** Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. **Brain Research** (in press).





## Short communication

## Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats

Carla Denise Bonan, Rafael Roesler, Grace Schenato Pereira, Ana Maria Oliveira Battastini,  
Ivan Izquierdo, João José Freitas Sarkis \*

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sul, Rua Ramiro Barcelos,  
2600-ANEXO, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil*

Accepted 2 November 1999

---

**Abstract**

Considering the involvement of extracellular ATP in the memory formation, we analyzed the effect of inhibitory avoidance training on ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus, entorhinal cortex and parietal cortex. ATP diphosphohydrolase activity presented a decrease (33%) in hippocampal synaptosomes of rats sacrificed 180 min after training. Our results also showed a decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase (30% and 42% for ATP and ADP, respectively) in entorhinal cortex immediately after training. These findings suggest an integrated action of ATP diphosphohydrolase from hippocampus and entorhinal cortex in the formation of inhibitory avoidance memory. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** ATP diphosphohydrolase; Apyrase; 5'-nucleotidase; Inhibitory avoidance; Long-term potentiation; Memory

---

There is increasing evidence for a role of extracellular ATP in the synaptic plasticity. ATP is able to induce long-lasting enhancement of the population-spike, called long-term potentiation (LTP) [17,18]. Extracellular ATP has also been shown to be a substrate for ecto-protein kinases, important in the maintenance phase of LTP [5].

The signaling actions induced by extracellular ATP are directly correlated to the activity of ectonucleotidases, because they trigger enzymatic conversion of ATP, controlling the nucleotide levels in the synaptic cleft [20]. We have demonstrated that the neurotransmitter ATP is hydrolyzed to adenosine, an important neuromodulator, by the conjugated action of an ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) and a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) [1,13]. Ecto-apyrase is a noncovalent tetrameric protein [16] expressed in primary neurons and astrocytes, presenting a wide distribution in central nervous system [15]. Furthermore, Kegel et al. have showed that an ecto-ATPase is co-expressed with an ecto-ATP diphosphohydrolase in rat brain [11].

Recently, our laboratory observed that one-trial inhibitory avoidance training is associated with a learning-specific, time-dependent decrease in hippocampal ectonucleotidase activities [2]. These findings raise questions about the importance of the ectonucleotidase pathway in biochemical events related to the early phase of memory formation. Step-down inhibitory avoidance task involves the specific repression of the natural tendency of rats to explore beyond the platform, without affecting the performance of exploratory behavior while on the platform, repeated approximations to its border or abortive step-down responses [9]. Studies have showed that the hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex participate, in that sequence, in the formation and expression of memory for step-down inhibitory avoidance task in rats [10].

To further explore the possible participation of the ectonucleotidase pathway in different brain structures involved in the formation of inhibitory avoidance memory, here we evaluated the effect of inhibitory avoidance training on synaptosomal ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities from hippocampus, entorhinal cortex and parietal cortex of rats at different times after training.

---

\* Corresponding author. Fax: +55-51-316-5535; e-mail: [jjisarkis@plug-in.com.br](mailto:jjisarkis@plug-in.com.br)

Adult male Wistar rats (70–90 days; 220–260 g) were maintained at a constant temperature ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) in a 12 h light/dark cycle and had water and food ad libitum. The step-down inhibitory avoidance training box was a 50 cm wide, 25 cm high and 25 cm deep acrylic box whose floor was a series of parallel 1.2 mm-caliber bronze bars spaced 1.0 cm apart. The left end of the grid was occupied by a 7-cm wide, 5-cm high Formica platform. Animals were divided into three groups: (1) naive controls, sacrificed immediately after withdrawal from their home cage; (2) shocked animals, placed directly over an electrified grid, receiving a 0.4 mA, 2.0 s footshock, then withdrawn from the box; and (3) trained animals. Trained rats were placed on the platform facing the rear left corner. Immediately after stepping down on the grid, they received a 0.4 mA, 2-s scrambled footshock and were then withdrawn from the box [18,35]. The rats were sacrificed by decapitation at different times (0, 180 and 360 min) after training (trained group) or shock (shocked group) and their hippocampi, entorhinal cortex and parietal cortex were removed. The subcellular fractionation and enzyme assays were carried out simultaneously at the different groups studied.

The experiments with entorhinal cortex were performed using pools of two animals for each synaptosomal preparation. The hippocampi, parietal cortex and entorhinal cortex were homogenized and the synaptosomes were isolated as described previously [12].

The reaction medium used to assay ATP diphosphohydrolase activity contained 5.0 mM KCl, 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 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  $\mu\text{l}$  [1]. The reaction medium used to assay 5'-nucleotidase activity contained 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0 and 0.15 M sucrose in a final volume of 200  $\mu\text{l}$  [8]. The synaptosome preparation (10–20  $\mu\text{g}$  protein) was preincubated for 10 min at  $37^\circ\text{C}$ . 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  $\mu\text{l}$  10% trichloroacetic acid. The released inorganic phosphate (Pi) was determined according Chan et al. [4]. Protein was measured by the Coomassie Blue method [3]. The statistical analysis used was two-way ANOVA and one-way ANOVA, followed by Duncan multiple range test.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference in both statistical analysis used.

Our laboratory have demonstrated a significant decrease in hippocampal ectonucleotidase activities immediately post-training [2]. To further explore the possibility that hippocampal ectonucleotidases are involved in memory consolidation, we examined if the late events in the hippocampus (3–6 h post-training) can involve the modulation of these enzyme activities. The mean overall step-down latency during training was  $7.23 \pm 1.05$  s ( $n = 30$ , mean  $\pm$  S.E.). ATP diphosphohydrolase presented a significant decrease (33% for both substrates when compared to the

respective shock group,  $P < 0.05$ ) in hippocampal synaptosomes of rats sacrificed at 180 min, but not at 360 min after training (Fig. 1A and B).

In order to examine the participation of ectonucleotidases from different structures in the acquisition and consolidation of memory, we investigate these enzyme activities in synaptosomes from entorhinal and parietal cortex of rats after avoidance learning. Our results showed a significant decrease in ATP diphosphohydrolase activity (30% and 42% for ATP and ADP, respectively) in synaptosomes from entorhinal cortex of rats sacrificed immediately, but not at 180 and 360 min after training (Fig. 2A and B).

There were no significant differences in ATP diphosphohydrolase activity between groups (naive, shocked and trained) and between different training-sacrifice intervals (0, 180 and 360 min) tested in synaptosomes from parietal

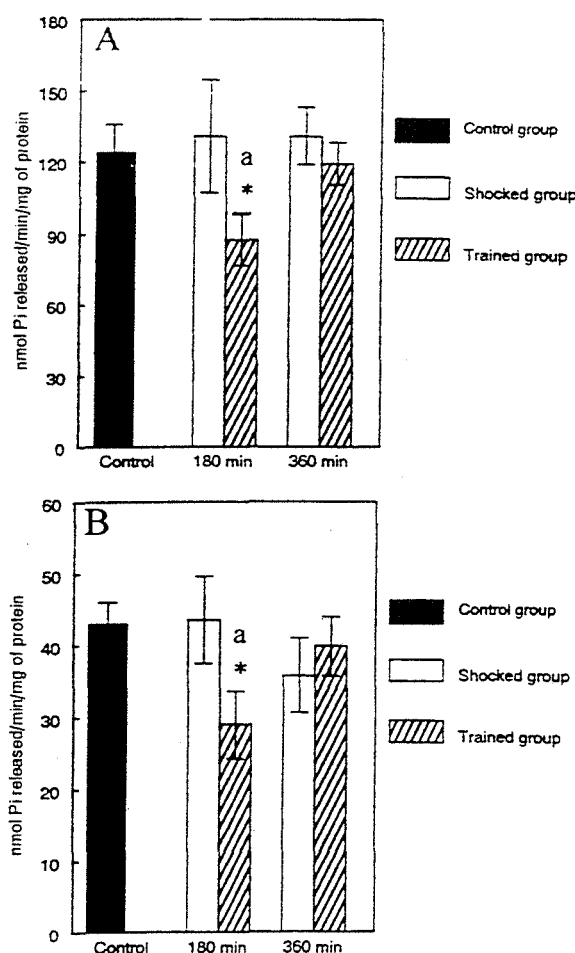


Fig. 1. Effect of training session in a step-down inhibitory avoidance task on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by ATP diphosphohydrolase in synaptosomes from hippocampus of rats. Control group represents naive rats. Bars represent the mean  $\pm$  S.D. of at least eight animals. (\*) Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ; Duncan Test). (a) Significantly different from the respective shocked group ( $P < 0.05$ ; Duncan Test).

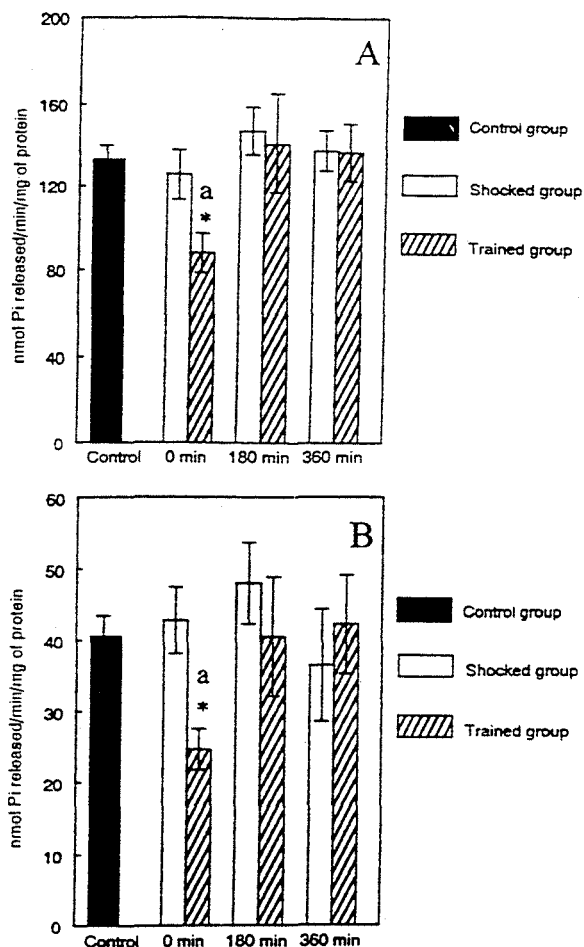


Fig. 2. Effect of training session in a step-down inhibitory avoidance task on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by ATP diphosphohydrolase in synaptosomes from entorhinal cortex of rats. Bars represent the mean  $\pm$  S.D. of at least eight animals. (\*) Significantly different from control ( $P < 0.05$ ; Duncan Test). (a) Significantly different from the respective shocked group ( $P < 0.05$ ; Duncan Test).

cortex (data not shown). Ecto-5'-nucleotidase activity did not present significant changes in synaptosomes from hippocampus, entorhinal cortex and parietal cortex in any training-sacrifice intervals studied (data not shown).

Extracellular ATP was associated with memory formation, probably by interaction with purinergic receptors [18], ectonucleotidases [2] and ecto-protein phosphorylation [5]. The present results observed in entorhinal cortex agree with our previous report about a decrease of ectonucleotidase pathway in synaptosomes from hippocampus of rats immediately after training [2]. In order to extend our previous studies in the hippocampus, we proceed this investigation and observed an inhibition of hippocampal ATP diphosphohydrolase at 180 min after training. Ectonucleotidases from parietal cortex did not show significant changes, suggesting that these enzymes are not relevant to formation of inhibitory avoidance memory in parietal cortex.

In learning situations, the hippocampus is supposed to receive the stimuli relevant to the training experience from collaterals of the sensory system, prefrontal cortex and entorhinal cortex [9,10]. These structures share similar pharmacological and biochemical mechanisms in the early stages of memory formation [9]. The significant inhibition observed on ectonucleotidase pathway in hippocampus [2] and on ATP diphosphohydrolase activity in entorhinal cortex immediately after training could represent an important biochemical mechanism related to memory acquisition.

Among several biochemical mechanisms triggered immediately after training, it is possible to observe an enhanced activity of Protein Kinase G (PKG), calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), Protein Kinase C (PKC) cascades and an increase in Protein Kinase A (PKA) activity at 0 and 3 h after training [9]. Recently, our laboratory has presented evidences pointed out to a possible modulation of rat brain ecto-apyrase by phosphorylation [19]. Furthermore, the sequence analysis of ecto-apyrase presents one potential cAMP- or cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site, four PKC phosphorylation sites and two casein kinase phosphorylation sites [14]. Although the mechanism by which ecto-apyrase decreases its activity post-training has not been elucidated, it is possible that its phosphorylation represents an important regulatory mechanism, controlling extracellular ATP levels, which could be used as substrate in ecto-protein phosphorylation. It has been proposed that the maintenance of LTP involve the activity of an ecto-protein kinase, using extracellular ATP as substrate [5].

There is considerable evidence that learning invokes neuroplastic changes involving the activity of the neural cell adhesion molecules (NCAM) [6,7]. Considering that NCAM expression presents an increase at 6- to 8-h post-training [6] and evidences indicate that NCAM is associated to an ATPase activity [7], we investigate the ATP hydrolysis at 6 h after avoidance training. However, our results did not present significant changes on synaptosomal ATP hydrolysis, indicating that ATPase activity, at least in this condition, is not crucial for memory formation.

In summary, the results reported here endorse the hypothesis that ectonucleotidase activities participate in the early events related to memory acquisition and consolidation of an aversively motivated learning task.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil), Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX-Brazil), and from Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil).

## References

- [1] A.M.O. Battastini, J.B.T. Rocha, C.K. Barcellos, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats, *Neurochem. Res.* 16 (1991) 1303–1310.
- [2] C.D. Bonan, M.M. Dias, A.M.O. Battastini, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of adult rats, *Neurochem. Res.* 23 (1998) 979–984.
- [3] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 218–254.
- [4] K. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–380.
- [5] W. Chen, A. Wieraszko, M.V. Hogan, H.A. Yang, E. Kornecki, Y.H. Ehrlich, Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 8688–8693.
- [6] E. Doyle, P.M. Nolan, R. Bell, C.M. Regan, Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete post-training period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat, *J. Neurochem.* 59 (1992) 1570–1573.
- [7] K. Dzhandzhugazyan, E. Bock, Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding, *Biochemistry* 36 (1997) 15381–15395.
- [8] D. Heymann, M. Reddington, G.W. Kreutzberg, Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain, *J. Neurochem.* 43 (1984) 971–978.
- [9] I. Izquierdo, J.H. Medina, Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures, *Neurobiol. Learn. Mem.* 68 (1997) 285–316.
- [10] I. Izquierdo, J.A. Quillfeldt, M.S. Zanatta, J. Quevedo, E. Schaeffer, P.K. Schmitz, J.H. Medina, Sequential involvement of the hippocampus and amygdala, the entorhinal cortex, and the posterior parietal cortex in memory formation and retrieval, *Eur. J. Neurosci.* 9 (1997) 786–793.
- [11] B. Kegel, N. Braun, P. Heine, C.R. Maliszewski, H. Zimmermann, An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain, *Neuropharmacology* 36 (1997) 1189–1200.
- [12] A.K. Nagy, A.V. Delgado-Escueta, Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using a non-toxic isoosmotic gradient (Percoll), *J. Neurochem.* 43 (1984) 1114–1123.
- [13] J.J.F. Sarkis, C. Saltó, Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo Marmorata*, *Brain Res. Bull.* 26 (1991) 871–876.
- [14] T. Smith, T.L. Kirley, Cloning, sequencing and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases, *Biochim. Biophys. Acta* 1386 (1998) 65–78.
- [15] T.-F. Wang, G. Guidotti, Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system, *Brain Res.* 790 (1998) 318–322.
- [16] T.-F. Wang, Y. Ou, G. Guidotti, The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24814–24821.
- [17] A. Wieraszko, T.N. Seyfried, ATP-induced potentiation in hippocampal slices, *Brain Res.* 49 (1989) 356–359.
- [18] A. Wieraszko, Y.H. Ehrlich, On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus, *J. Neurochem.* 63 (1994) 1731–1738.
- [19] M.R. Wink, G. Lenz, R. Rodnight, J.J.F. Sarkis, A.M.O. Battastini, Evidence for the phosphorylation of ecto-ATP diphosphohydroloase (ecto-apyrase) from rat brain, Joint Meeting of International Society of Neurochemistry and the European Society of Neurochemistry, Berlin, Germany, 1999, personal communication.
- [20] H. Zimmermann, N. Braun, B. Kegel, P. Heine, New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system, *Neurochem. Int.* 32 (1998) 421–425.

**II.3. CAPÍTULO 3** - BONAN, C.D.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J.; BATTASTINI A.M.O.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F. Effects of suramin on hippocampal apyrase activity and inhibitory avoidance learning of rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 63(1), 153-158, 1999.



# Effects of Suramin on Hippocampal Apyrase Activity and Inhibitory Avoidance Learning of Rats

C. D. BONAN, R. ROESLER, J. QUEVEDO, A. M. O. BATTASTINI,  
 I. IZQUIERDO AND J. J. F. SARKIS

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600,  
 Anexo, Porto Alegre, 90035-003, RS, Brazil*

Received 13 February 1998; Revised 3 November 1998; Accepted 2 December 1998

BONAN, C. D., R. ROESLER, J. QUEVEDO, A. M. O. BATTASTINI, I. IZQUIERDO AND J. J. F. SARKIS. *Effects of suramin on hippocampal apyrase activity and inhibitory avoidance learning of rats.* PHARMACOL BIOCHEM BEHAV 63(1) 153–158, 1999.—The action of suramin on apyrase activity in hippocampal synaptosomes and its effects on retention of inhibitory avoidance learning were evaluated. Suramin, a P<sub>2</sub>-purinoceptor antagonist, significantly inhibited in a noncompetitive manner the ATP and ADP hydrolysis promoted by apyrase in hippocampal synaptosomes of adult rats. The K<sub>i</sub> values obtained were 72.8 and 109 μM for ATP and ADP hydrolysis, respectively. Intrahippocampal infusion of suramin (0.01, 0.1, 1, and 10 μg) immediately posttraining, in a dose-dependent effect, significantly reduced the response latency during the retention test applied 24 h after the rats received step-down inhibitory avoidance training. The amnesic effects promoted by suramin probably occur by its antagonist action on hippocampal P<sub>2</sub>-purinoceptors and NMDA receptors. In view of the fact that ATP-metabolizing enzymes and P<sub>2</sub>-purinoceptors have similar binding domains, these results suggest that suramin can either alter ATP degradation and/or block purinergic neurotransmission. © 1999 Elsevier Science Inc.

Suramin    ATP diphosphohydrolase    Apyrase    Memory    Inhibitory avoidance task

SINCE the purinergic nerve hypothesis defining extracellular ATP as a neurotransmitter was proposed (7), there has been growing interest in its role in synaptic transmission (8). 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 substances (28,31). It has been shown that exogenously applied ATP can influence cell excitability (12,13) and, at low nanomolar concentrations, it is able to induce long-lasting enhancement of the population spikes recorded from hippocampal slices, called long-term potentiation (LTP) (33).

Extracellular ATP evokes responses through two subclasses of P<sub>2</sub>-purinoceptors, P<sub>2x</sub> and P<sub>2y</sub>. The P<sub>2x</sub> subclass has been shown to be coupled to ligand-gated Ca<sup>2+</sup>-permeable channels, whereas the P<sub>2y</sub> has been considered a G-protein-linked subclass. These P<sub>2</sub>-purinoceptors have been subdivided into several subtypes based on agonist potencies (35), al-

though the pharmacological characterization of these receptors is hampered by the absence of selective and potent antagonists (3).

Moreover, ATP as well as other nucleotide agonists for the P<sub>2</sub>-purinoceptors, are subject to degradation by ectonucleotidases (38). Breakdown of ATP by one of these enzymes, ATP diphosphohydrolase (Apyrase, ATPDase, EC 3.6.1.5), is the first step towards complete ATP dephosphorylation yielding adenosine. Adenosine can bind to P<sub>1</sub> receptors, and in turn, is taken up and inactivated. It has been reported that extracellular ATP is hydrolyzed by an apyrase in synaptosomes of the peripheral and central nervous systems (2,30). Furthermore, rat and mouse brain ecto-apyrase cDNAs were isolated, and it has been suggested that there might be a single copy of the ecto-apyrase gene (32). An important function of this enzyme is its participation in an enzyme chain, together with 5'-nucleotidase, to control the availability of ligands (ATP, ADP, AMP,

Requests for reprints should be addressed to Dr. J. J. F. Sarkis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

and adenosine) for both nucleotide and nucleoside receptors, and consequently, the duration and extent of receptor activation (38). Recently, in our laboratory, we observed that a memory task (step-down inhibitory avoidance task) can alter apyrase and 5'-nucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of rats. The modulation of these enzyme activities can be involved in specific biochemical events related to memory acquisition (5).

Among a variety of  $P_2$  ligands, suramin has been used as a nonselective antagonist of  $P_{2x}$  and  $P_{2y}$  purinoceptors (15,35). It has also been suggested that suramin can interact with NMDA receptors probably as an antagonist (26). It blocked ATP-mediated fast synaptic transmission (13) and antagonized ATP-activated currents in PC12 cells (25). However, suramin is able to facilitate synaptic responses recorded from hippocampal slices (34). The action of suramin involves various other biological effects. Suramin has been reported to have inhibitory effects on the ecto-apyrase of *Torpedo* electric organ (22) and on the ecto-ATPase activity from several sources (3,14,23,37).

In the present investigation, we demonstrate the effect in vitro of suramin on apyrase activity from hippocampal synaptosomes of rats.

Because our recent studies indicate that apyrase activity participate in the mechanisms of memory acquisition (5) and suramin is able to facilitate synaptic responses, inducing LTP (34), we evaluate the effects of intrahippocampal infusion of suramin on retention of a learning task, the step-down inhibitory avoidance task. The actions of suramin on extracellular ATP degradation and its possible effects on mechanisms of memory are discussed.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Subjects

Male Wistar rats (age, 70–90 days; weight, 220–260 g) from our breeding stock were housed five to a cage, with water and food ad libitum. The animal house was kept on a 12-h light/dark cycle (lights on at 0700 h) at a temperature of 23°C.

##### Subcellular Fractionation

The rats were killed by decapitation, and their hippocampi were removed and gently homogenized in 5 vol of an ice-cold medium consisting of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, and 5.0 mM HEPES, pH = 7.5, with a motor-driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described previously (24). Briefly, 0.5 ml of the crude mitochondrial fraction was 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 washed twice at  $15,000 \times g$  for 20 min with the same ice-cold medium to remove the contaminating Percoll and 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 apyrase activity was essentially as described previously (2), and contained 5.0 mM KCl, 1.5 mM  $CaCl_2$ , 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose, and 45 mM TRIS-HCl buffer, pH 8.0, in a final vol-

ume of 200  $\mu$ l. The concentrations of suramin [8-(3-benzoamido-4-methylbenzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid] used in the assay were in the 12–150- $\mu$ M range. The enzyme preparation (10–20  $\mu$ g protein) was added to the reaction mixture and preincubated for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to a final concentration of 1.0 mM, and stopped by the addition of 200  $\mu$ l 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 min and 100- $\mu$ l samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) (10). Incubation times and protein concentration were chosen to ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct nonenzymatic hydrolysis of the substrates. All samples were run in duplicate. Protein was measured by the Coomassie Blue method (6), using bovine serum albumin as standard.

##### Surgery

Animals were implanted under thionembutal anesthesia (30 mg/kg, ip), with bilateral 30-g cannulae aimed 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus (18,19,36). Coordinates for the guide cannulae were A -4.3, L 4.0, V 2.0 (27). Histological verification of cannulae placement was as previously described (18,19,36). Two to 24 h after the end of the behavioral experiments, a 0.5  $\mu$ l infusion of 4% methylene blue was applied through the infusion cannulae. The brains were removed and conserved in a 10% formalin solution, and cannula placement was verified. Only data for animals considered to have cannulae correctly placed in the desired area were submitted to final analysis (Fig. 3). The placements were correct in 90% of the animals.

##### Behavioral Procedures

Three to 5 days after surgery, animals were submitted to the behavioral procedures. Training and test session procedures were as described in several previous reports (18,19,36). A 50 cm wide, 25 cm high, 25 cm deep acrylic box was used. The left extreme of the box was occupied by a 7 cm wide, 3 cm high formica platform. The rest of the floor was a grid of parallel 0.1 cm caliber steel bars spaced 1 cm apart. In the training sessions, the animals were gently placed on the platform and their latency to step down with the four paws on the grid was measured. On stepping down, animals received a 0.4 mA, 60 Hz footshock for 2 s, and were withdrawn from the box. The test session was procedurally identical except that the footshock was omitted. Training–test interval was 24 h. A ceiling of 180 s was imposed in the test session, i.e., animals with retention latencies higher than 180 s were computed with this value. Test session step-down latency was used as a measure of retention (18,19,36).

##### Drug Infusion Procedure

Immediately after training in the task, a cannula was fitted into the guide cannula. The infusion cannula was connected by a polyethylene tube to a microsyringe (18,19,36). The tip of the infusion cannula protruded 1.0 mm beyond that of the guide cannula and was, therefore, aimed at the CA1 region of the dorsal hippocampus. Animals were infused with 0.5  $\mu$ l saline (0.9% NaCl), or different doses of suramin (0.01, 0.1, 1.0, or 10.0  $\mu$ g) dissolved in 0.5  $\mu$ l saline. The solutions injected were brought to pH 7.4 with 0.1 N phosphate buffer.

## SURAMIN ALTERS APYRASE ACTIVITY

155

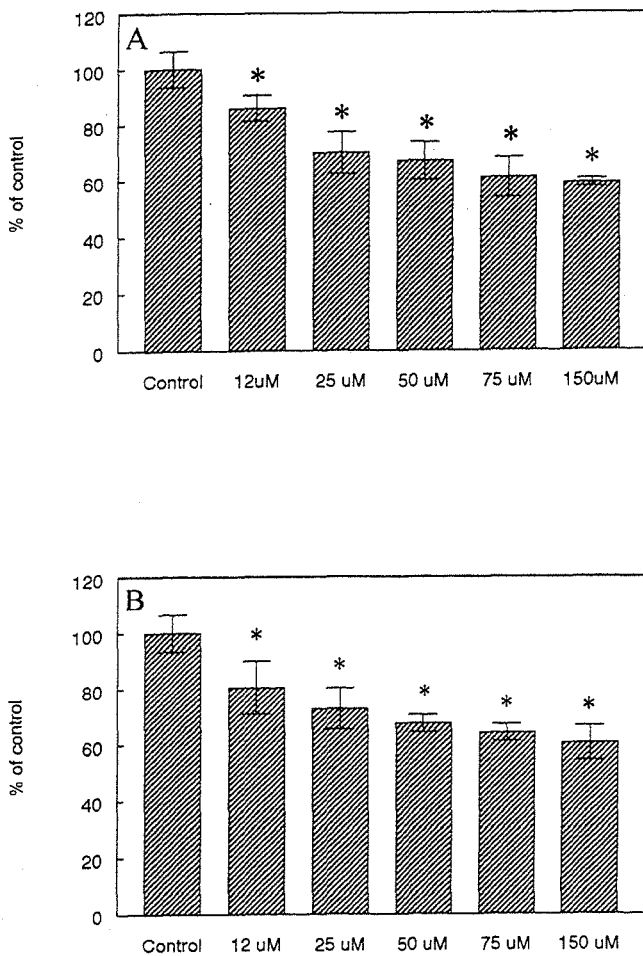


FIG. 1. Effect of suramin on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by the apyrase activity in synaptosomes from hippocampus of rats. Bars represent the mean  $\pm$  SD of four experiments. The control ATPase and ADPase activities (100% = no suramin added) measured were  $153.02 \pm 9.95$  nmol Pi  $\times$  min $^{-1}$   $\times$  mg $^{-1}$  protein and  $44.62 \pm 3.0$  nmol Pi  $\times$  min $^{-1}$   $\times$  mg $^{-1}$  protein, respectively. \* $p < 0.05$ .

## Statistical Analysis

The statistical analysis used in the *in vitro* experiments was one-way analysis of variance (ANOVA). Training and test sessions step-down latency differences among groups were evaluated by one-way Kruskal-Wallis analysis of variance, followed by a Mann-Whitney test when necessary. Comparisons between training and test sessions latencies within each group were made by a Wilcoxon test.

## RESULTS

The effect of suramin on apyrase activity (ATP and ADP hydrolysis) was measured in synaptosomes from the hippocampus of adult rats. A significant inhibition of apyrase activity (16 and 20% for ATP and ADP, respectively) in relation to control (no suramin added = 100% of activity) was observed at a concentration of 12  $\mu$ M. The inhibition observed was concentration-dependent, with the apyrase activity markedly reduced in the presence of 150  $\mu$ M suramin (41 and 40% for ATP and ADP in relation to control activity, respectively) (Fig. 1A and 1B).

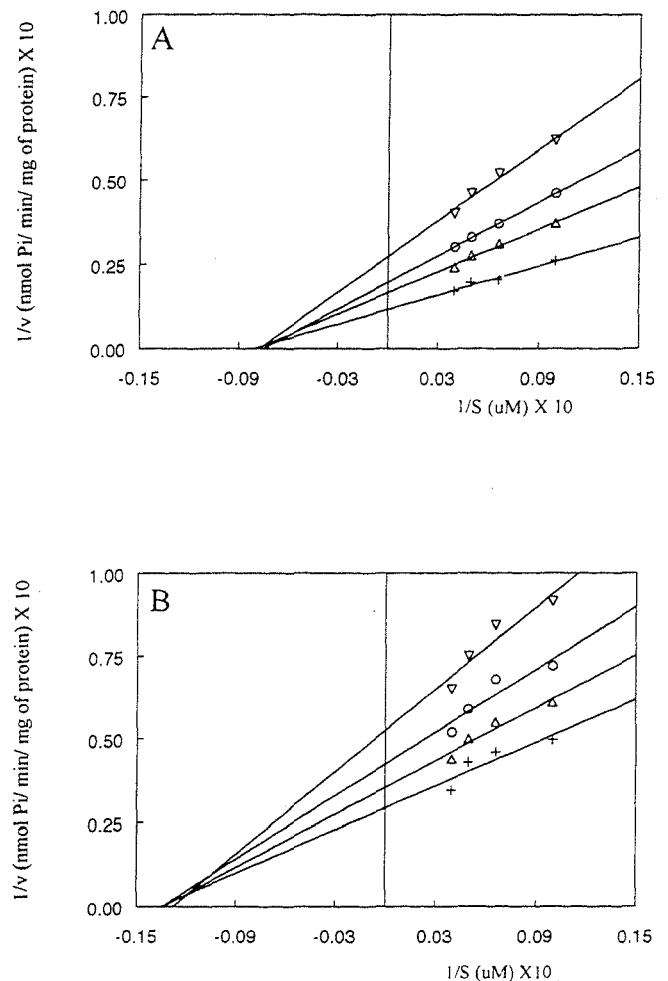


FIG. 2. Kinetic analysis of the inhibition of apyrase by suramin in hippocampal synaptosomes of rats. The graphs show double-reciprocal plots of apyrase activity for ATP (A) and ADP (B) concentrations (0.1–0.25 mM) in the absence (+) and in the presence of 15  $\mu$ M ( $\Delta$ ), 45  $\mu$ M ( $\circ$ ) and 75  $\mu$ M ( $\nabla$ ) suramin. All experiments were repeated at least four times and similar results were obtained. Data presented were from individual experiments.

The kinetics of the interaction of suramin with apyrase activity in synaptosomes from hippocampus was also determined (Fig. 2). The Lineweaver-Burk double-reciprocal plot was analyzed over the range of ATP and ADP concentrations as substrates (0.1–0.25 mM) in the absence and presence of suramin (15–75  $\mu$ M). The data indicated that the inhibition of ATP and ADP hydrolysis by suramin was noncompetitive, because the  $K_m$  values did not change significantly, while maximal ATPase and ADPase velocities decreased with increasing suramin concentrations (Fig. 2A and 2B). The  $K_i$  values (inhibition constant) were determined from Dixon plots (plots not shown). The  $K_i$  values obtained were  $72.8 \pm 7.1$   $\mu$ M for ATP (means  $\pm$  SD,  $n = 4$ ) and  $109 \pm 10.6$   $\mu$ M for ADP (means  $\pm$  SD,  $n = 4$ ).

In the present study, we also evaluated the effect of intra-hippocampal infusion of suramin on retention of an aversive learning task, the step-down inhibitory avoidance task. The results for the inhibitory avoidance task are shown in Fig. 3. There were no significant differences among groups in train-



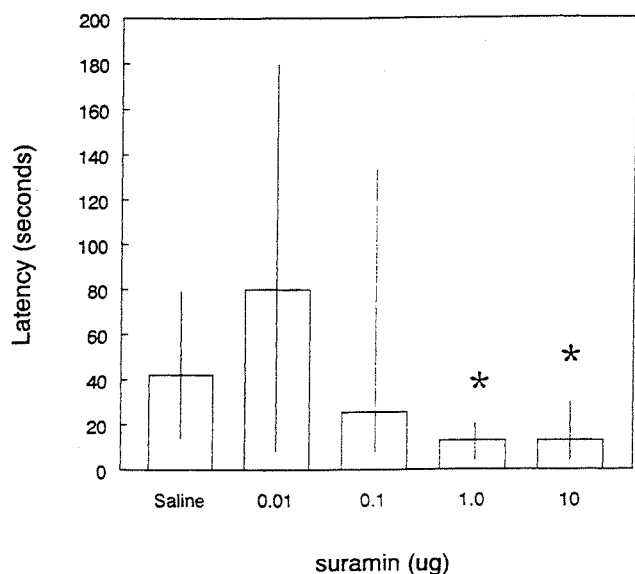


FIG. 3. Effect of intrahippocampal infusion of suramin (0.01, 0.1, 1.0, and 10.0  $\mu\text{g}/\text{side}$ ) on retention of step-down inhibitory avoidance task. Data are median (interquartile range) of retention test step-down latencies.  $n = 10\text{--}15$  animals per group. \*Significantly different from the saline group ( $p < 0.05$ ) by the Mann-Whitney  $U$ -test.

ing session latencies (Kruskal-Wallis analysis of variance,  $p > 0.10$ ), but there was a significant difference in retention test latencies among groups (Kruskal-Wallis analysis of variance,  $p < 0.05$ ). Groups treated with suramin at doses 0.01 and 0.1  $\mu\text{g}$  did not show significant difference when compared to the saline group (Mann-Whitney test,  $p > 0.10$ ).

Groups treated with suramin at doses 1.0 and 10.0  $\mu\text{g}$  showed a significant impairment of retention when compared with the saline group (Mann-Whitney test,  $p < 0.01$ ). There was a significant difference between training and test session performances in the vehicle group. 0.01 and 0.1  $\mu\text{g}$  suramin groups (Wilcoxon test,  $p < 0.01$ ), but not in the suramin 1.0 and 10.0  $\mu\text{g}$ -treated groups (Wilcoxon test,  $p > 0.05$ ). The results show that immediate posttraining intrahippocampal infusions of suramin impaired inhibitory avoidance retention in a dose-dependent response.

#### DISCUSSION

In the present investigation, we showed that suramin can inhibit the apyrase activity in hippocampal synaptosomes of rats. Inhibitory effects of this compound on ATP breakdown have been previously described. Suramin inhibits ecto-ATPase activity from guinea pig urinary bladder (14), endothelial cells (23), blood cells (3), *Xenopus* oocytes (37), and can also inhibit ecto-apyrase activity from *Torpedo* electric organ (22). In agreement with the reports indicated above that suramin inhibits ATP breakdown in a noncompetitive manner (3,14,22), our results showed a similar mechanism of inhibition on apyrase activity in rat hippocampal synaptosomes. The  $K_i$  values obtained for inhibition of apyrase by suramin were of the micromolar order. These results agree with the  $K_i$  values obtained for the inhibition of this enzyme in *Torpedo* electric organ (22). However, we suggest that hippocampal apyrase ( $K_i = 72.8$  and  $109 \mu\text{M}$  for ATP and ADP, respectively) is less sensitive to suramin than *Torpedo* ecto-apyrase ( $K_i = 43$  and

$30 \mu\text{M}$  for ATP and ADP, respectively) (22). To our knowledge, this is the first report about suramin as an inhibitor of ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from central nervous system (hippocampus). The usefulness of suramin as an inhibitor of hippocampal apyrase is questionable, because it is itself a  $P_2$ -purinoceptor antagonist (15). It has been suggested that ATP-metabolizing enzymes and  $P_2$ -purinoceptors have similar binding domains, thus suramin can either alter ATP degradation and/or block purinergic neurotransmission (16). Because of its inhibitory effect on ATP degradation, the potency of suramin as an antagonist can be underestimated if it is tested against agonists (ATP, ADP, AMP) that are substrates for ectonucleotidases (11).

Recently, our laboratory has shown that inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of rats (5). Because suramin was able to facilitate synaptic responses (34), and this drug acts as an apyrase inhibitor, we evaluated the effect of this drug on the retention of step-down inhibitory avoidance task. The administration of suramin could potentiate the apyrase inhibition observed in the acquisition of inhibitory avoidance task (5), increasing the ATP levels and improving the retention of this memory task. On the basis of these considerations, the amnesic effect of suramin was unexpected. Our results show that suramin can impair the retention of step-down inhibitory avoidance task, in a dose-dependent way, when infused intrahippocampally at doses of 1 and 10  $\mu\text{g}$ . Independently of the question whether there is an involvement of apyrase activity in this condition, an important consequence of intrahippocampal infusion of suramin is the amnesic effect. This condition can be produced by interactions between different systems upon which suramin can exert its effects, including  $P_2$ -purinoceptors, NMDA receptors, and ATP-metabolizing enzymes. Suramin is an apparent exception to the list of drugs that affect LTP or LTP-like phenomena and memory in a similar way (20), because it facilitated synaptic responses in hippocampal slices (34), but when given into the hippocampus was amnesic. The different effects of suramin reinforce the concept that, due to its broad spectrum of biological properties, the actions of this drug significantly depend on the system studied (34).

A NMDA receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  increase in hippocampal neurons has been implicated in formation of memory of the inhibitory avoidance learning (20). It is also known that the induction of LTP in postsynaptic neurons requires a rise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}]_i$ ), which is thought to be mainly mediated by glutamate via *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors (4). Stimulation of  $P_{2x}$ -purinoceptors by ATP leads to a rise in  $[\text{Ca}]_i$  and suramin, with its antagonist action, decrease  $\text{Ca}^{2+}$  influx, which could impair the synaptic efficiency (17). Furthermore, it has been shown that suramin can also antagonize *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (26). As suramin blocks  $P_{2x}$ -receptors and NMDA receptors, the impairing effect of this drug in memory may be related to a blockade of  $\text{Ca}^{2+}$  influx through these receptor channels. As hippocampal LTP also depends on NMDA receptors activation and increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx, our results are controversial with the facilitatory effect of suramin on induction of hippocampal LTP (34). Our results showed a dissociation, rather than a correlation, between LTP and memory.

The dissociation observed between the LTP studies and the behavioral data could be related to LTP hippocampal saturation. A different approach to study whether LTP is essential for learning is to saturate all synapses in the hippocam-

pus by electrical stimulation, assuming that the upregulation of all synapses should make learning impossible. This prediction arises from the idea that neural networks store information as a specific distribution of synaptic strengths that would be disrupted by saturation of their capacity for LTP (1). The first studies have showed that after saturation, animals were not able to learn a spatial task very well, while animals in which hippocampus was stimulated but LTP was allowed to decay were not impaired (9). It was observed in the LTP studies that the magnitude of suramin effect was concentration dependent (34). At 12  $\mu\text{M}$ , the effect became saturated, and an increase in the suramin concentration did not enhance the magnitude of the population spike (34). On the basis of these considerations, it is possible to suggest that, in the doses used in the behavioral studies, the suramin-induced potentiation could result in maximal expression of LTP in the entire population of relevant synapses (saturation), which could produce significant learning and memory deficits.

Another important action of suramin is its interaction with protein kinase C (PKC). It has been shown that PKC can be inhibited or activated by suramin in a type-dependent manner by multiple mechanisms (21). The chain of events starting with  $\text{Ca}^{2+}$  increase and PKC activation, followed by protein

synthesis, may account for a response amplification not necessarily related to LTP but otherwise involved in memory (20,29). It is probable that compounds able to alter one of these events can promote changes in synaptic efficiency.

Accordingly, in this study we have shown the action of suramin, a  $\text{P}_2$ -purinoceptor antagonist, on the apyrase activity and on the retention of a learning task, the step-down inhibitory avoidance task. Probably the amnesic effects of suramin is related to its antagonist action on  $\text{P}_2$ -purinoceptors, NMDA receptors and/or to its inhibitory effects on ATP degradation. Further investigation is required to determine the exact biochemical mechanism involved in the amnesic effect, and whether there is a relationship between apyrase inhibition and the induction of amnesia by suramin.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr. J. M. C. Ribeiro for the generous gift of suramin. This work was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil), Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and the Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil). C.D.B. was the recipient of a CNPq-Brazil fellowship.

#### REFERENCES

- Barnes, C. A.; Jung, M. W.; McNaughton, B. L.; Korol, D. L.; Andreasson, K.; Worley, P. F.: LTP saturation and spatial learning disruption: Effects of task variables and saturation levels. *J. Neurosci.* 14:5793-5806; 1994.
- Battastini, A. M. O.; Rocha, J. B. T.; Barcellos, C. K.; Dias, R. D.; Sarkis, J. J. F.: Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16:1303-1310; 1991.
- Beukers, M. W.; Kerkhof, C. J. M.; van Rhee, M. A.; Ardanuy, U.; Gurgel, C.; Widjaja, H.; Nickel, P.; Ijzerman, A. P.; Soudijn, W.: Suramin analogs, divalent cations and ATPs as inhibitors of ecto-ATPase. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 351:523-528; 1995.
- Bliss, T. V. P.; Collingridge, G. L.: A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39; 1993.
- Bonan, C. D.; Dias, M. M.; Battastini, A. M. O.; Dias, R. D.; Sarkis, J. J. F.: Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. *Neurochem. Res.* 23:979-984; 1998.
- Bradford, M. M.: 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; 1976.
- Burnstock, G.: Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24:509-581; 1972.
- Burnstock, G.: Physiological and pathological roles of purines: An update. *Drug Dev. Res.* 28:195-206; 1993.
- Castro, C. A.; Silbert, L. H.; McNaughton, B. L.; Barnes, C. A.: Recovery of spatial learning deficits following decay of electrically-induced synaptic enhancement in the hippocampus. *Nature* 342:545-548; 1989.
- Chan, K.; Delfert, D.; Junger, K. D.: A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157:375-380; 1986.
- Crack, B. E.; Beukers, M. W.; McKechnie, K. C. W.; Ijzerman, A. P.; Leff, P.: Pharmacological analysis of ecto-ATPase inhibition: Evidence for combined enzyme inhibition and receptor antagonism in  $\text{P}_2$ -purinoceptor ligands. *Br. J. Pharmacol.* 113:1432-1438; 1994.
- Edwards, F. A.; Gibb, A. J.; Colquhoun, D.: ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359:144-147; 1992.
- Evans, R. J.; Derkach, V.; Surprenant, A.: ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357:503-505; 1992.
- Hourani, S. M. O.; Chown, J. A.: The effect of some possible inhibitors of ectonucleotidases on the breakdown and pharmacological effect of ATP in the guinea-pig urinary bladder. *Gen. Pharmacol.* 20:413-416; 1989.
- Hoyle, C. H. V.: Pharmacological activity of adenine nucleotides in the periphery: Possible receptor classes and transmitter function. *Gen. Pharmacol.* 21:827-831; 1990.
- Hoyle, C. H. V.; Knight, G. E.; Burnstock, G.: Suramin antagonists responses to  $\text{P}_2$ -purinoceptor agonists and purinergic nerves stimulation in the urinary bladder and *Taenia coli*. *Br. J. Pharmacol.* 99:617-621; 1990.
- Inoue, K.; Koizumi, S.; Nakazawa, K.: Glutamate-evoked release of adenosine 5'-triphosphate causing an increase in intracellular calcium in hippocampal neurons. *Neuroreport* 6:437-440; 1995.
- Izquierdo, I.; Da Cunha, C.; Rosat, R.; Jerusalinsky, D.; Ferreira, M. B. C.; Medina, J. H.: Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. *Behav. Neural Biol.* 58:16-26; 1992.
- Izquierdo, I.; Quillfeldt, J. A.; Zanatta, M. S.; Quevedo, J.; Schaeffer, E.; Schmitz, P. K.; Medina, J. H.: Sequential involvement of the hippocampus and amygdala, the entorhinal cortex, and the posterior parietal cortex in memory formation and retrieval. *Eur. J. Neurosci.* 9:786-793; 1997.
- Izquierdo, I.; Medina, J. H.: Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63:19-32; 1995.
- Mahoney, C. W.; Azzi, A.; Huang, K.-P.: Effects of suramin, an anti-human immunodeficiency virus reverse transcriptase agent, on protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 265:5424-5428; 1990.
- Martí, E.; Cantí, C.; de Aranda, I. G.; Miralles, F.; Solsona, C.: Action of suramin upon ecto-apyrase activity and synaptic depression of *Torpedo* electric organ. *Br. J. Pharmacol.* 118:1232-1236; 1996.
- Meghji, P.; Burnstock, G.: Inhibition of extracellular degradation in endothelial cells. *Life Sci.* 57:762-771; 1995.
- Nagy, A.; Delgado-Escueta, A. V.: Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using a nontoxic isoosmotic gradient (Percoll). *J. Neurochem.* 43:1114-1123; 1984.
- Nakazawa, K.; Mohri, M.; Okada, Y.; Mori, M.: Reversible and selective antagonism by suramin of ATP-activated inward cur-

- rent in PC12 pheochromocytoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 101:224-226; 1990.
26. Ong, W. Y.; Motin, L. G.; Hansen, M. A.; Dias, L. S.; Ayrout, C.; Bennet, M. R.; Balcar, V. J.: P2 purinoceptor blocker suramin antagonizes NMDA receptors and protects against excitatory behavior caused by NMDA receptor agonist (RS)-(tetrazol-5-yl)-glycine in rats. *J. Neurosci. Res.* 49:627-638; 1997.
  27. Paxinos, G.; Watson, C.: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 1986.
  28. Phillis, J. W.; Wu, P. H.: The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16:187-239; 1981.
  29. Rose, S. P. R.: Memory, the brain Rosetta stone? *Concept. Neurosci.* 2:43-64; 1991.
  30. Sarkis, J. J. F.; Saltó, C.: Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26:871-876; 1991.
  31. Silinski, E. M.; Gerzanich, V.; Vanner, S. M.: ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *Br. J. Pharmacol.* 106:762-763; 1992.
  32. Wang T.-F.; Rosenberg, P. A.; Guidotti, G.: Characterization of brain ecto-apyrase: Evidence for only ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol. Brain Res.* 47:295-302; 1997.
  33. Wieraszko, A.; Seyfried, T. N.: ATP-induced potentiation in hippocampal slices. *Brain Res.* 49:356-359; 1989.
  34. Wieraszko, A.: Facilitation of hippocampal potentials by suramin. *J. Neurochem.* 64:1097-1101; 1995.
  35. Windscheif, U.: Purinoceptors: From history to recent progress. A review. *J. Pharmacol. Pharmacol.* 48:993-1011; 1996.
  36. Zanatta, M. S.; Schaeffer, E.; Schmitz, P. K.; Medina, J. H.; Quevedo, J.; Quillfeldt, J. A.; Izquierdo, I.: Sequential involvement of NMDA receptor-dependent processes in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. *Behav. Pharmacol.* 7:341-345; 1996.
  37. Ziganshin, A. U.; Ziganshina, L. E.; King, B. F.; Burnstock, G.: Characteristics of ecto-ATPase of *Xenopus* oocytes and inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. *Pflugers Arch.* 429:412-418; 1995.
  38. Zimmermann H.: Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49:589-618; 1996. 2:43-64; 1991.

**II.4. CAPÍTULO 4** -BONAN, C.D.; WALZ, R.; PEREIRA, G.S.; WORM, P.V.;  
BATTASTINI, A.M.O.; CAVALHEIRO, E.A.; IZQUIERDO,  
I.; SARKIS, J.J.F. Changes in synaptosomal ectonucleotidase  
activities in two rat models of temporal lobe epilepsy.  
Submetido a **Epilepsy Research**.

CHANGES IN SYNAPTOSOMAL ECTONUCLEOTIDASE ACTIVITIES IN TWO  
RAT MODELS OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

C.D. Bonan,<sup>1</sup> R. Walz,<sup>1</sup> G.S. Pereira,<sup>1</sup> P.V. Worm,<sup>1</sup> A.M.O. Battastini,<sup>1</sup> E.A.  
Cavalheiro,<sup>2</sup> I. Izquierdo<sup>1</sup> and J.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, Brasil.

<sup>2</sup>Neurologia Experimental, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

\* To whom to address reprint requests.

João José Freitas Sarkis, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-  
ANEXO, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. FAX: +55(51) 316-5535

e- mail address: [jj Sarkis@plug-in.com.br](mailto:jj Sarkis@plug-in.com.br).

## Abstract

Adenosine has been proposed as an endogenous anticonvulsant which can play an important role on the seizure initiation, propagation and arrest. Besides the release of adenosine *per se*, the ectonucleotidase pathway is an important metabolic source of extracellular adenosine. Here we evaluated ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex at different periods after induction of status epilepticus (SE) by intraperitoneal administration of pilocarpine or kainate. Ectonucleotidase activities from synaptosomes of hippocampus and cerebral cortex of rats were significantly increased at 48-52 hours, 7-9 days and 45-50 days after induction of SE by pilocarpine. In relation to kainate model, both hippocampal enzymes were enhanced at 7-9 days and 45-50 days, but only 5'-nucleotidase remains elevated at 100-110 days after the treatment. In cerebral cortex, an increase in ATP diphosphohydrolase was observed at 48-52 hours, 7-9 days and 45-50 days after induction of SE by kainate. However, 5'-nucleotidase activity only presented significant changes at 45-50 days and 100-110 days. Our results suggest that SE can induce late and prolonged changes in ectonucleotidases activities. The regulation of the ectonucleotidase pathway may play a modulatory role during the evolution of behavioral and pathophysiological changes related to temporal lobe epilepsy.

**KEYWORDS:** ATP diphosphohydrolase, 5'-nucleotidase, adenosine, kainate model, pilocarpine model, temporal lobe epilepsy.

## 1. Introduction

Adenosine is an endogenous nucleoside that possess anticonvulsant (Cavalheiro et al., 1987; Kostopoulos et al. 1989; During and Spencer, 1992) and neuroprotective properties (Turski et al., 1985; MacGregor et al., 1997). This action involves, probably the inhibition of seizure initiation and propagation “in vivo” and “in vitro” (Kostopoulos et al., 1989; Whitcomb et al., 1990), an effect which has been attributed by the activation of A<sub>1</sub> receptors (Brundege and Dunwiddie, 1997). In addition, adenosine has well established presynaptic inhibitory actions due to reduction in neurotransmitters release, including glutamate, dopamine, serotonin and acetylcholine (Ribeiro, 1995; Brundege and Dunwiddie, 1997). The ability of endogenous adenosine to diffuse locally and exert modulatory effects on independent pathways in hippocampus might suggests that this nucleoside could contribute to the phenomena of synaptic plasticity (Mendonça and Ribeiro, 1997)

Besides the release of adenosine as such, biochemical studies have established that a potential source of adenosine is its formation in the extracellular space from adenine nucleotides (Dunwiddie et al., 1997). ATP is a chemical mediator of fast excitatory transmission and its action occur through P<sub>2</sub>-purinoceptors (Abbrachio and Burnstock, 1998; Di Iorio et al., 1998). It has been showed that, on high-frequency (100 Hz) burst stimulation, the release of ATP is enhanced (Cunha et al., 1996) and marked increases in adenosine levels can occur under various conditions (e.g. hypoxia, ischemia, seizures) (Brundege and Dunwiddie, 1997; Braun et al., 1998). Once adenine nucleotides reach the extracellular space, they are subsequently converted to adenosine through the action of ecto-enzymes (Zimmermann, 1996, Bonan et al., 1998). We have demonstrated that ATP is hydrolyzed to adenosine in the synaptic cleft by the conjugated action of an ATP diphosphohydrolase (apyrase, ATPDase, EC 3.6.1.5) and a

5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (Sarkis and Saltó, 1991; Battastini et al., 1995). Ecto-ATP diphosphohydrolase is an enzyme able to hydrolyze adenine triphosphonucleoside (ATP) to its equivalent monophosphonucleoside (AMP) and inorganic phosphate. Then, AMP can produce adenosine by the action of an ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 1996). The recently cloned ecto-apyrase is a noncovalent tetrameric protein (Wang et al., 1998b) expressed in primary neurons and astrocytes (Wang et al., 1997), presenting a wide distribution in cerebral cortex, hippocampus, cerebellum, glial and endothelial cells (Wang et al., 1998a).

Human temporal lobe epilepsy (TLE) is associated with complex partial seizures that can produce secondarily generalized seizures and motor convulsions (Engel et al., 1997; Mathern et al., 1997). The pilocarpine and kainic acid models are useful animal models to investigate the development and neuropathology related with TLE. These models induce a prolonged SE, which causes neuronal loss, mossy fiber sprouting in hippocampus and spontaneous recurrent seizures (Cavalheiro et al., 1991; Mello et al., 1993; Ben-Ari, 1985; Cronin et al., 1992). Here we investigated the ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities at different times after induction of SE by pilocarpine and kainate models. These results can provide new information about biochemical events during the temporal evolution of long-lasting changes induced by both models studied.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Pilocarpine Model**

Female Wistar rats (age, 70-90 days; weight, 200-240 g) from our breeding stock were housed five to a cage, with water and food ad libitum. The animal house was kept on a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 am) at a temperature of  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ .



The pilocarpine model has been previously described (Cavalheiro et al., 1991; Mello et al., 1993). A total of 75 animals were injected with pilocarpine and monitored behaviorally for at least 6 hours. Total mortality was 40% and 4% did not develop SE. Only animals (42 rats) that evolved to SE characterized by generalized motor seizures were used. In summary, thirty minutes after subcutaneous pretreatment with scopolamine methylnitrate 1mg/Kg (to minimize peripheral cholinergic effects), a single dose of pilocarpine (350 mg/Kg, dissolved in saline) was injected intraperitoneally. After a pilocarpine injection, the animal became hypoactive; generalized convulsions and limbic SE usually occur 40-80 minutes after the injection. After a silent period of  $14 \pm 3.0$  days (ranging from 4-44 days), all animals developed spontaneous seizures (2-15 per month), characterizing the chronic period. There is no evidence of spontaneous remission for at least 6 months (Cavalheiro et al., 1991; Mello et al., 1993).

## 2.2. Kainate Model

In this model, female Wistar rats (age, 70-90 days; weight, 200-250 g) were maintained in the same conditions reported above. Kainate model has been described previously (Ben-Ari, 1985; Lothman et al., 1981; Cronin et al., 1992). A total of 60 animals were injected with kainate and monitored behaviorally for at least 6 hours. Total mortality was 21% and 9% of animals did not develop SE. Only animals that reached SE characterized by generalized motor seizures were used (42 rats) in the experiments. In summary, animals received a single dose of kainate intraperitoneally (10 mg/kg, dissolved in saline). During the first 20-30 minutes, they have "staring" spells. During the next 30 minutes animals had head nodding and several wet-dog shakes. One hour after kainic acid treatment, they have recurrent limbic motor seizures,

evolving to a full motor limbic SE. This model did not consistently induce spontaneous recurrent seizures (i.e. often < 50% of the treated rats were observed to have seizures) (Cronin et al., 1992).

### 2.3. Animal Preparation and Subcellular Fractionation

Animals were sacrificed by decapitation at different times after SE initiation (24-28 hours; 48-52 hours; 7-9 days, 45-50 days, 100-110 days). When chronic animals were tested, subcellular fractionation was prepared during interictal period. After removal, brains were placed into ice-cold isolation medium (320 mM sucrose, 5 mM HEPES, pH 7.5, and 0.1mM EDTA) and were cut longitudinally. Total hippocampi (100-110 mg of tissue) and total cerebral cortex (450-500 mg of tissue) of both hemispheres were immediately dissected on ice. In pilot experiments, we have determined that the vehicle (saline) or scopolamine injection did not alter the enzyme activities at the different times tested. Therefore, a group of naive rats were used as control and the subcellular fractionation and enzyme assays were carried out simultaneously with the kainate or pilocarpine treated-groups at the different times studied. The total hippocampi and cerebral cortex were gently homogenized in 5 and 10 volumes, respectively, of ice-cold isolation medium with a motor-driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described previously (Nagy and Delgado-Escueta, 1984). Briefly, 0.5 ml of the crude mitochondrial fraction was 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 washed twice at 15000 x g for 20 min with the same ice-cold medium to remove the contaminating Percoll and 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.

#### 2.4. Enzyme Assays

The reaction medium used to assay the ATP diphosphohydrolase activity 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 synaptosome preparation (10-20 µg protein) was added to the reaction mixture and preincubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP 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 100 µl samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) (Chan et al., 1986).

The reaction medium used to assay the 5'-nucleotidase activity contained 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M TRIS-HCl, pH 7.0 and 0.15 M sucrose in a final volume of 200µl (Heymann et al., 1984). The synaptosome preparation (10-20 µg protein) was preincubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was initiated by the addition of AMP to a final concentration of 1.0 mM and stopped by the addition of 200 µl of 10% trichloroacetic acid; 100µl samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) as described by Chan et al. (1986). In both enzyme assays, incubation times and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct nonenzymatic hydrolysis of the

substrates. All samples were run in duplicate. Protein was measured by the Coomassie Blue method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as standard.

## 2.5. Statistical Analysis

The data obtained for the enzyme activities are presented as mean  $\pm$  S.D. of a number of animals studied in each condition. The statistical analysis used for *in vivo* experiments was one-way ANOVA, followed by Duncan multiple range test. *In vitro* effect of convulsant drugs on ectonucleotidase activities was evaluated by Student's t-test.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference in both statistical analysis used.

## 3. Results

### 3.1. Ectonucleotidase activities after status epilepticus induced by pilocarpine

The effect of temporal evolution of pilocarpine model was evaluated on ecto-ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of rats. As showed in Figure 1A, there was a 78% increase in ATP hydrolysis in hippocampal synaptosomes of rats at 48-52 hours after the induction of SE. This increase reached the maximum value (86% increase) at 7-9 days after the SE when compared to the respective control group. The ATPase activity was kept high and then gradually decreased (36% increase in relation to control group) at 45-50 days after pilocarpine-induced SE. The results related to ADP hydrolysis by ATP diphosphohydrolase showed a significant 50% increase at 48-52 hours after the pilocarpine-induced SE. This increase attained a peak (187%) at 7-9 days after the induction of the SE and gradually decreased (37% increase in relation to control group)

at 45-50 days after the event (Fig.1A). The data obtained about 5'-nucleotidase showed a very similar profile when compared to ATP diphosphohydrolase. It is possible to observe a significant increase of 5'-nucleotidase activity at 48-52 hours (64%), 7-9 days (134%) and 45-50 days (99%) after the induction of SE (Fig 1A). Both ectonucleotidases activities did not change at 24-28 hours and 100-110 days after SE induced by pilocarpine in hippocampal synaptosomes of rats.

Since these ectonucleotidases are widely expressed in rat brain (Wang et al.,1998a), we also evaluate possible changes in these enzyme activities in synaptosomes from cerebral cortex after induction of SE by pilocarpine. In relation to ATP hydrolysis, a significant increase (34%) was observed only in the group tested at 48-52 hours after SE (Fig. 1B). However, under the same conditions, ADPase activity was significantly increased at 48-52 hours and 7-9 days after the SE (44% and 49%, respectively). The 5'-nucleotidase activity showed a significant peak of activity (104% increase) at 7-9 days and gradually decreased (62% increase) at 45-50 days after SE, recovering the normal activity at 100-110 days after the event (Fig. 1B). In order to avoid the influence of age in animals tested at 100-110 days after SE, we analyzed these enzyme activities in both structures, hippocampus and cerebral cortex, in naive animals with the same age (180-200 days). There was no significant difference in the ectonucleotidase activities when compared to younger control rats (age, 90-100 days) (data not shown).

### 3.2. Ectonucleotidase activities after SE induced by Kainate

There were no significant changes in the enzyme activities studied in hippocampal synaptosomes at 24-28 hours and 48-52 hours after induction of SE by kainate (Fig.2A). However, a significant increase in ATP (53%), ADP (114%) and AMP (31%) hydrolysis was observed at 7-9 days after SE. These effects remained

significant at 45-50 days after SE (46%, 80% and 131% for ATP, ADP and AMP, respectively) in hippocampal synaptosomes. However, the ATP and ADP hydrolysis promoted by ATP diphosphohydrolase gradually decreased, recovering the normal activity at 100-110 days after event (Fig. 2A). Respect to 5'-nucleotidase at the same period, it is still possible to observe a significant increase (60%) in AMP hydrolysis.

The same temporal analysis was performed in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats after status epilepticus induced by kainate. A significant increase of ATP diphosphohydrolase (23% and 20% for ATP and ADP, respectively) was observed at 48-52 hours after SE. However, under the same condition, there was no significant effect on 5'-nucleotidase (Fig. 2B). Figure 2B has also showed an increase of ATP (28%) and ADP (43%) hydrolysis at 7-9 days after the event. In the group tested at 45-50 days after SE, an increase in ectonucleotidase activities (42%, 46% and 94% for ATP, ADP and AMP, respectively) was also observed, but only 5'-nucleotidase activity remaining increased (41%) at 100-110 days after the event in synaptosomes from cerebral cortex of rats.

### 3.3. Effects *in vitro* of convulsant drugs on ectonucleotidase activities

In order to discard the influence of the residual drugs used to induce status epilepticus on the ectonucleotidase activities during early periods, we analyzed the effect *in vitro* of these drugs on ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase. The drugs and concentrations tested were 5 mM kainate, 10 mM pilocarpine, 0.5 mM scopolamine or 10 mM pilocarpine plus 0.5 mM scopolamine in both synaptosomal fractions analyzed. The results revealed no statistically significant alterations *in vitro* for ectonucleotidase activities in the presence of these drugs in synaptosomes from hippocampus or cerebral cortex of rats, suggesting that the increased nucleotide

hydrolysis is induced by the models and not by the drug administration (data not shown).

#### 4. Discussion

This work was performed in order to investigate possible changes in ectonucleotidases activities at different times after spontaneous recovering of status epilepticus induced by pilocarpine and kainate. The co-localization of the genes for human ecto-apyrase/CD39 (10q 23.1-24.1) and for the susceptibility to partial epilepsy (10q 22-24) suggest that a mutation of the ecto-apyrase gene might exert a significant role in the epilepsy (Malizewski et al. 1994; Ottmann et al., 1995; Wang et al., 1997). Our results have showed a substantial increase in ectonucleotidases activities in hippocampal synaptosomes between 48 h-50 days after SE induced by pilocarpine. In cerebral cortex, we observe an increase in ATP diphosphohydrolase activity at 48-52 hours after SE, but only ADP hydrolysis remaining increased at 7-9 days after the event. This result indicates the participation of an ATP diphosphohydrolase, since ADP is considered a substrate marker for this enzyme activity (Battastini et al., 1991; Sarkis and Saltó, 1991). However, it is important to note that the apparent temporal dissociation observed between both substrates (ATP and ADP) can be due to the simultaneous presence of two different enzymes involved in the nucleotide hydrolysis, an ATP diphosphohydrolase and an ecto-ATPase (Kegel et al., 1997). These enzymes have been identified in molecular terms and differ in their preference for the substrates. (Zimmermann, 1996). Both enzymes are expressed as ecto-enzymes in the brain, but their specific localization and interactions are still unknown.

In the kainic acid model, the results have showed a novel feature, that is the activation of AMP hydrolysis at 100-110 days after SE. It is interesting to observe that

the transient alterations and different time course of ectonucleotidases activities observed between the models could be due to differences in the behavioral course, including the time for the first spontaneous seizure (1-3 weeks in kainate model; 45-100 days in pilocarpine model), the number of animals that present chronic epilepsy (lower in the kainate treatment, often < 50% of the treated rats), as well pharmacological and histopathological findings specific for each model (Cavalheiro et al., 1995; Cronin et al., 1992).

The cellular pattern of expression of 5'-nucleotidase can vary substantially both with developing and on lesioning of nervous tissue (Zimmermann, 1996). Whereas 5'-nucleotidase in the adult nervous system has a predominantly glial association, it is transiently present also at synapses that are related to the regenerative sprouting responses and synaptogenesis in this system (Schoen et al., 1999). Thus, it appears that 5'-nucleotidase is expressed on reactive glial as well as neural cells (Zimmermann, 1996). The procedure used in our experiments for the isolation of synaptosomes allows the preparation of a synaptosomal-enriched fraction, but not immunopurified, presenting a glial and myelin contamination in the range of 0,3% (Nagy and Delgado-Escueta, 1984). Therefore, it is not possible exclude the glial contamination in our preparation. However, it is important to consider that, in all treatments studied, we prepare synaptosomal fractions from control group in the same conditions used to the treated group. Thus, independently of the localization of ecto-5'-nucleotidase, this enzyme activity was significantly increased after kainate or pilocarpine treatments.

Changes in other synaptosomal enzymes involved in ATP hydrolysis has been observed after the induction of SE. It has been showed alterations in synaptosomal ecto-ATPase in rat brain during prolonged SE induced by lithium and pilocarpine (Nagy et al., 1997). Nagy et al. (1990) also demonstrated that synaptosomal ecto-ATPase activity



is decreased in the anterior region of hippocampus (epileptogenic zone), but it is increased in the posterior zone (nonepileptogenic zone), containing CA3 and granule cells of dentate gyrus. A significant decrease in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was observed in the acute and silent period of pilocarpine model, but an increase of this activity was observed during the chronic period (Fernandes et al., 1996). Similar results was observed in hippocampus of rats treated with kainate (Anderson et al., 1994). Alterations in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity could promote a control of excitability, produced by release of  $\text{Ca}^{+2}$  and glutamate during seizures (Fernandes et al., 1996).

Although our findings did not showed a correlation between the extent of changes in ectonucleotidases activities and the extent of sprouting, we also cannot discard completely this possibility. Recently, Schoen et al. (1999) has showed that 5'-nucleotidase is present in synapses of aberrant mossy fibers in the inner molecular layer of the dentate gyrus of rats after seizures induced by systemic kainate treatment or electrical kindling. The expression of 5'-nucleotidase on synaptic membranes of sprouting mossy fibers could be an adaptive response of the epileptic hippocampus. Therefore, it is concluded that, in both the normal and epileptic hippocampus, 5'-nucleotidase is associated with axons capable of a plastic sprouting response (Shoen et al., 1999). The glycoprotein 5'-nucleotidase may help to stabilize a newly formed, sprouted synapse, due other non-enzymatic functions. 5'-nucleotidase is involved in signal transduction as differentiation antigen CD73. It may also serve cell recognition since it is attached to cell membrane by a glycosyl phosphatidylinositol anchor, carries the HNK-1 epitope during periods of synaptic maturation and binds to proteins of the extracellular matrix (Schoen et al., 1999). The involvement of the ATP diphosphohydrolase in the synaptic plasticity could be related to cell adhesion. Adhesion is a phenomenon often coupled to particular ATP diphosphohydrolases –

either directly via intrinsic ecto-ATP diphosphohydrolase activity exhibited by some known adhesion molecules, e.g. NCAM, or indirectly as shown by homotypic adhesion triggered by monoclonal antibodies against CD39, recently showed to be an ecto-ATP diphosphohydrolase (Dzhandzhugazyan et al., 1998). Immunohistochemical studies are in progress in our laboratory in order to observe the distribution of ectonucleotidases activities after induction of SE induced by kainate and pilocarpine models.

Our findings lead us to the hypothesis that an increase in ectonucleotidases activities could modulate the seizure activity in a time window (48h-110 days) after SE, contributing to production of extracellular adenosine, a known endogenous neuromodulator (During and Spencer, 1992, Brundege and Dunwiddie, 1997). If ATP is released in large amounts and for a long time, it may promote an dramatic increase in intracellular calcium levels mediated by  $P_{2X}$  receptors, that could represent a significant damage, as that induced by excess of glutamate (Edwards et al., 1992). If all members of ectonucleotidase pathway work at an elevated rate, an efficient removal of extracellular ATP and enhanced adenosine production could occur in this condition. Then, adenosine could modulate the release of a variety of neurotransmitters, including glutamate, acetylcholine, noradrenaline and dopamine (Brundege and Dunwiddie, 1997; Di Orio et al., 1998). In summary, after SE, an important adaptive plasticity of ectonucleotidase pathway could occur in order to decrease ATP levels, an excitatory neurotransmitter, and to increase adenosine levels, a neuroprotective compound. Recently, we have reported the participation of these ectonucleotidases in specific biochemical events related to memory acquisition and consolidation, suggesting an important role of this pathway in synaptic plasticity during physiologic events (Bonan et al., 1998).

In summary, the results reported here show significant alterations in the synaptosomal ectonucleotidase activities at different times after SE induced by two different animal models of epilepsy - pilocarpine and kainate models. The accurate knowledge of the modulation of these enzyme activities at different periods after SE could be used to design a novel class of drugs in the epilepsy treatment.

### **Acknowledgements**

This research was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil), Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX- Brazil), and from CAPES. C.D.B. was the recipient of a CNPq-Brazil fellowship. R.W. was the recipient of a CAPES-Brazil fellowship.

### **References**

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., 1998. Purinergic Signalling: Pathophysiological Roles. *Jpn. J. Pharmacol.* 78, 113-145.
- Anderson, W.R., Frank, J.E., Stahl, W.L., Maki, A.A., 1994. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is decreased in hippocampus of kainate-lesioned rats. *Epilepsy Res.* 17, 221-231.
- 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) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16, 1303-1310.
- 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 synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37, 209-219.

- Ben-Ari, Y., 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 12, 375-403.
- Bonan, C.D., Dias, M.M., Oliveira, A.M.O., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F., 1998. Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. *Neurochem. Res* 23, 979-984.
- 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.
- Braun, N., Zhu, Y., Kriegstein, J., Culmsee, C., Zimmermann, H., 1998. Upregulation of the enzyme chain after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci* 18, 4891-4900.
- Brundege, J.M., Dunwiddie, T.V., 1997. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Advances in Pharmacology* 39, 353-391.
- Cavalheiro, E.A., Calderazzo, L.S., Bortolotto, Z.A., Mello, L., Turski, L., 1987. Anticonvulsant role of adenosine. *Pol. J. Pharmacol.* 39, 5637-5643.
- Cavalheiro, E.A., Leite, J.P.L., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A., Ikonomidou, C., Turski, L., 1991. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32, 778-782.
- Cavalheiro, E.A., 1995. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital. J. Neurol. Sci.* 16, 33-37.
- Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.

- Cronin, J., Obenaus, A., Houser, C.R., Dudek, F.E., 1992. Electrophysiology of dentate granule cells after kainate-induced synaptic reorganization of the mossy fibers. *Brain Res*, 573, 305-310.
- Cunha, R.A., Vizi, E.S., Ribeiro, J.A. 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.
- Di Iorio, P., Ballerini, P., Caciagli, F., Ciccarelli, R., 1998. Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacol. Res.* 37, 169-178.
- Dunwiddie, T.W., Diao, L., Proctor, W.R., 1997. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 7673-7682.
- During, M.J., Spencer, D.D., 1992. Adenosine: a mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann. Neurol.* 32, 618-624.
- Dzhandzugazyan, K.N., Kirkin, A.F., Straten, P.T. & Zeuten, J. 1998. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Let.* 430, 227-230.
- Edwards, F.A., Gibb, A.J., Colquhoun, D., 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359, 144 -147.
- Engel, J.Jr., Williamson, P.D., Wieser, H.G. 1997. Mesial Temporal Lobe Epilepsy. In : Engel, J. and Pedley T.A. (Eds), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 2417-2426.
- Fernandes, M.J.S., Naffah-Mazzacoratti, M.G., Cavalheiro, E.A., 1996. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem. Int.* 28, 497-500.

- Heymann, D., Reddington, M., Kreutzberg, G.W., 1984. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43, 971-978.
- 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.
- Kostopoulos, G., Drapeau, C., Avoli, M., Olivier, A., Villemeure, J.G., 1989. Endogenous adenosine can reduce epileptiform activity in human epileptic cortex maintained in vitro. *Neurosci. Lett.* 106, 119-124.
- Lothman, E.W., Collins, R.C., Ferrendelli, J.A., 1981. Kainate-induced limbic seizures: electrophysiologic studies. *Neurology* 31, 806-812.
- MacGregor, D.G., Graham, D.I., Stone, T.W., 1997. The attenuation of kainate-induced neurotoxicity by chlormethiazole and its enhancement by dizocilpine, muscimol, and adenosine receptor agonists. *Exp. Neurol.* 148, 110-123.
- Maliszewski, C.R., Delespesse, G.J.T., Schoenborn, M.A., Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Nakakima, T., Baker, E., Sutherland G.R., Poindexter, K., Birks, C., Alpert, A., Friend, D., Gimpel, S.D., Gayle, III, R.B., 1994. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* 149, 3574-3583.
- Mathern, G.W., Babb, T.L., Armstrong, D.L., 1997. Hippocampal Sclerosis. In : Engel, J. and Pedley, T.A. (Eds), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 2417-2426.
- Mello, L.E.A.M., Cavalheiro, E.A., Tan, A.M., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Babb, T., Finch, D.M., 1993. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34, 985-995.

- Mendonça, A., Ribeiro, J.A., 1997. Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.* 60, 245-241.
- Nagy, A.K., Delgado-Escueta, A.V., 1984. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using a non toxic isoosmotic gradient (Percoll). *J. Neurochem.* 43, 1114-1123.
- Nagy, A.K., Houser, R.C., Delgado-Escueta, A.V., 1990. Synaptosomal ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of humans with focal epilepsy. *Brain Res.* 529, 192-201.
- Nagy, A.K., Walton, N.Y., Treiman, D.M., 1997. Reduced cortical ecto-ATPase activity in rat brains during prolonged status epilepticus induced by sequential administration by lithium and pilocarpine. *Mol. Chem. Neuropathol.* 31, 135-147.
- Ottman, R., Risch, N., Hauser, W.A., Pedley T.A., Lee, J.H., Barker-Cummings, C., Lustenberg, A., Nagle, K.J., Lee, S.K., Seheur, M.L., Neystat, M., Susser, M., Wilhelmssen, K.C., 1995. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nature Genet.* 10, 56-60.
- Ribeiro, J.A., 1995. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol. Toxicol.* 77, 299-305.
- 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.
- Schoen, S.W., Ebert, U. & Loscher, W., 1999. 5'-nucleotidase activity of mossy fibers in the dentate gyrus of normal and epileptic rats. *Neuroscience* 93, 519-526.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Ikonomidou, C., Mello, L.E.A.M., Bortolotto, Z.A., Turski, L., 1985. Effects of aminophylline and 2-chloroadenosine on seizures

- produced by plicarpine in rats: morphological and electroencephalographic correlates. *Brain Res.* 361, 309-323.
- Wang, T.-F., Rosenberg, P.A., Guidotti, G., 1997. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol. Brain Res.* 47, 295-302.
- Wang, T.-F., Guidotti, G., 1998a. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 790, 318-322.
- Wang, T-F, Ou, Y., Guidotti, G. 1998b. The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 273, 24814-24821.
- Whitcomb, K., Lupica, C.R., Rosen, J.B., Berman R.F., 1990. Adenosine involvement in postictal events in amygdala-kindled rats. *Epilepsy Res.* 6, 171-179.
- Zimmermann, H., 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49, 589-618.



## LEGENDS TO FIGURES

Fig.1: Effects of pilocarpine model on ATP (■), ADP (●) and AMP (▲) hydrolysis in synaptosomes from hippocampus (A) and cerebral cortex (B) at different times after the induction of status epilepticus in adult rats. The control activities in hippocampal synaptosomes were  $120.9 \pm 13$ ,  $42.4 \pm 7$  and  $15.8 \pm 3$  nmol Pi.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protein for ATP, ADP and AMP hydrolysis, respectively. The control activities in synaptosomes from cerebral cortex were  $142.8 \pm 12.3$ ,  $47 \pm 5.5$  and  $15.3 \pm 2.6$  nmol Pi.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protein for ATP, ADP and AMP hydrolysis, respectively. Bars represent means  $\pm$  S.D. of at least eight animals. (\*) ATP hydrolysis in treated-group significantly different from control ATP hydrolysis. (a) ADP hydrolysis in treated-group significantly different from control ADP hydrolysis. (b) AMP hydrolysis in treated-group significantly different from control AMP hydrolysis. ( $p < 0.05$ , Duncan Test).

Fig.2. Effect of kainate model on ATP (■), ADP (●) and AMP (▲) hydrolysis in synaptosomes from hippocampus (A) and cerebral cortex (B) at different times after the induction of status epilepticus in adult rats. The control activities in hippocampal synaptosomes were  $126.9 \pm 13.8$ ,  $42.6 \pm 8.2$  and  $16 \pm 2.8$  nmol Pi.min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> protein for ATP, ADP and AMP hydrolysis, respectively. The control activities in synaptosomes from cerebral cortex were  $144 \pm 13.5$ ,  $50 \pm 5.9$  and  $15.3 \pm 2.66$  nmol Pi.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protein for ATP, ADP and AMP hydrolysis, respectively. Bars represent means  $\pm$  S.D. of at least eight animals. (\*) ATP hydrolysis in treated-group significantly different from control ATP hydrolysis. (a) ADP hydrolysis in treated-group significantly different from control ADP hydrolysis. (b) AMP hydrolysis in treated-group significantly different from control AMP hydrolysis. ( $p < 0.05$ , Duncan Test).

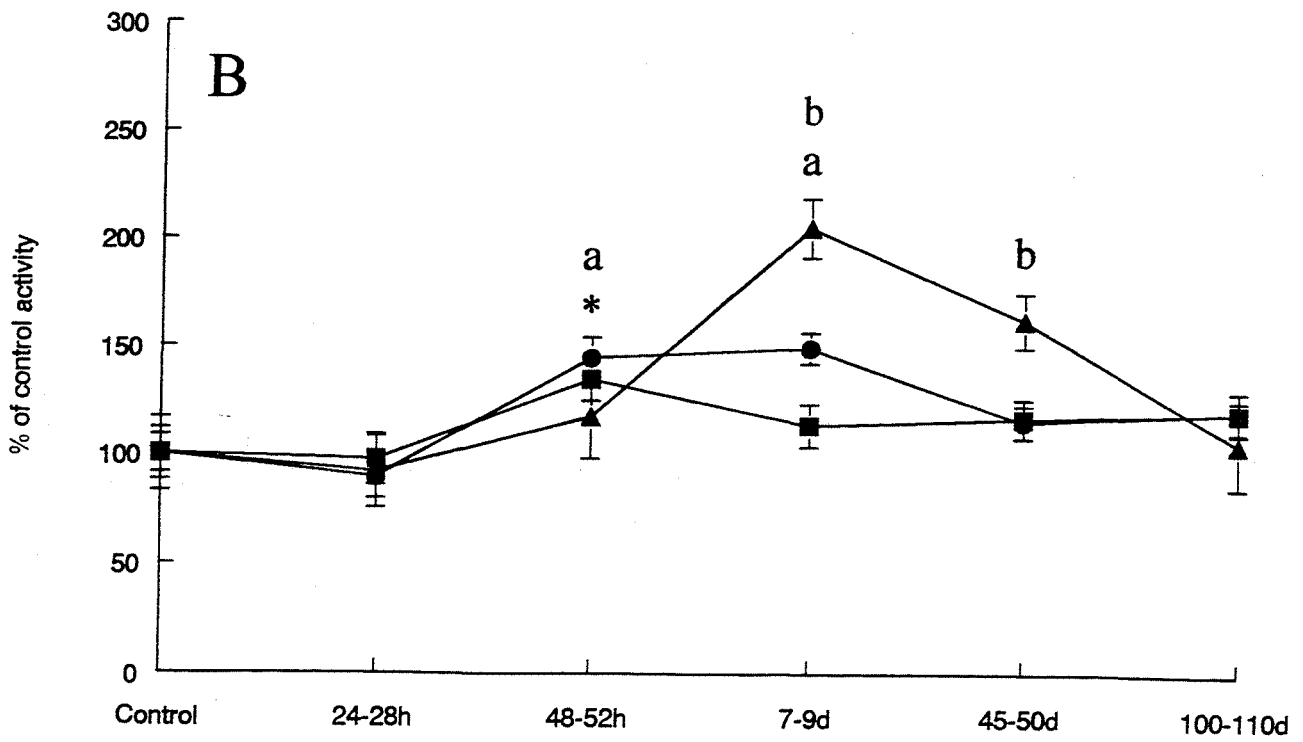
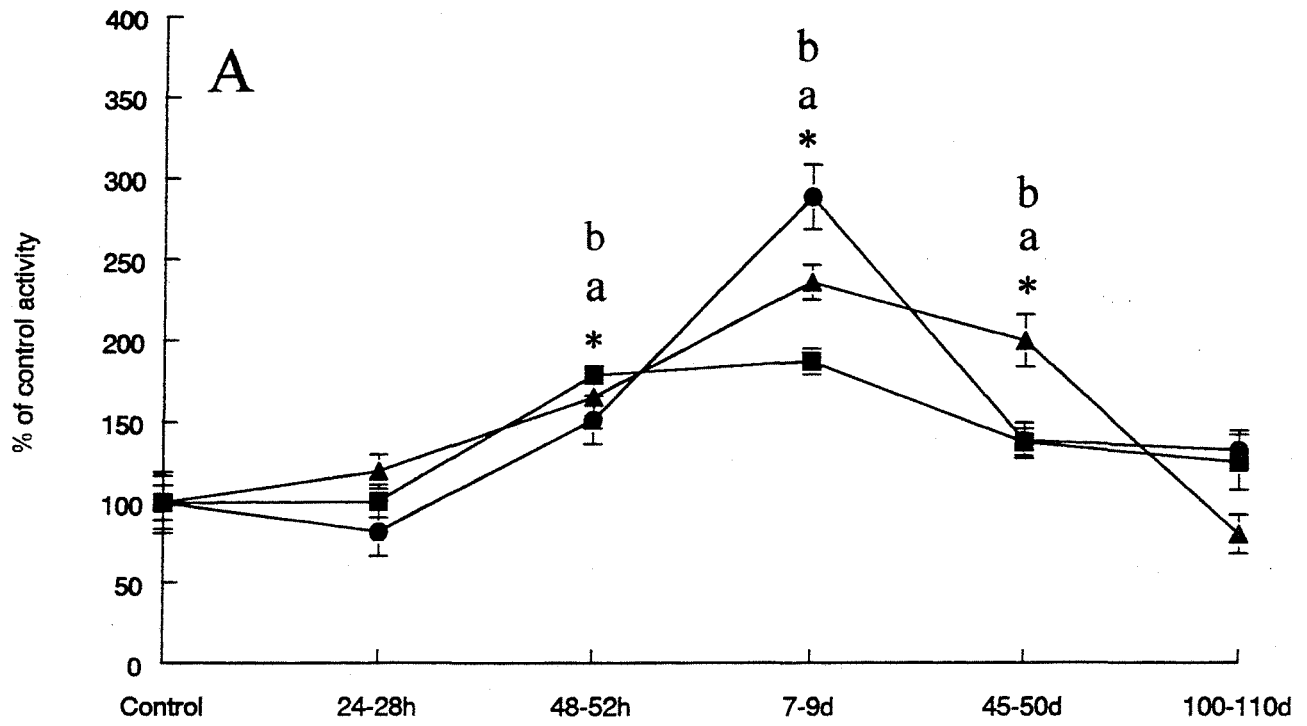


Figure 1 (Figura 4.1)

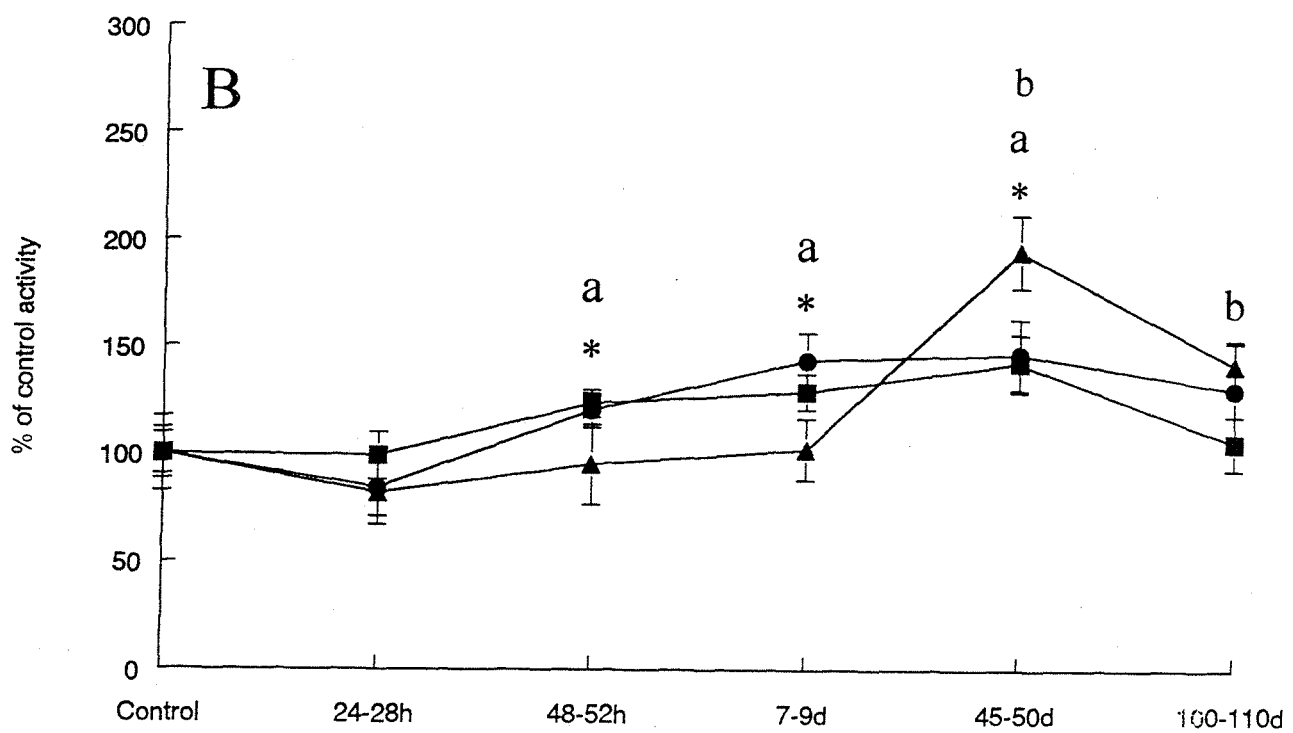
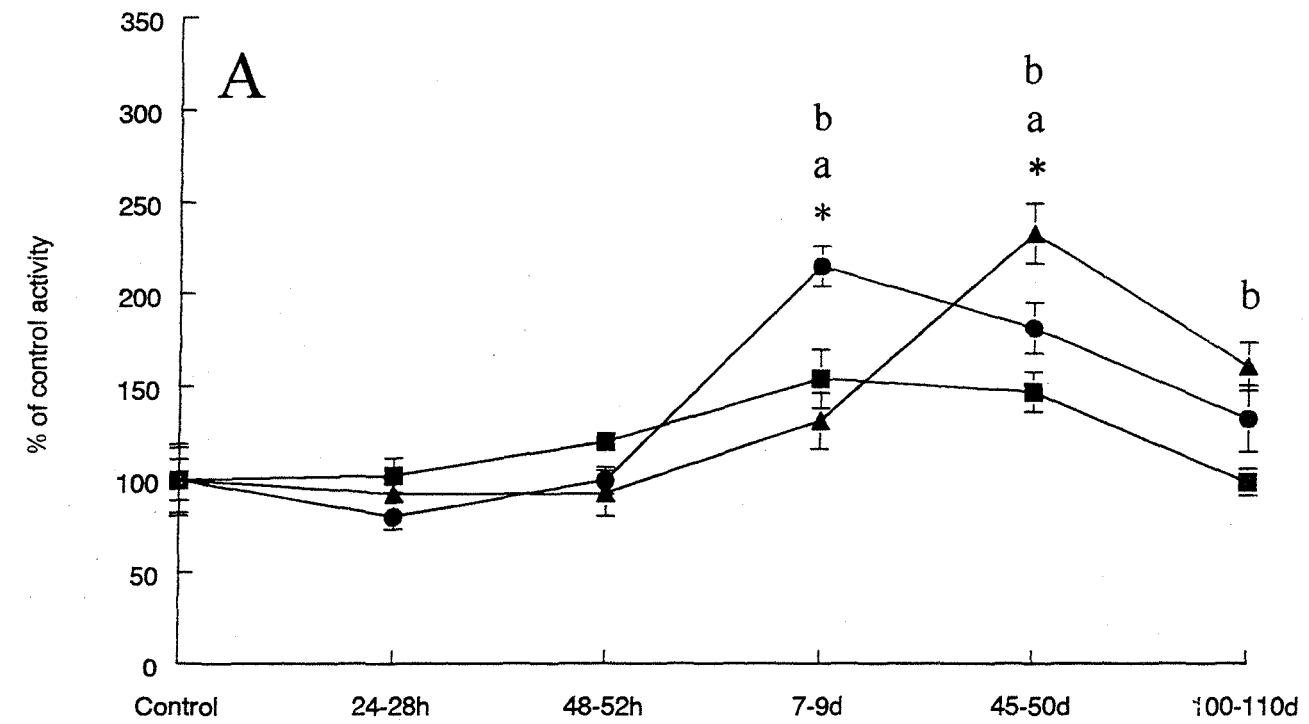


Figure 2 (Figura 4.2)

**II.5. CAPÍTULO 5** - BONAN, C.D; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, I. C.; WALZ, R.; BATTASTINI, A. M.O.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J. J.F.  
Altered ATP Hydrolysis Induced By Pentylenetetrazol Kindling  
In Rat Brain Synaptosomes. Submetido a **Neurochemical  
Research**

# **Altered ATP Hydrolysis Induced by Pentylentetrazol**

## **Kindling in Rat Brain Synaptosomes**

Carla D. Bonan,<sup>1</sup> Olavo B. Amaral,<sup>1</sup> Isabel C. Rockenbach,<sup>1</sup> Roger Walz,<sup>1</sup>  
Ana M.O. Battastini,<sup>1</sup> Iván Izquierdo<sup>1</sup> and João J.F. Sarkis<sup>1,2</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> To whom to address reprint requests: João José Freitas Sarkis, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-ANEXO, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

FAX: +55(51) 316-5535. Phone number: +55 51 316-5554

e-mail: [jj Sarkis@plug-in.com.br](mailto:jj Sarkis@plug-in.com.br).

Running Title: Ectonucleotidase Activities in Kindling

**ABSTRACT**

The ectonucleotidase pathway is an important metabolic source of extracellular adenosine. Adenosine has potent anticonvulsant effects on various models of epilepsy. One of these models is pentylenetetrazol (PTZ) kindling, in which repeated administration of subconvulsive doses of this drug induces progressive intensification of seizure activity. In this study, we examine the effect of a single convulsive injection (60 mg/kg, i.p.) or 10 successive (35 mg/kg, i.p.) injections of PTZ on synaptosomal ectonucleotidases. Our results have showed that no changes in ectonucleotidase activities were seen at 0, 1, and 24 h or at 5 days after a single convulsive PTZ injection. However, in PTZ-kindling, rats showing greater resistance to the kindling present an increase in ATP hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex (44% and 28%, respectively). These results suggest that changes in nucleotide hydrolysis may represent an important mechanism in the modulation of chronic epileptic activity in this model.

**KEYWORDS:** Ectonucleotidases; adenosine; epilepsy; kindling; pentylenetetrazol.

## INTRODUCTION

Kindling is widely used as an experimental model of epilepsy and epileptogenesis. This model refers to a phenomenon whereby repeated administration of subconvulsant electrical or chemical stimuli gradually raises the sensibility of the animal until the same stimuli eventually becomes convulsive (1,2,3). One of the most used ways to induce kindling is by repeated systemic administration of subconvulsant doses of pentylenetetrazol (PTZ), which induce progressive intensification of seizure activity in response to the same dose (3). The enhanced seizure susceptibility induced by kindling is a long-lasting, possibly permanent, alteration in the neuronal excitability, probably attributable to plastic changes in the synaptic efficacy (4).

Several studies have shown that adenosine, an ubiquitous neuromodulator, has potent anticonvulsant effects on various models of epilepsy, including PTZ-kindling (5,6,7). Adenosine agonists administered either centrally or peripherally reduce seizure activity in a dose-dependent manner in electrically kindled rats (8). Furthermore, an increased affinity for adenosine A<sub>1</sub> receptors has been observed in the hippocampus of kindled rats, suggesting that these receptors might play a role in the anticonvulsant effects of adenosine analogues (9). Furthermore, drugs capable of reducing adenosine effects, such as methylxanthines, increase the duration of seizures and facilitate the development of status epilepticus (10).

Changes in adenosine-mediated neuromodulation involve not only adenosine release as such, but also the extracellular catabolism of ATP by ectonucleotidases, which constitute a highly sophisticated pathway designed to control the rate, amount and timing of adenosine formation (11,12). We have demonstrated that ATP is hydrolyzed to adenosine in the synaptic cleft by the conjugated action of an ATP diphosphohydrolase (apyrase, ATPDase, EC 3.6.1.5) and a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5)

(13, 14). Furthermore, Kegel et al. (15) have shown that an ecto-ATPase is co-expressed with an ecto-ATP diphosphohydrolase in rat brain. These enzymes had previously been identified in biochemical terms and were shown to hydrolyze a variety of purine and pyrimidine nucleoside di- and triphosphates (12, 16). However, ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase differ in their preference for nucleoside 5'-diphosphates. Ecto-ATPase has a very high preference for ATP over ADP whereas the related ecto-ATP diphosphohydrolase (ecto-apyrase) hydrolyzes both substrates equally as well (12). Subsequently, an ecto-5'-nucleotidase participates, together with ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase, in the complete hydrolysis of ATP to adenosine in the synaptic cleft (16,17) Ecto-5'-nucleotidase is an enzyme able to hydrolyze monophosphonucleosides (AMP) to its equivalent nucleoside (adenosine) and inorganic phosphate (16).

Considering that adenosine seems to play a role in the modulation of seizure behavior induced by kindling, we decided to study if changes in ectonucleotidases can be involved in this process. For this purpose, we examined the effect of single or chronic injections of PTZ on synaptosomal ectonucleotidases in the hippocampus and cerebral cortex of rats. These results can provide new information on the role of these ectonucleotidases in the control of adenosine levels and their participation in the evolution of behavioral long-lasting changes induced by kindling.



## EXPERIMENTAL PROCEDURE

### Treatments

Female Wistar rats aged 60-80 days and weighing 150-200g from our breeding stock were housed five per cage, with water and food ad libitum. The animal house was kept on a 12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 am) at a temperature of  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations published by the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior.

The kindling procedure consisted of i.p. injections of PTZ (35 mg/kg, dissolved in saline 0.9% saline) once every 48 h, totaling 10 stimulations. After each PTZ injection the animals were observed for 30 minutes and the seizure pattern was recorded. Kindling stage was classified according to the stages proposed by Racine (2): stage 0, no response; 1, facial clonus; 2, head nodding; 3, forelimb clonus; 4, rearing with bilateral forelimb clonus; 5, rearing and falling with bilateral forelimb clonus. The control group was injected with saline (10 injections with the same periodicity and volume as the treated group) and was also observed for 30 minutes (18). All the injections were performed between 11:00 am and 15:00 h. After the stimulation period animals were divided into two groups according to the mean of the 3 highest kindling stages attained in the last five injections. The kindled animals were divided in group I (GI), with mean kindling stage lower than 3 in all animals, and group II (GII), with mean stage higher than 3 for all animals. Animals were killed by decapitation 5 days after the last injection, the brain structures were removed and subcellular fractionation and enzyme assays were carried out.

In the acute seizure model, animals received a single convulsive injection of PTZ (60 mg/kg, i.p., dissolved in 0.9% saline). Only animals showing tonic-clonic seizures within 4 min after the injection were included in the study. Treated groups were

killed by decapitation either immediately, 1h, 24 h or 5 days after the injection. Control group was injected with saline and the subcellular fractionation and enzyme assays were carried out simultaneously with treated-groups at the different times studied.

#### Subcellular Fractionation

After removal, brains were placed into ice-cold isolation medium (320 mM sucrose, 5 mM HEPES, pH 7.5, and 0.1mM EDTA) and hippocampi and cerebral cortex were immediately dissected on ice. The hippocampi and cerebral cortex were gently homogenized in 5 and 10 volumes, respectively, of ice-cold isolation medium with a motor-driven Teflon-glass homogenizer. Synaptosomes were isolated as described previously (19). Briefly, 0.5 ml of the crude mitochondrial fraction was 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 washed twice at 15000 x g for 20 min with the same ice-cold medium to remove the contaminating Percoll and 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 (17) 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 synaptosome preparation (10-20 µg protein) was added to the reaction mixture and preincubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to a final concentration of 1.0 mM and

stopped by the addition of 200  $\mu$ l 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 minutes and 100  $\mu$ l samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) (20).

The reaction medium used to assay the 5'-nucleotidase activity contained 10 mM  $MgCl_2$ , 0.15 M sucrose and 0.1 M TRIS-HCl, pH 7.0 in a final volume of 200 $\mu$ l (21). The synaptosome preparation (10-20  $\mu$ g protein) was preincubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was initiated by the addition of AMP to a final concentration of 1.0 mM and stopped by the addition of 200  $\mu$ l of 10% trichloroacetic acid; 100 $\mu$ l samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) (21). In both enzyme assays, incubation times and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct nonenzymatic hydrolysis of the substrates. All samples were run in duplicate. Protein was measured by the Coomassie Blue method (22), using bovine serum albumin as standard.

#### Statistical Analysis

The data obtained for the enzyme activities are presented as mean  $\pm$  S.D. of a number of animals studied in each condition. The statistical analysis used for kindling experiments was one-way ANOVA, followed by Duncan multiple range test. In the acute treatment, results were compared using two-way ANOVA and one-way ANOVA, followed by Duncan multiple range test. A  $p < 0.05$  was considered to represent a significant difference in statistical analysis used.

## RESULTS

As expected, PTZ-kindling produced a progressive increase in the seizure susceptibility of the treated rats. After the 10<sup>th</sup> stimulation, animals were divided into two groups: group I (GI, n=6), in which the mean kindling stage was 3 or less, with an overall average of 2.35 and group II (GII, n=6), which the mean stage was greater than 3 and averaged 4.2. Enzyme assays in these animals showed a significant increase in ATP hydrolysis (44%) among the less severely kindled animals (GI) in synaptosomes from hippocampus, when compared to the saline group ( $p<0.05$ ) (Table 1). The kindling-resistant group (GI) also presented a significant increase (28%) on ATP hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex (Table 2). On the other hand, the kindling-susceptible group (GII), which presented more severe seizures, did not show significant changes in ATP hydrolysis in both fractions analyzed (hippocampus and cerebral cortex), when compared to controls (Tables 1 and 2). There was no significant difference in ADP and AMP hydrolysis among the three groups (Tables 1 and 2).

In order to examine if the altered ATP hydrolysis was due to the chronic, long-lasting changes induced by kindling or to a residual effect of the drug, we investigated the enzymes activities at different times after a single acute seizure induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.). Following the single PTZ injection, all animals included in the study presented generalized tonic-clonic seizures. However, our results did not show significant differences in ATP, ADP and AMP hydrolysis in all times tested (immediately, 1h, 24h and 5 days) after the single injection of PTZ in synaptosomes of hippocampus and cerebral cortex (data not shown).

## DISCUSSION

The present study demonstrates that animals more resistant to kindling present an increased ATP hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex when compared to controls. It is important to note that different effects for ATP and ADP hydrolysis can be due to the simultaneous presence of two different enzymes involved in the nucleotide hydrolysis, an ATP diphosphohydrolase and an ecto-ATPase (15). These results suggest the participation of an ecto-ATPase, since ATP is considered a substrate marker for this enzyme activity (12, 16).

Changes in synaptosomal enzymes involved in ATP hydrolysis has been observed in other animal models of epilepsy. For example, alterations in synaptosomal ecto-ATPase in rat brain are observed during prolonged *status epilepticus* induced by lithium and pilocarpine (23). Furthermore, Fernandes et al. (24) have showed a significant decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in acute *status epilepticus* and in the silent period of the pilocarpine model of epilepsy. However, a significant increase in this activity was observed during the chronic period, characterized by recurrent spontaneous seizures (24). Similar results were observed in hippocampus of rats treated with kainate (25). Alterations in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity could promote a control of the excitability produced by the release of Ca<sup>+2</sup> and glutamate during seizures (25).

If ATP is released in large amounts and for a long time, it may promote an dramatic increase in intracellular calcium levels mediated by P<sub>2X</sub> receptors, which could cause significant damage similar to that induced by excessive glutamate release (26). Our findings lead us to the hypothesis that an increase in ATP hydrolysis by an ecto-ATPase, can produce high levels of ADP. Then ADP, by stechiometric effect, is hydrolyzed by conjugate action of ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase, producing an increase in adenosine levels. Thus, the activation of ecto-ATPase, the first

enzyme of the pathway, can contribute to production of extracellular adenosine, a known endogenous neuromodulator (5, 27). In summary, adaptive plasticity in chronic epilepsy could involve a decrease in the levels of ATP, an excitatory neurotransmitter, and a simultaneous increase in the concentration of adenosine, a neuroprotective compound. This balance can be achieved through a delicate regulation of the amount of ATP released and of the rate of ATP hydrolysis by ectoenzymes.

It has been proposed that adenosine and adenosine analogs possess anticonvulsant properties, an effect which has been attributed by the activation of  $A_1$  receptors (28). Single and repeated pentylentetrazol-induced convulsions are associated with significant increases of  $A_1$  adenosine receptors in the cortex, hippocampus and cerebellum (29). It has been suggested that the increase in  $A_1$  receptor number, along with the rise in nucleotidase activities and cerebral adenosine levels, might contribute to prevent cellular excitation and to maintain the neuronal homeostasis (30).

Therefore, our results suggest that an increase in ATP hydrolysis and, consequently, in adenosine levels could represent an important compensatory mechanism in the development of chronic epilepsy, explaining why these changes are associated with less severe seizures in PTZ-kindled rats. These alterations seems to be related to the chronic, long-lasting synaptic plasticity induced by kindling, since such changes are not seen in acute seizures, which are insufficient to activate these mechanisms. When these results are considered together, they support the hypothesis that changes in nucleotide hydrolysis may represent an important mechanism in the modulation of epileptogenesis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil), Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX- Brazil), and from Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil). C.D.B. was the recipient of a CNPq-Brazil fellowship. R.W. was the recipient of a CAPES-Brazil fellowship.

## REFERENCES

1. Goddard, G.V. 1967. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214: 1020-1027.
2. Racine, R. 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor Seizures. *Electroenceph. Clin. Neurophysiology* 32: 281-294.
3. Mason, C.R., and Cooper, R.M. 1972. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain- damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. *Epilepsia* 13: 663-674.
4. Cain, D.P. 1989. Long-term potentiation and kindling: how similar are the mechanisms. *Trends Neurosci.* 12: 6-10.
5. Brundage, J.M., and Dunwiddie, T.V. 1997. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Advances in Pharmacology* 39: 353-391.
6. Chin, J.H. 1989. Adenosine receptors in brain: neuromodulation and role in epilepsy. *Ann. Neurol* 26: 695-698.
7. Zhang, G., Franklin, P.H., and Murray, T.F. 1994. Activation of adenosine A<sub>1</sub> receptors underlies anticonvulsant effect of CGS 21860. *Eur. J. Pharmacol.* 225: 239-252.

8. Berman , R.F., Jarvis M.F., and Lupica, C.R. 1990. Adenosine involvement in kindling seizures. Pages 423-440, *in* J.A. Wada (ed.) Kindling 4, Plenum Press, New York.
9. Simonato, M., Varani, K., Muzzolini, A., Bianchi, C., Beani, L., and Borea P.A. 1994. Adenosine A<sub>1</sub> receptors in the rat brain in the kindling model of epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 265: 121-124.
10. Dragunow, M. 1986 Adenosine: the brain's natural anticonvulsant? *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 128-130.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Moreira, C.M., Bonan, C.D., Sarkis, J.J.F., and Dias, R.D. 1995. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 209-219.
15. Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C.R., and Zimmermann, H. 1997. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacol.* 36: 1189-1200.



16. Zimmermann, H. 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49: 589-618.
17. Battastini, A.M.O., Rocha, J.B.T., Barcellos, C.K., Dias, R.D., and Sarkis, J.J.F. 1991. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16: 1303-1310.
18. Amaral, O.B., Tramontina, J., Viana, M., de Paris, F., Quevedo, J., Roesler, R. and Walz, R. 1998. Effects of kindling on performance and retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Med. Sci. Res.* 26: 799-801.
19. 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.
20. Chan, K., Delfert, D., and Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157: 375-380.
21. Heymann, D., Reddington, M., and Kreutzberg, G.W. 1984. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43: 971-978.
22. 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.
23. Nagy, A.K., Walton, N.Y., and Treiman, D.M. 1997. Reduced cortical ecto-ATPase activity in rat brains during prolonged status epilepticus induced by sequential administration by lithium and pilocarpine. *Mol. Chem. Neuropathol.* 31: 135-147.
24. Fernandes, M.J.S., Naffah-Mazzacoratti, M.G., and Cavalheiro, E.A. 1996. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem. Int.* 28: 497-500.

25. Anderson, W.R., Frank, J.E., Stahl, W.L., and Maki, A.A. 1994. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is decreased in hippocampus of kainate-lesioned rats. *Epilepsy Res.* 17: 221-231.
26. Edwards, F.A., Gibb, A.J., and Colquhoun, D. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359: 144 -147.
27. During, M.J., and Spencer, D.D. 1992. Adenosine: a mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann. Neurol.* 32: 618-624.
28. Young, D., and Dragunow, M. 1994. Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience* 58: 245-261.
29. Angelatou, F., Pagonopoulou, O., and Kostopoulos, G.1990. Alterations of the A<sub>1</sub> receptors in different mouse brain areas after pentylenetetrazol induced seizures, but not in the epileptic mutant mouse 'tottering'. *Brain Res* 534: 251-256.
30. Daval, J.L., and Werck, M.C.1993. Autoradiographic changes in brain adenosine A<sub>1</sub> receptors and their coupling to G-proteins following seizures in the developing rat. *Dev. Brain Res.* 59: 1237-1247.

TABLE 1. Effect of PTZ kindling on ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus of rats

Group	N	Hippocampus		
		ATP	ADP	AMP
Saline	6	101,7 ± 15,8	37,2 ± 9,8	18,4 ± 3,1
G I	6	146,6 ± 8,03 <sup>a</sup>	40,9 ± 10,8	17,1 ± 1,8
G II	6	120,4 ± 20,1	41,4 ± 4,3	20,4 ± 3,9

Data are expressed as mean ± S.D. Saline= saline-injected group. GI= kindling-resistant group (mean kindling stage < 3, average= 2,35). GII= kindling-sensitive group (mean Kindling stage >3, average = 4,2).

<sup>a</sup> Significantly different from the saline group (p <0.05) by one-way ANOVA , followed by Duncan multiple range test.

TABLE 2. Effect of PTZ kindling on ectonucleotidase activities in synaptosomes from cerebral cortex of rats

Group	N	Cerebral Cortex		
		ATP	ADP	AMP
Saline	6	120,9 ± 14,1	40,1 ± 7,9	17,8 ± 4,1
G I	6	154,7 ± 14,2 <sup>a</sup>	44,1 ± 9,3	15,9 ± 3,8
G II	6	119,7 ± 25,7	47,6 ± 11,1	13,3 ± 2,7

Data are expressed as mean ± S.D. Saline= saline-injected group. GI= kindling-resistant group (mean kindling stage < 3, average= 2,35). GII= kindling-sensitive group (mean Kindling stage >3, average = 4,2).

<sup>a</sup> Significantly different from the saline group ( $p < 0.05$ ) by one-way ANOVA, followed by Duncan multiple range test.

### III. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que as atividades ectonucleotidásicas apresentam-se alteradas em condições fisiológicas e patológicas capazes de induzir plasticidade sináptica, tais como a memória e a epilepsia.

As atividades de hidrólise de ATP e ADP pela ATP difosfoidrolase e AMP pela 5'-nucleotidase de sinaptossomas de hipocampo de ratos apresentam-se inibidas imediatamente após a sessão de treino em uma tarefa de esquiva inibitória. Entretanto, somente a hidrólise de ATP foi significativamente inibida 30 minutos após a sessão de treino, não ocorrendo mudanças significativas com relação à hidrólise de ADP (Capítulo 1, BONAN et al., 1998). Sabendo-se que a cadeia de ectonucleotidases é uma via desenvolvida para regular a velocidade de degradação de ATP e, conseqüentemente, a formação de adenosina, algumas considerações poderiam ser feitas.

O hipocampo tem sido bastante utilizado como um modelo para o estudo de mecanismos envolvidos na plasticidade sináptica, tais como potenciação de longa duração (LTP), que ocorre após breve estimulação de alta frequência (100Hz) (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Este fenômeno se constitui em uma modificação da eficiência sináptica de longa duração, que tem sido repetidamente proposto como um modelo molecular envolvido em certas formas de aprendizado e memória (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO & MEDINA, 1995).

Estudos têm demonstrado que o ATP exógeno, em baixas concentrações, é capaz de induzir potenciação sináptica em fatias hipocampais (WIERASZKO & SEYFRIED, 1989; FUJII et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que a liberação de ATP é maior após estímulo de alta frequência (100Hz) utilizado para induzir LTP, e que, nesta condição, a via das ectonucleotidases contribui para a formação de adenosina extracelular (CUNHA et al., 1996). O mecanismo através do qual o ATP extracelular

induz a formação de uma LTP estável ainda não foi esclarecido. O envolvimento do sistema purinérgico na potenciação de longa-duração foi investigado através do uso de análogos rígidos do ATP (WIERASZKO & SEYFRIED, 1994). O ATP extracelular e seu análogo ATP- $\gamma$ -S amplificaram permanentemente a magnitude das respostas analisadas, mas outros análogos rígidos do ATP não exerceram a mesma ação agonista. Portanto, estes autores sugerem que o mecanismo em questão poderia envolver um novo tipo de receptor purinérgico ainda não descrito ou que a hidrólise do fosfato-gama de ATP ou ATP- $\gamma$ -S poderia ser uma condição necessária para a ocorrência deste efeito (WIERASZKO & SEYFRIED, 1994). A remoção do fosfato-gama destes nucleotídeos poderia envolver a participação de uma ecto-ATPase, uma ecto-ATP difosfohidrolase ou uma ecto-proteína quinase. O ATP poderia ser utilizado como substrato por ATPases e proteínas quinases. Entretanto, ATP- $\gamma$ -S é um análogo de ATP que resiste a ação de uma ATPase, mas pode ser usado por quinases na tiofosforilação de proteínas (WIERASZKO & SEYFRIED, 1994). Estudos demonstram que o ATP extracelular atua como substrato para que as ecto-proteínas quinases possam induzir a LTP através da fosforilação de domínios extracelulares de proteínas de membrana na região CA1 do hipocampo (FUJII et al., 1995). Recentemente, foi demonstrado que um efeito cooperativo entre o ATP extracelular e os receptores NMDA é necessário para desencadear os processos envolvidos na indução da LTP, possivelmente através do uso do ATP extracelular na fosforilação dos domínios extracelulares dos receptores NMDA (FUJII et al., 1999).

Com base nestas considerações, nossos resultados sugerem que a inibição significativa observada sobre as atividades da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase, imediatamente após a sessão de treino na tarefa de esquivas inibitória, poderia diminuir a hidrólise de ATP, aumentando sua disponibilidade na fenda sináptica (Capítulo 1,

BONAN et al., 1998). O aumento dos níveis de ATP extracelular pode desempenhar um papel importante na modulação da eficiência sináptica através de diversos mecanismos. Apesar dos efeitos diversos dos agonistas de ATP sobre a LTP (WIERASZKO & SEYFRIED, 1994), é possível especularmos que o aumento na disponibilidade de ATP sugerida por nossos resultados permite a ativação de receptores P2, tais como P2X e P2Y. Embora o subtipo de purinoreceptores envolvido na indução da LTP ainda não tenha sido determinado, a ativação dos receptores ionotrópicos P2X poderia conduzir ao influxo de cálcio extracelular. Além disso, a ativação dos receptores metabotrópicos P2Y acoplados à proteína G/ Fosfolipase C poderia produzir os segundos mensageiros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, 1993; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). O inositol-1,4,5-trifosfato promove a mobilização do cálcio do retículo endoplasmático, elevando a concentração de cálcio no citosol e o diacilglicerol ativa proteínas quinases, como a PKC (NESTLER et al., 1984).

A ativação do sistema purinérgico pelo ATP extracelular, em conjunto com receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, AMPA e receptores metabotrópicos, poderia contribuir para a indução e manutenção de fenômenos plásticos, tais como LTP, e/ou para ativação dos mecanismos de aquisição da memória.

Outro mecanismo através do qual o ATP extracelular pode influenciar a eficiência sináptica é a fosforilação de proteínas extracelulares. 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, 1997). Estudos descreveram que, durante a fase de indução da LTP, ocorre fosforilação de proteínas extracelulares, sendo o ATP extracelular utilizado como substrato (CHEN et al., 1996). A diminuição na hidrólise de ATP observada em nossos resultados após a

sessão de treino na tarefa de esquivar inibitória também poderia aumentar a disponibilidade do ATP extracelular como substrato para uma ecto-proteína quinase (Capítulo 1, BONAN et al., 1998). As alterações observadas imediatamente após a sessão de treino sugerem um importante papel destas enzimas, modulando as concentrações extracelulares de ATP e, conseqüentemente, a ativação das vias de sinalização dependentes de ATP extracelular, como por exemplo a fosforilação de proteínas extracelulares.

A inibição observada somente para a hidrólise do ATP, 30 minutos após a sessão de treino na tarefa de esquivar inibitória, nos conduz a sugerir uma possível participação de uma ecto-ATPase, uma vez que não houve mudança paralela na hidrólise de ADP neste mesmo período (Capítulo 1, BONAN et al., 1998). A possibilidade deste efeito ser mediado por uma ecto-ATPase não pode ser excluída, pois tem sido demonstrada a sua co-expressão juntamente com uma ATP difosfohidrolase em cérebro de ratos (KEGEL et al., 1997). Outra possibilidade que deve ser considerada é o fato de que estudos demonstram que a adição de um anticorpo específico para proteína quinase C inibe a ecto-fosforilação de proteínas, bloqueando a estabilização da LTP 30-40 minutos após a estimulação (CHEN et al., 1996). Considerando que a ecto-fosforilação é fundamental para a manutenção da LTP 30-40 minutos após sua indução, é possível sugerir que a diminuição na hidrólise de ATP, 30 minutos após a sessão de treino (Capítulo 1, BONAN et al., 1998), poderia contribuir para a manutenção dos processos de plasticidade sináptica envolvidos na formação da memória.

Independentemente da questão da hidrólise do ATP ser inibida por uma ATP difosfohidrolase e, conseqüentemente, o nucleotídeo poder ser utilizado como um substrato para ecto-proteína quinase, uma importante conseqüência do metabolismo do ATP extracelular é a formação de adenosina. Tem sido sugerido que a adenosina exerce



um papel inibitório, o qual foi mediado pela interação com os receptores  $A_1$ , e um efeito excitatório sobre a LTP, mediado pelos receptores  $A_2$  (DE MENDONÇA & RIBEIRO, 1994). Portanto, os níveis de adenosina endógena são capazes de modular mecanismos de plasticidade sináptica, como a LTP. Entretanto, foi demonstrado que a aplicação de um antagonista seletivo de receptor  $A_{2A}$ , SCH 58261, facilitou a retenção quando administrado imediatamente após o treino em uma tarefa de esquiva passiva, sugerindo que o receptor  $A_{2A}$  poderia diminuir a retenção da memória de esquiva passiva (KOPF et al., 1999). A inibição das atividades ectonucleotídicas imediatamente após o treino (BONAN et al., 1998, Capítulo 1 e 2) poderia reduzir os níveis de adenosina na fenda sináptica, prejudicando sua ligação nos receptores  $A_{2A}$ , que apresentam uma menor afinidade para adenosina, e desta forma, contribuindo para a aquisição da memória de esquiva.

Uma vez que as alterações observadas imediatamente após a sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória sugeriam a participação destas enzimas na aquisição da memória, nós investigamos possíveis alterações das ectonucleotidases após a sessão de teste, no sentido de analisar uma possível relação com a evocação da tarefa. Nossos resultados não demonstraram alterações significativas após a sessão de teste, sugerindo o envolvimento das ectonucleotidases na aquisição, mas não na evocação da memória de esquiva inibitória.

Na tentativa de investigar a possível participação da via das ectonucleotidases na fase de consolidação da memória, nós avaliamos estas atividades enzimáticas em períodos de tempo mais prolongados, como por exemplo 3 e 6 horas após a sessão de treino. Além disso, sabe-se que no período pós-treino, o hipocampo opera em conjunto com a amígdala (IZQUIERDO & MEDINA, 1997) e, após 30 a 60 minutos, com o córtex entorrinal e córtex parietal (IZQUIERDO et al., 1997). Por este motivo, nós

investigamos esta cadeia enzimática em outras estruturas cerebrais além do hipocampo, como córtex entorrinal e córtex parietal, as quais também atuam na formação da memória de esquiva inibitória. Nossos resultados demonstraram uma inibição significativa da ATP difosfoidrolase imediatamente após o treino em sinaptossomas de córtex entorrinal (Capítulo 2). O córtex entorrinal processa muitos tipos de memória e possivelmente está envolvido na integração da informação processada no hipocampo durante e após a sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória (IZQUIERDO et al., 1997). Portanto, é importante considerar que o efeito inibitório observado sobre a atividade da ATP difosfoidrolase em hipocampo e córtex entorrinal sugere uma ação integrada das ectonucleotidases de ambas as estruturas como um dos eventos bioquímicos necessários para a aquisição da memória (BONAN et al., 1998; Capítulo 1 e 2). Com relação ao córtex parietal, não foram observadas alterações nas ectonucleotidases nos períodos de tempo analisados, sugerindo que a modulação destas atividades enzimáticas em córtex parietal não parece ser necessária para a memória de esquiva inibitória (Capítulo 2).

O provável mecanismo de modulação das ectonucleotidases após o aprendizado nesta tarefa permanece a ser elucidado. Tal modulação provavelmente não envolve síntese protéica nas alterações que foram observadas imediatamente após o treino, não havendo tempo suficiente para a ocorrência de uma síntese protéica alterada neste grupo (0 minutos). Portanto, parece bastante provável que tal regulação poderia envolver um mecanismo de modulação covalente, como a fosforilação. Entre os diversos eventos bioquímicos desencadeados pelo aprendizado na tarefa de esquiva inibitória, é possível observar um aumento da atividade da PKG, CaMKII, PKC e PKA imediatamente após a sessão treino e um novo pico de atividade da PKA 3 horas após a sessão de treino (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Recentemente, nosso laboratório apresentou

evidências indicando que a ATP difosfoidrolase trata-se de uma proteína fosforilada, sugerindo uma possível modulação desta atividade enzimática por fosforilação (WINK, 1999). Além disso, a análise da seqüência de aminoácidos da ecto-apirase apresenta um sítio para proteína quinase dependente de AMPc ou GMPc, quatro sítios de fosforilação para PKC e dois sítios de fosforilação para caseína quinase (SMITH & KIRLEY, 1998). A proteína quinase C, caseína quinase II e proteína quinase dependente de AMPc têm também sido identificadas como ecto-proteínas quinases (CHEN et al., 1996; WALTER et al., 1996), o que poderia tornar a enzima susceptível a modificações funcionais mediadas por ecto-fosforilação. Além disso, a porção C-terminal da ecto-apirase consiste de 20 aminoácidos, com sítios intracelulares para PKC e proteína quinase dependente de AMPc ou GMPc, possibilitando modificações pós-translacionais da proteína também do lado citoplasmático (SMITH & KIRLEY, 1998).

Com relação à atividade da ecto-5'-nucleotidase em sistema nervoso central, ainda não há evidências de que esta atividade seja modulada por fosforilação. Entretanto, em músculo cardíaco, tem sido vastamente estudada a ativação da ecto-5'-nucleotidase por PKC (SATO et al., 1997; KITAKAZE et al., 1997).

É importante salientar a ocorrência da ativação de proteínas quinases específicas em alguns períodos de tempo após a sessão de treino na tarefa de esquivas inibitória (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). A estrutura da ATP difosfoidrolase apresenta sítios de fosforilação para algumas destas proteínas quinases, tais como a PKC, cuja atividade aumenta imediatamente e 30 minutos após a sessão de treino (BERNABEU et al., 1995; CAMMAROTA et al., 1997) e a PKA, cuja atividade aumenta imediatamente e 3-6 horas após o treino (BERNABEU et al., 1997). É interessante ressaltar que as alterações observadas nestas atividades quinásicas após a sessão de treino coincidem com aquelas observadas sobre as ectonucleotidases hipocâmpais (Capítulo 1 e 2, BONAN et al.,

1998) e sobre a ATP difosfohidrolase de sinaptossomas de córtex entorrinal de ratos (Capítulo 2). Tal coincidência sugere que a modulação da via das ectonucleotidases, nesta condição, seja mediada por fosforilação.

Portanto, alterações nas atividades ectonucleotidásicas específicas ao aprendizado e tempo-dependentes ocorrem após o treino da tarefa de esquivas inibitória. Estes estudos constituem as primeiras evidências de que as ectonucleotidases podem estar envolvidas em específicos eventos bioquímicos relacionados à aquisição e consolidação da memória de uma tarefa aversiva (Capítulo 1 e 2, BONAN et al., 1998).

É portanto fundamental que sejam realizados estudos adicionais para confirmar com clareza qual o mecanismo de regulação capaz de modular estas atividades enzimáticas, bem como um maior detalhamento de suas funções em outras estruturas cerebrais também envolvidas na formação da memória (amígdala, córtex pré-frontal, córtex cingulado) e em outros tipos de aprendizado menos aversivos.

Apesar dos efeitos de análogos rígidos de ATP e antagonistas de purinoreceptores P2 serem bastante diversos nos mecanismos de plasticidade sináptica (WIERASZKO & SEYFRIED, 1994; WIERASZKO, 1995), nós investigamos o efeito da infusão intra-hipocampal de suramina na retenção da tarefa de esquivas inibitória em ratos (Capítulo 3, BONAN et al., 1999). A idéia de testar esta droga surgiu a partir da análise dos seguintes pontos: 1) A suramina é um antagonista não seletivo de purinoreceptores P2 e também atua como um inibidor de ecto-ATPases e ecto-ATPases de diversas fontes (MARTÍ et al., 1996; RALEVIC & BURNOSTOCK, 1998); 2) Apesar da sua ação antagonista em P2X e P2Y, a suramina promoveu uma amplificação dos potenciais excitatórios pós-sinápticos em fatias hipocâmpais, facilitando a indução da LTP (WIERASZKO, 1995); 3) Nossos resultados anteriores demonstraram que as

ectonucleotidases hipocampais estão inibidas após o treino na tarefa de esquiva inibitória (Capítulo 1 e 2, BONAN et al., 1998).

Nossa hipótese nos conduziu a pensar que a administração de suramina, um inibidor de ectonucleotidases, poderia potencializar a inibição da apirase observada após a aquisição da memória de esquiva inibitória (Capítulo 1, BONAN et al., 1998), aumentando os níveis de ATP e promovendo uma facilitação na retenção desta tarefa. Desta forma, nosso objetivo era compreender um pouco melhor o envolvimento do sistema purinérgico e das ectonucleotidases na formação e processamento da memória.

Entretanto, deveríamos confirmar o efeito inibitório da suramina sobre a apirase hipocampal, uma vez que não havia nenhum estudo demonstrando o efeito *in vitro* desta droga sobre a apirase de sistema nervoso central. Nossos resultados demonstraram que a inibição promovida pela suramina foi concentração-dependente, do tipo não competitivo, com valores de  $K_i$  (72,8 $\mu$ M e 109  $\mu$ M para ATP e ADP, respectivamente) muito próximos àqueles descritos para apirases de outras fontes (Capítulo 3, BONAN et al., 1999).

Após esta confirmação, realizamos a infusão intra-hipocampal de diferentes concentrações de suramina imediatamente após a sessão de treino e analisamos a retenção da tarefa. O efeito amnésico promovido pela suramina foi inesperado, demonstrando que a administração intra-hipocampal desta droga prejudica a retenção da tarefa de uma forma dose-dependente (Capítulo 3, BONAN et al., 1999). Esta condição pode ser produzida devido ao amplo espectro de efeitos biológicos da suramina, por exemplo, agindo como antagonista de receptores P2 e NMDA (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998) e como inibidor das enzimas que metabolizam o ATP (MARTÍ, 1996; Capítulo 3, BONAN et al., 1999). Considerando que a suramina bloqueia receptores P2 e NMDA, o efeito amnésico desta droga pode estar relacionado com o

bloqueio do influxo de cálcio através destes receptores, fator fundamental para o disparo dos mecanismos de aquisição da memória (IZQUIERDO & MEDINA, 1995).

Outro aspecto que deve ser considerado é que a dissociação observada entre os efeitos da suramina sobre a LTP (WIERASZKO, 1995) e os dados comportamentais (Capítulo 3, BONAN et al., 1999) pode estar relacionada com um fenômeno denominado saturação da LTP. Este fenômeno demonstra que a expressão máxima da LTP em uma população de sinapses (saturação) poderia produzir prejuízos no aprendizado e na memória (BARNES et al., 1994). Tal fenômeno está fundamentado na idéia de que as redes neurais armazenam a informação através de uma distribuição específica de forças sinápticas (HEBB, 1949), a qual poderia ser rompida pela saturação da sua capacidade para LTP (BARNES et al., 1994). Com base nestas considerações é possível especular que, nas doses usadas em nossos estudos comportamentais, a potenciação induzida pela suramina resultou na saturação da LTP em uma população de sinapses, o que poderia produzir um significativo déficit de memória e aprendizado.

A utilidade da suramina como um inibidor da apirase hipocampal é questionável, uma vez que esta droga possui diversos efeitos biológicos, tais como antagonizando receptores P2 e NMDA. Outro aspecto a ser analisado é o fato de enzimas de degradação de nucleotídeos extracelulares e os receptores P2 possuem domínios de ligação similares, assim suramina pode tanto alterar a degradação de ATP e/ou bloquear a neurotransmissão purinérgica. A compreensão da importância do sistema purinérgico e das ectonucleotidases em fenômenos de plasticidade sináptica e nos mecanismos de formação da memória passa necessariamente pela busca de agonistas, antagonistas e inibidores mais específicos para este sistema, no sentido de evitar a influência de outros sistemas neurotransmissores nos efeitos observados.

Considerando que as ectonucleotidases regulam os níveis extracelulares de ATP e adenosina, os quais podem agir na modulação da plasticidade sináptica em condições fisiológicas, como na memória e LTP, tornou-se importante investigar essas atividades enzimáticas em situações patológicas, como a epilepsia, também capazes de produzir plasticidade sináptica (Capítulo 4 e 5).

Diversos estudos têm considerado a adenosina um importante anti-convulsivante endógeno, devido à sua ação neuromoduladora, mediada através da ativação de receptores A<sub>1</sub> (CHIN, 1989; KOSTOPOULOS et al., 1989; DURING & SPENCER, 1992). Além da liberação de adenosina como tal, uma importante fonte de adenosina é originada a partir do metabolismo de nucleotídeos no espaço extracelular (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997). Atualmente, existem poucos dados na literatura a respeito do comportamento das atividades ectonucleotídicas na epilepsia.

Em 1990, NAGY et al. demonstraram que a atividade ecto-ATPásica estava diminuída em sinaptossomas de córtex cerebral, mas encontrava-se substancialmente aumentada em hipocampo posterior de humanos epiléticos. Recentemente, uma redução na atividade da ecto-ATPase de sinaptossomas de córtex cerebral de ratos foi observada após estado epilético induzido por lítio e pilocarpina (NAGY et al., 1997).

Na tentativa de aumentar nossa compreensão a respeito das possíveis alterações das ectonucleotidases na epilepsia, investigamos o efeito de diferentes modelos animais de epilepsia sobre as atividades da ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase de sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral de ratos.

No Capítulo 4, nós demonstramos os efeitos da indução de epilepsia pelos modelo da pilocarpina e do modelo do ácido cáinico sobre as atividades ectonucleotídicas. Estes modelos são bastante utilizados para investigar o desenvolvimento e a neuropatologia relacionados à epilepsia de lobo temporal. Nossos

resultados demonstram uma ativação significativa das ectonucleotidasas após a indução do estado epiléptico. Este efeito foi bastante similar tanto em sinaptossomas de hipocampo como em córtex cerebral de ratos (Capítulo 4). Entretanto, é importante notar que a aparente dissociação temporal entre os efeitos observados para a hidrólise de ATP e ADP em córtex cerebral pode ser devido à presença de duas enzimas diferentes envolvidas na hidrólise de nucleotídeos, uma ecto-ATP difosfohidrolase e uma ecto-ATPase.

Neste modelo, as alterações nas atividades iniciam 48-52h, atingem um pico máximo 7-9 dias e apresentam alterações menos significativas 45-50 dias após o estado epiléptico induzido por pilocarpina (Capítulo 4). Sabe-se que durante o período silencioso do modelo, que varia entre 4 a 44 dias, os animais não desenvolvem crises (CAVALHEIRO et al., 1995). O período silencioso representa um intervalo de tempo onde ocorre uma ativa reorganização e brotamento sinápticos. Durante este período, intervenções terapêuticas podem deter ou redirecionar a reorganização sináptica, bem como prevenir a epileptogênese (CAVALHEIRO, 1995). Isto nos conduz à hipótese de que a ativação da via das ectonucleotidasas pode ser considerada um dos mecanismos bioquímicos modulados como consequência da reorganização sináptica e plasticidade característica deste período. Entretanto, 100-110 dias após a indução do estado epiléptico, quando os animais estão no período crônico do modelo, caracterizado por crises espontâneas recorrentes, as atividades enzimáticas não apresentam mudanças significativas (Capítulo 4).

Com relação ao modelo do ácido caínico, um aumento nas atividades ectonucleotidásicas também foi observado. Entretanto, em sinaptossomas de hipocampo, foi observada uma ativação mais tardia destas atividades, iniciando-se 7-9 dias e estendendo-se até 45-50 dias após a indução do estado epiléptico. Com relação a



este modelo, um novo aspecto deve ser considerado, que é o aumento na hidrólise do AMP, 100-110 dias após a indução do estado epiléptico (Capítulo 4).

As alterações transitórias bem como o perfil das mudanças observadas entre os modelos poderiam ocorrer devido a diferenças no desenvolvimento das alterações comportamentais específicas para cada modelo, que incluem o tempo para a primeira crise espontânea (1-3 semanas no modelo do ácido caínico; 45 dias-100 dias no modelo da pilocarpina), bem como com relação ao número de animais que desenvolvem epilepsia crônica (< 50% dos ratos tratados no modelo do ácido caínico) (CAVALHEIRO et al., 1982; CRONIN & DUDEK, 1988; CRONIN et al., 1992). Tais diferenças também poderiam estar relacionadas a mudanças morfológicas progressivas e ao dano neuronal específico de cada modelo (perda neuronal, gliose, brotamento axonal e reorganização sináptica). O modelo da pilocarpina produziu degeneração neuronal na regiões CA4 e CA3 do hipocampo dorsal, mas a degeneração não foi observada na região CA1 (TURSKI et al., 1983). Isto representa uma clara diferença em relação ao modelo do ácido caínico, uma vez que a degeneração da região CA1 é proeminente em ratos, 24 horas após a injeção de ácido caínico (BEN-ARI, 1985). Isto indica que os mecanismos hipocampais são diferentemente envolvidos nos efeitos convulsivantes induzidos por ácido caínico e pilocarpina (TURSKI et al., 1983). Também devem ser consideradas as características farmacológicas de cada modelo. Ambos os modelos induzem ao dano neuronal devido a um efeito citotóxico, envolvendo receptores glutamatérgicos e o influxo de cálcio (AVANZINI et al., 1997). Entretanto, no modelo da pilocarpina, a estimulação excessiva dos receptores colinérgicos muscarínicos conduz ao início da atividade convulsiva no sistema límbico, estado epiléptico e dano neuronal (CAVALHEIRO, 1995). Já no modelo do ácido caínico, o início da atividade convulsiva é atribuído a seu efeito direto em receptores para aminoácidos excitatórios

no hipocampo, devido à alta concentração de receptores de ácido cáinico nesta região (BEN-ARI, 1985; AVANZINI et al., 1997).

Apesar destes modelos induzirem ao dano neuronal e brotamento de fibras musgosas no hipocampo, as diferenças comportamentais, histopatológicas e farmacológicas específicas de cada modelo podem ter colaborado para as diferenças temporais observadas nas atividades ectonucleotidásicas. Portanto, nosso estudo demonstra que alterações bioquímicas, como diferenças temporais no metabolismo de nucleotídeos extracelulares, também podem ser observadas entre os modelos analisados.

Embora nosso estudo não permita estabelecer uma correlação entre as alterações nas atividades ectonucleotidásicas e extensão dos brotamentos de fibras musgosas induzidas pelos modelos, nós também não podemos descartar completamente esta possibilidade. Após uma lesão, a 5'-nucleotidase é detectada não somente em microglia ou astrócitos, mas é transitoriamente presente nas sinapses que estão relacionadas a respostas de brotamento regenerativo e sinaptogênese (SCHOEN & KREUTZBERG, 1994). Recentemente, um estudo de SCHOEN et al. (1999) mostrou que a 5'-nucleotidase está presente nas sinapses de fibras musgosas na camada molecular interna do giro denteado de ratos após tratamento com ácido cáinico ou kindling, sendo menos detectada no grupo controle. Neste estudo, os autores propõe que a 5'-nucleotidase está associada a axônios capazes de produzir respostas plásticas em hipocampo de ratos normais e epilépticos. A expressão de 5'-nucleotidase em membranas sinápticas de brotamentos de fibras musgosas poderia ser uma resposta de adaptação do hipocampo de animais epilépticos a esta condição (SHOEN et al., 1999).

Analisando nossos resultados, é possível especular que a ativação da via das ectonucleotidases também poderia corresponder a uma resposta de adaptação do hipocampo e córtex cerebral. Tal adaptação poderia contribuir para a remoção eficiente

de ATP, um neurotransmissor excitatório, e aumentar a produção de adenosina, um composto neuromodulador. O ATP extracelular também tem sido proposto como um composto citotóxico. Se o ATP é liberado e em quantidades grandes e por um período de tempo prolongado, ele pode causar um acúmulo de cálcio intracelular mediado pela ativação de receptores P2X, o que poderia ser tão prejudicial quanto aquele induzido pelo excesso de glutamato (EDWARDS et al., 1992; BRAUN et al., 1998). Portanto, uma ativação das ectonucleotidases poderia neutralizar este efeito.

Além disso, um dos principais fatores de sobrevivência neuronal é um reabastecimento eficiente dos estoques de ATP depletados. Uma hidrólise eficiente de ATP até adenosina poderia fornecer o nucleosídeo que, após sua recaptação por um sistema de transporte bidirecional, poderia ser utilizado para a síntese de nucleotídeos (BRAUN et al., 1998). Existe uma série de trabalhos que discutem o papel neuroprotetor da adenosina extracelular em diminuir a liberação de aminoácidos citotóxicos ou como uma agente vasodilatador (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997).

A adenosina poderia agir como neuroprotetor por inibir a liberação de uma variedade de neurotransmissores, tais como glutamato, acetilcolina, noradrenalina e dopamina, um efeito mediado pela ativação de receptores  $A_1$  (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997; DI ORIO et al., 1998). Recentemente, foi demonstrado que a administração intra-hipocampal de agonistas de receptor  $A_1$  e  $A_{2A}$  não protegeu o dano neuronal produzido por cainato (JONES et al., 1998). Estes autores propõe que os níveis de adenosina poderiam aumentar significativamente como resultado da excitotoxicidade induzida pelo cainato, de forma que a ativação de receptores  $A_{2A}$ , de baixa afinidade para adenosina, poderia prejudicar a função neuroprotetora do receptor  $A_1$ . Portanto, uma outra possibilidade que não pode ser descartada é o fato de que a ativação das ectonucleotidases poderia contribuir para um aumento significativo nos níveis de

adenosina, a ponto de permitir a ativação de receptores  $A_{2A}$ , evitando o efeito neuroprotetor dos receptores  $A_1$ . Desta forma, o aumento das atividades ectonucleotídicas poderia ser uma alteração bioquímica característica da plasticidade desenvolvida por cada modelo, contribuindo para as mudanças morfológicas e comportamentais observadas após a indução do estado epiléptico.

Portanto, nossos resultados nos conduzem a pensar em dois papéis para estas atividades ectonucleotídicas que, apesar de contraditórios, não podem deixar de ser considerados. Nossos resultados podem sugerir um papel neuroprotetor para estas atividades, no sentido de aumentar a degradação de ATP, um neurotransmissor excitatório. Entretanto, o aumento destas atividades enzimática poderia desempenhar um papel prejudicial, pois ao aumentar substancialmente os níveis de adenosina, ocorreria a ativação dos receptores  $A_{2A}$  de baixa afinidade, prejudicando o efeito neuroprotetor mediado pelos receptores  $A_1$ . Estudos posteriores com a quantificação dos níveis de adenosina nos diferentes modelos e períodos de tempo após a indução do estado epiléptico contribuirão para compreensão do papel desempenhado por esta cadeia enzimática.

Tem sido demonstrado que a adenosina e seus análogos tem efeitos anti-convulsivantes em vários modelos de epilepsia, incluindo o modelo de kindling. No capítulo 5, nossos resultados demonstraram um aumento na hidrólise de ATP em sinaptossomas de hipocampo e de córtex cerebral de ratos que desenvolveram crises menos severas em resposta ao kindling (estágio de kindling  $< 3$ , segundo RACINE, 1972). Entretanto, animais com crises mais severas (estágio de kindling  $>3$ , segundo RACINE, 1972) não apresentaram alterações significativas nas atividades ectonucleotídicas (Capítulo 5). Estes resultados sugerem a participação de uma ecto-

ATPase, desde que essas alterações foram observadas somente com relação à hidrólise de ATP (ZIMMERMANN, 1999).

O aumento na hidrólise de ATP por uma ecto-ATPase pode produzir um aumento nos níveis de ADP, o qual por efeito estequiométrico, pode aumentar a atividade das enzimas ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase. Desta forma, a ativação da ecto-ATPase, a primeira enzima na via de degradação de ATP até adenosina, poderia contribuir para um aumento do último metabólito, o neuromodulador adenosina.

Estas alterações parecem estar relacionadas à plasticidade sináptica crônica e de longa duração induzida pelo modelo de kindling, desde que tais mudanças não foram observadas após a indução de crises agudas, as quais foram incapazes de ativar estes mecanismos. De qualquer forma, parece existir uma relação entre intensidade de crise induzida pelo kindling e hidrólise de ATP. É possível especular que animais mais resistentes ao kindling apresentam a hidrólise de ATP aumentada, no sentido de remover este neurotransmissor excitatório. Enquanto que, animais com crises mais severas e, portanto, mais suscetíveis ao kindling, não apresentaram tal alteração. Esta diferença pode estar relacionada com a plasticidade específica desencadeada pelo modelo ou a características inerentes dos animais utilizados.

Estudos têm demonstrado que crises convulsivas únicas e repetidas induzidas por pentilenetetrazol estão associadas a um aumento significativo no número total de receptores  $A_1$  (ANGELATOU et al., 1990). Além disso, a afinidade de receptores  $A_1$  está aumentada após indução de kindling por estimulação elétrica (SIMONATO et al., 1994). Portanto, um aumento nos níveis de adenosina associado a um aumento no número de receptores  $A_1$  poderia representar uma resposta fisiológica compensatória, no sentido de prevenir a excitabilidade celular e manter a homeostase neuronal (DAVAL & WERCK, 1993). Nossos resultados sugerem que mudanças nas atividades

ectonucleotidásicas podem representar um dos mecanismos envolvidos no controle do desenvolvimento da atividade convulsiva.

O mecanismo de modulação das ectonucleotidases após a indução dos diferentes modelos animais de epilepsia permanece a ser elucidado. Como discutido anteriormente, nos experimentos com a tarefa de memória, a fosforilação poderia estar envolvida em tal regulação. Entretanto, nos resultados relacionados à epilepsia, como as alterações foram mais tardias (após 48-52h) e bastante prolongadas (até 45-50 dias ou 100-110 dias), é possível sugerir uma alteração na síntese da enzima nestas condições.

A presente demonstração de que as ectonucleotidases apresentam suas atividades diferentemente alteradas após a aquisição de uma tarefa de memória ou após a indução de diferentes modelos de epilepsia, viabiliza a sugestão de que estas enzimas possam atuar na regulação da atividade sináptica, no sentido de controlar os níveis de ATP e adenosina, de acordo com o tipo de plasticidade sináptica desenvolvida, seja em condições fisiológica ou patológicas.

Certamente, estudos futuros contribuirão significativamente para a identificação do mecanismo de modulação destas enzimas em diferentes condições, bem como para aumentar nossa compreensão sobre seu papel funcional na plasticidade sináptica.

#### IV. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem observar que as ectonucleotidases apresentam suas atividades diferentemente alteradas em condições fisiológicas e patológicas, como na memória e na epilepsia. A inibição das ectonucleotidases após a aquisição de uma tarefa de memória, ou a ativação destas atividades enzimáticas após a indução de epilepsia por diferentes modelos, sugere que estas enzimas podem atuar na regulação da atividade sináptica, controlando os níveis extracelulares de ATP e adenosina, de acordo com a plasticidade desenvolvida. Portanto, nossos resultados nos permitem apresentar as seguintes conclusões:

1. A sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória produziu uma inibição significativa na atividade da ATP difosfoidrolase 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 treino, não ocorrendo alterações significativas com relação à hidrólise de ADP. A atividade da ATP difosfoidrolase também apresenta-se inibida 180 minutos após o treino em sinaptossomas hipocampais, sugerindo que esta enzima pode estar envolvida na consolidação da memória de esquiva inibitória.

2. Após a sessão de teste da tarefa de esquiva inibitória, não foram observadas alterações significativas, sugerindo que a modulação da ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase é importante para os mecanismos de aquisição da memória, mas não tem efeito na evocação.

3. A ATP difosfohidrolase apresentou uma inibição significativa em sinaptossomas de córtex entorrinal de ratos sacrificados imediatamente após treino. Não houve mudanças significativas nas atividades ectonucleotídicas em sinaptossomas de córtex parietal. Portanto, uma ação integrada das ectonucleotidases de hipocampo e córtex entorrinal parece ser um dos eventos bioquímicos envolvidos nas fases de aquisição e consolidação da memória.

4. A suramina, um antagonista de receptores P2 e NMDA e um inibidor de ectonucleotidases de diversas fontes, inibiu a atividade apirásica em sinaptossomas hipocampais de ratos em uma forma concentração-dependente. A cinética de interação da suramina com a atividade apirásica demonstrou uma inibição do tipo não-competitivo, com valores de  $K_i$  de  $72.8\mu\text{M}$  para ATP e  $109\mu\text{M}$  para ADP. Apesar de seus efeitos facilitatórios sobre a LTP, a suramina prejudicou a retenção de uma tarefa de esQUIVA inibitória após infusão intra-hipocampal, de uma forma dose-dependente.

5. O estado epiléptico induzido por pilocarpina aumentou significativamente as atividades da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo de ratos sacrificados 48-52 horas, 7-9 dias e 45-50 dias após sua indução.

6. Em sinaptossomas de córtex cerebral, a ATP difosfohidrolase apresenta-se aumentada 48-52h após a indução do estado epiléptico pela administração de pilocarpina, mas somente a hidrólise do ADP permaneceu aumentada 7-9 dias após o evento. A atividade da 5'-nucleotidase apresentou ativação máxima 7-9 dias, permanecendo alterada 45-50 dias após o estado epiléptico induzido por pilocarpina. Não houve alterações nos grupos testados 24-28 horas e 100-110 dias após a indução do modelo.



7. O modelo do ácido cáinico aumentou a atividade da ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo de ratos sacrificados 7-9 dias e 45-50 dias após o estado epiléptico. Somente a atividade da 5'-nucleotidase permaneceu aumentada 100-110 dias após a indução do modelo.

8. Em sinaptossomas de córtex cerebral, o modelo do ácido cáinico aumentou a atividade da ATP difosfoidrolase nos grupos analisados 48-52h, 7-9 dias e 45-50 dias após a indução do estado epiléptico. A atividade da 5'-nucleotidase apresentou-se aumentada 45-50 dias e 100-110 dias após a indução do modelo. Nossos resultados sugerem que o estado epiléptico induzido por pilocarpina e ácido cáinico pode induzir alterações tardias e prolongadas nas atividades ectonucleotídicas. Tais alterações podem desempenhar um papel modulatório durante a evolução das mudanças comportamentais e patofisiológicas induzidas pelo estado epiléptico.

9. Os animais com maior resistência ao desenvolvimento do kindling apresentaram um aumento significativo na hidrólise do ATP em sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral. Estes resultados sugerem a participação de uma ecto-ATPase, pois a dissociação observada nos efeitos de ATP e ADP pode ser devido a presença simultânea de uma ATP difosfoidrolase e uma ecto-ATPase. Os animais que desenvolveram crises mais severas no modelo de kindling não apresentaram mudanças significativas nas ectonucleotidases em sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral.

10. As crises agudas induzidas pela administração de uma dose única de PTZ não produziram alterações nas atividades ectonucleotídicas de sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral de ratos em nenhum dos períodos de tempo analisados (0 min, 1 hora, 24 horas, 5 dias) após a indução da crise.

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACHIO, M.P.; CERUTTI, S.; BARBIERI, D.; FRANCESCHI, C.; MALORNI, W.; BIONDO, L. & CATTABENI, F. A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 908-915, 1995.
- ABEIJON, C.; YANAGISAWA, K.; MANDON, E.C.; HÄUSLER, A.; MOREMEN, K.; HIRSCHBERG, C.B. & ROBBINS, P.W. Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 122: 307-323, 1993.
- AGRANOFF, B.W., COTMAN, C.W. & UHLER, M.D. Learning and Memory. IN: Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, eds. G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fischer, M.D. Uhler, pp 1027-1052, 6ª edição, Lippincott-Raven Publishers, 1998.
- AIRAS, L.; HELLMAN, J.; SALMI, M.; BONO, P.; PUURUNEN, T., SMITH, D.J. & JAIKANEN, S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J. Exp. Med.* 182: 1603- 1608, 1995.
- ANGELATOU, F., PAGONOPOULOU, O. & KOSTOPOULOS, G. Alterations of the A<sub>1</sub> receptors in different mouse brain areas after pentylenetetrazol induced seizures, but not in the epileptic mutant mouse 'tottering'. *Brain Res*, 534, 251-256, 1990.
- ARAMI, S.; JUCKER, M.; SCHACHNER, M. & WELZL, H. The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats. *Behav. Brain Res.* 81: 81-87, 1996.
- ASAI, T.; MIURA, S.; SIBLEY, L.D.; OKABAYASHI, H. & TAKEUCHI, T. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isoenzymes from the parasitic *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 270: 11391-11397, 1995.
- AU LOIS, N.C.; NIQUET, J.; BEN-ARI, Y. & REPRESA, A. Cellular plasticity. IN: Epilepsy: a comprehensive textbook, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 387-396, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- AVANZINI, G.; MOSHÉ, S.L.; SCHWARTZKROIN, P.A. & ENGEL, J.Jr. Animal models of localization-related epilepsy. IN: Epilepsy: a comprehensive textbook, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 427-442, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- BARCELLOS, C.K.; SCHETINGER, M.R.C.; BATTASTINI, A.M.O.; SILVA, L.B.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Inhibitory effect of cadmium acetate on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) from adult rat cerebral cortex. *Braz.J.Med. Biol. Res.* 27: 1111-1115, 1994.

- BARNES, C.A.; JUNG, M.W.; MCNAUGHTON, B.L.; KOROL, D.L.; ANDREASSON, K. & WORLEY, P.F. LTP saturation and spatial learning disruption: effects of task variables and saturation levels. *J. Neurosci.* 14: 5793-5806, 1994.
- BARRACO, R.A.; SWANSON, T.H.; PHILLIS, J.W. & BERMAN, R.F. Anticonvulsant effects of adenosine analogues on amygdaloid-kindled seizures in rats. *Neurosci. Lett.* 46: 317-322, 1984.
- BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T.; BARCELLOS, C.K.; DIAS, R.D. & SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16: 1303-1310, 1991.
- BATTASTINI, A.M.O.; OLIVEIRA, E.M.; MOREIRA, C.M.; BONAN, C.D.; SARKIS, J.J.F. & DIAS, R.D. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 209-219, 1995.
- BEGGS, J.M.; BROWN, T.H.; BYRNE, J.H.; CROW, T.; LEDOUX, J.E.; LEBAR, K. & THOMPSON, R.F. Learning and Memory: basic mechanisms. IN: Fundamental neuroscience, eds. M.J. Zigmond, F.E. Bloom, S.C. Landis, J.L. Roberts, L.R. Squire, pp 1411-1449, Academic press, 1999.
- BEN-ARI, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanism and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14: 375-404, 1985.
- BERNABEU, R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; JERUSALINSKY, D. & MEDINA, J.H. Learning-specific, time-dependent increase in  $^3\text{H}$ -phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of rat brain. *Brain Res.* 685: 163-168, 1995.
- BERNABEU, R.; SCHMITZ, P.; FAILLACE, M.P.; IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of an inhibitory avoidance learning. *NeuroReport* 7: 585-588, 1996.
- BERNABEU, R.; BEVILAQUA, L.; ARDENGHI, P.; BROMBERG, E.; SCHIMITZ, P.; BIANCHIN, M.; IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Involvement of hippocampal D1/D5 receptor-cAMP signaling pathways in a late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7041-7046, 1997.
- BERNE, R.M.; WINN, H.R. & RUBIO, R. The local regulation of cerebral blood flow. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 24: 243-260, 1981.
- BERRIDGE, M.J. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325, 1993.

- BLISS, T.V.P. & GARDNER-MEDWIN, A.R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of unanesthetized rabbit following stimulation of perforant path. *J. Physiol. (London)* 232: 357-374, 1973.
- BLISS, T.V.P. & LØMMO, W.T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of anesthetized rabbit following stimulation of perforant path. *J. Physiol. (London)* 232: 331-356, 1973.
- BLISS, T.V.P.; CLEMENTS, M.P.; ERRINGTON, M.L.; LYNCH, M.A.; WILLIAMS, J.H. Presynaptic changes associated with long-term potentiation in the dentate gyrus. IN: Long-term potentiation, eds. M. Baudry, J.L.Davis, pp 3-18, MIT press, Cambridge, Mass., 1991.
- BLISS, T.V.P. & COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term-potentiation in the hippocampus. *Nature (London)*, 361: 31-39, 1993.
- BONAN, C.D.; DIAS, M.M.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D. & SARKIS, J.J.F. Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. *Neurochem. Res.* 23: 979-984, 1998.
- BONAN, C.D.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J.; BATTASTINI A.M.O.; IZQUIERDO, I. & SARKIS, J.J.F. Effects of suramin on hippocampal adenylylase activity and inhibitory avoidance learning of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63: 153-158, 1999.
- BRAUN, N.; BRENDDEL, P. & ZIMMERMANN, H. Distribution of 5'-nucleotidase in the developing mouse retina. *Dev. Brain Res.* 88: 79-86, 1995.
- BRAUN, N.; LENZ, C.; GILLARDON, F.; ZIMMERMANN, M. & ZIMMERMANN, H. Focal cerebral ischemia enhances glial expression of 5'-nucleotidase. *Brain Res.* 766: 213-226, 1997.
- BRAUN, N.; ZHU, Y.; KRIEGLSTEIN, J.; CULMSEE, C. & ZIMMERMANN, H. Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.* 18 (13): 4891-4900, 1998.
- BRUNDEGE, J.M. & DUNWIDDIE, T.V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Advances in Pharmacology* 39, 353-391, 1997.
- BRUNS, R.F.; LU, G.H. & PUGSLEY, T.A. Characterization of the A<sub>2</sub> adenosine receptor labeled by [<sup>3</sup>H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* 29: 331-346, 1986.
- BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24: 509-581, 1972.
- CAMMAROTA, M.; BERNABEU, R.; IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Reversible changes in hippocampal [<sup>3</sup>H]AMPA binding following inhibitory avoidance training in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem* 66: 85-88, 1996.

- CAMMAROTA, M.; PARATCHA, G.; LEVI DE STEIN, M.; BERNABEU, R.; IZQUIERDO, I & MEDINA, J.H. B50/GAP43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance learning. *Neurochem Res*, 22: 499-505, 1997.
- CAVALHEIRO, E.A.; RICHIE, D.A. & LE GAL LA SALLE G. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 53: 581-589, 1982.
- CAVALHEIRO, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital. J. Neurol. Sci.* 16: 33-37, 1995.
- CHADWICK, B.P. & FRISCHAUF, A-M. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPases genes. *Mammalian Genome* 8: 668-672, 1997.
- CHEN, W.; WIERASZKO, A.; HOGAN, M.V.; YANG H.A.; KORNECKI, E. & EHRLICH, Y.H. Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8688-8693, 1996.
- CHIN, J.H. Adenosine receptors in brain: neuromodulation and role in epilepsy. *Ann. Neurol* 26: 695-698, 1989
- CHRISTOFORIDIS, S.; PAPAMARCAKI, T.; GALARIS, D.; KELLNER, R. & TSOLAS, O. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur. J. Biochem.* 234: 66-74, 1995.
- COTMAN, C.W. Axonal sprouting. IN: Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, eds. G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fischer, M.D. Uhler, pp 589-612, 6ª edição, Lippincott-Raven Publishers, 1998.
- CRONIN, J. & DUDEK, F.E. Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats. *Brain Res.* 474: 181-184, 1988.
- CRONIN, J., OBENAU, A, HOUSER, C.R. & DUDEK, F.E. Electrophysiology of dentate granule cells after kainate-induced synaptic reorganization of the mossy fibers. *Brain Res.* 573: 305-310, 1992
- CUNHA, R.A.; VIZI, E.S.; RIBEIRO, J.A. & SEBASTIÃO, A.M. 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, 1996.
- DAVAL, J.L. & WERCK, M.C. Autoradiographic changes in brain adenosine A<sub>1</sub> receptors and their coupling to G-proteins following seizures in the developing rat. *Dev. Brain Res.* 59: 1237-1247, 1993.

- DE MENDONÇA, A. & RIBEIRO, J.A. 2-Chloroadenosine decreases long-term potentiation in the hippocampal CA1 area of the rat. *Neurosci. Lett.* 118: 107-111, 1990.
- DE MENDONÇA, A. & RIBEIRO, J.A. Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience* 62: 385-390, 1994
- DE MENDONÇA, A. & RIBEIRO, J.A. Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.* 60: 245-251, 1997.
- DI IORIO, P.; BALLERINI, P.; CACIAGLI, F. & CICCARELLI, R. Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacol. Res.* 37: 169-178, 1998.
- DOLPHIN, A.C. The adenosine agonist 2-chloroadenosine inhibits the induction of long-term potentiation of the perforant path. *Neurosci. Lett.* 39: 83-89, 1983.
- DOYLE, E.; NOLAN, P.M.; BELL, R. & REGAN, C.M. Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat. *J. Neurochem.* 59: 1570-1573, 1992.
- DRAGUNOW, M. & FAULL, R.L. Neuroprotective effects of adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 193-194, 1988.
- DRURY, A.N. & SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. (London)* 68: 213-237, 1929.
- DUNCAN, J.S.; SHORVON, S.S. & FISH, D.R. Clinical epilepsy. London, Churchill Livingstone, 1995.
- DUNWIDDIE, T.V. & HOFFER, B.J. Adenine nucleotides and synaptic transmission in the in vitro rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol* 69: 59-68, 1980.
- DUNWIDDIE, T.V. & DIAO, L. Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 537-545, 1994.
- DUNWIDDIE, T.; DIAO, L. & PROCTOR, W.R. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17: 7673-7682, 1997.
- DURING, M.J. & SPENCER, D.D. Adenosine: a mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann. Neurol.* 32, 618-624, 1992.
- DZHANDZHUGAZYAN, K.N. & BOCK, E. Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding. *Biochemistry* 36: 15381-15395, 1997.

- DZHANDZUGAZYAN, K.N.; KIRKIN, A.F.; STRATEN, P.T. & ZEUTHEN, J. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Let.* 430: 227-230, 1998.
- EDWARDS, F.A.; GIBB, A.J. & COLQUHOUN, D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359: 144-147, 1992.
- EDWARDS, F.A.; ROBERTSON, S.J. & GIBB, A.J. Properties of ATP receptor-mediated synaptic transmission in the rat medial habenula. *Neuropharmacology* 36: 1253-1268, 1997.
- EHRlich, Y.H.; SNIDER, R.M.; KORNECKI, E.; GARFIELD, M.G. & LENOX R.H. Modulation of neuronal signal transduction system by extracellular ATP. *J. Neurochem* 50: 295-301, 1988.
- EHRlich, Y.H.; HOGAN, M.; PAWLOWSKA, Z.; NAIK, U. & KORNECKI, E. Ectoprotein kinase in the regulation of cellular responsiveness to extracellular ATP. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 603: 401-417, 1990.
- EHRlich, Y.H. & KORNECKI, E. Ecto-protein kinase as mediator for the action of secreted ATP in the brain. *Prog. Brain Res.* 120: 411-426, 1999.
- EKONOMOU, A.; ANGELATOU, F.; VERGNES, M. & KOSTOPOULOS, G. Lower density of A<sub>1</sub> adenosine receptors in nucleus reticularis thalami in rats with genetic absence epilepsy. *NeuroReport* 9: 2135-2140, 1998.
- EVANS, R.J.; DERKACH, V. & SURPRENANT, A. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357: 503-505, 1992.
- FRANCO, R.; CASADÓ, V. CIRUELA, F.; SAURA, C; MALLOL, J.; CANELA, E.I. & LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog. Neurobiol.* 52: 283-294, 1997.
- FRASSETTO, S.S.; DIAS, R.D. & SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol. Cell. Biochem.* 129: 47-55, 1993.
- FRASSETTO, S.S. Efeito periférico da isquemia cerebral transitória e de radicais livres: um estudo da atividade das enzimas ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) e 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) de plaquetas de ratos adultos e do estresse oxidativo plasmático. Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica. UFRGS, 1999.
- FUJII, S.; KATO, H.; FURUSE, H.; ITO, K.-I.; OSADA, H.; HAMAGUCHI, T. & KURODA, Y. The mechanisms of ATP-induced long-term potentiation involves extracellular phosphorylation of membrane proteins in guinea-pig hippocampal CA1 neurons. *Neurosci. Lett.* 187: 130-132, 1995.



- FUJII, S.; KATO, H. & KURODA, Y. 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, 1999.
- GLASS, M.; FAULL, R.L.M.; BULLOCK, J.Y.; JANSEN, K.; MEE, E.W.; WALKER, E.B.; SYNEK, B.J.L. & DRAGUNOW, M. LOSS of A<sub>1</sub> adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 710: 56-68, 1996.
- GODDARD, G.V. development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214: 1020-1027, 1967.
- GODDARD, G.V.; MC INTYRE, D.C. & LEECH, C.K.A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* 25: 295-330, 1969.
- GOLD, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav. Neural Biol.* 46: 87-98, 1986.
- GRONDAL, E.J.M. & ZIMMERMANN, H. Purification, characterization and cellular localization of 5'-nucleotidase from Torpedo electric organ. *Biochem. J.* 245: 805-810, 1987.
- HANDA, M. & GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 916-923, 1996.
- HEBB, D.O. The organization of behavior. New York: Wiley, 1949.
- HEILBRONN, A.; MAIENSCHNIG, V.; CARSTENSEN, C.; GANN, W. & ZIMMERMANN, H. Crucial role of 5'-nucleotidase in differentiation and survival of developing neural cells. *Neuroreport* 7: 257-261, 1995
- HEILBRONN, A. & ZIMMERMANN, H. 5'-nucleotidase activates and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation of PC12 cells. *Eur. J. Neuroscience* 7: 1172-1179, 1995.
- HEURTEAUX, C.; LAURITZEN, I.; WIDMANN, C.; & LAZDUNSKI, M. Essential role of adenosine , adenosine A<sub>1</sub> receptors and ATP -sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4666-4670, 1995.
- HOLTON, F.A. & HOLTON, P. The capillary dilator substance in dry powders of spinal cord roots: a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol (London)* 145: 494-504, 1954.
- HOLTON, P. The liberation of adnosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol. (London)* 145: 494-504, 1959.
- HYMAN, B.T., VAN HOESEN, G.W. & DAMASIO A.D. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: An anatomic study. *Neurology* 40: 1721-1730, 1990.

- INOUE, K.; NAKAZAWA, K.; FUJIMORI, K.; WATANO, W. & TAKANAKA, A. Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked glutamate release in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 134: 215-218, 1992.
- INOUE, K.; KOIZUMI, S. & NAKAZAWA, K. Glutamate-evoked release of adenosine 5'-triphosphate causing an increase in intracellular calcium in hippocampal neurons. *NeuroReport* 6: 437-440, 1995.
- INOUE, K. The functions of ATP receptors in the hippocampus. *Pharmacol. Res.* 38: 323-331, 1998.
- INOUE, K. ATP receptors for the protection of hippocampal functions. *Jpn. J. Pharmacol.* 78: 405-410, 1998a.
- ITO, I.; HIDAKA, H. & SUGIYAMA, H. Effects of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin protein kinase II, on long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 121: 119-121, 1991.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63: 19-32, 1995.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. 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, 1997.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. The biochemistry of memory and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology* 25: 1-9, 1997a.
- IZQUIERDO, I.; QUILLFELDT, J.A.; ZANATTA, M.S.; QUEVEDO, J.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K. & MEDINA, J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur. J. Neurosci.* 9: 786-793, 1997.
- IZQUIERDO, I.; BARROS D.M.; SOUZA, T.M.; SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A. & MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393: 635-636, 1998.
- JEFFERY, K.J. LTP and spatial learning – where to next? *Hippocampus* 7: 95-110, 1997.
- JONES, P.A.; SMITH, R.A. & STONE, T.W. Protection against kainate-induced excitotoxicity by adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonists and antagonists. *Neuroscience* 85: 229-237, 1998.
- JONES, P.A.; SMITH, R.A. & STONE, T.W. Protection against hippocampal kainate excitotoxicity by intracerebral administration of an adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist. *Brain Res.* 800: 328-335, 1998.

- KACZMAREK, E.; KOZIAK, K.; SEVIGNY, J.; SIEGEL, J.B.; ANRATHER, J., BEAUDOIN, A.R.; BACH, F.H. & ROBSON S.C. Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *J.Biol.Chem.* 271: 33116-33122, 1996.
- KANSAS, G.S.; WOOD, G.S. & TEDDER, T.F. Expression, distribution and biochemistry of human CD39: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J. Immunol.* 146: 2235-2244, 1991.
- KEGEL, B.; BRAUN, N.; HEINE, P.; MALISZEWSKI, C.R. & ZIMMERMANN, H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology.* 36: 1189-1200, 1997.
- KETTLUN, A.M.; LEYTON, M.; VALENZUELA, M.A.; MANCILLA, M. & TRAVERSO-CORI, A. Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 31: 1889-1894, 1992.
- KIRLEY, T.L. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase-homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J. Biol. Chem.* 272: 1076-1081, 1997.
- KITAKAZE, M.; FUNAYA, H.; MINAMINO, T.; NODE, K.L SATO, H.; UEDA, Y.; OKUYAMA, Y.; KUZUYA, T.; HORI, M. & YOSHIDA, K. Role of protein kinase C in activation of ecto-5'-nucleotidase in the preconditioned canine myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 239: 171-175, 1997.
- KOIZUMI, S. & INOUE, K. Inhibition by ATP of calcium oscillations in cultured rat hippocampal neurons. *Br.J. Pharmacol.* 122: 51-58, 1997.
- KOPF, S.R.; MELANI, A.; PEDATA, F. & PEPEU, G. Effect of A(1) and A(2) receptor antagonists. *Psychopharmacology* 146 (2): 214-219, 1999.
- KOSTOPOULOS, G., DRAPEAU, C., AVOLI, M., OLIVIER, A. & VILLEMEURE, J.G. Endogenous adenosine can reduce epileptiform activity in human epileptic cortex maintained in vitro. *Neurosci. Lett.* 106: 119-124, 1989.
- LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A. & CAVALHEIRO, E.A. Spontaneous recurrent Seizures in rats : an experimental model of partial epilepsy. *Neurosc. Biobehav. Rev.* 14: 511-517, 1990
- LEMONS, T. & CAVALHEIRO, E.A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp. Brain Res.* 102: 423-428, 1995
- LIE, A.A.; BLUMCKE, I.; BECK, H.; WIESTLER, O.D.; ELGER, C.E. & SCHOEN S.W. 5'-Nucleotidase activity indicates sites of synaptic plasticity and reactive synaptogenesis in the human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58(5): 451-458, 1999.

- LLOYD, H.G.E.; LINDSTROM, K. & GREDHOLM, B.B. Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion. *Neurochem. Int.* 23: 173 – 185, 1993.
- LUPICA, H.G.E.; LINDSTROM, K. & FREDHOLM, B.B. Effects of the selective adenosine A<sub>2</sub> receptor agonist CGS 21680 on in vitro electrophysiology, cAMP formation and dopamine release in rat hippocampus and striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252: 1134-1141, 1990
- LÚTHI, A.; LAURENT, J.-P.; FIGUROV, A.; MULLER, D. & SCHACHNER, M. Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372: 777-779, 1994.
- MAITRE, N.; CIESIELSKI, L. & LEHMANN. Protective effect of adenosine and nicotinamide against audiogenic seizure. *Biochem. Pharmacol.* 23: 2807-2816, 1974.
- MALISZEWSKI, C.R.; DELESPESE, G.J.T.; SCHOENBORN, M.A.; ARMITAGE, R.J.; FANSLOW, W.C.; NAKAKIMA, T.; BAKER, E.; SUTHERLAND, G.R.; POINDEXTER, K.; BIRKS, C.; ALPERT, A.; FRIEND, D.; GIMPEL, S.D. & GAYLE, III, R.B. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* 149: 3574-3583, 1994.
- MANZONI, O.J.; MANABE, T. & NICOLL, R.A. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265: 2098-2101, 1994.
- MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.F.; ISLAM, N.; ALYONYCHEVA T.N.; SAFIER, L.B.; HAJJAR, K.A.; POSNETT, D.N.; SHOENBORN, M.A.; SCOOLEY, K.A.; GAYLE, R.B. & MALISZEWSKI, C.R. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J.Clin.Invest.* 99(6): 1351-1360, 1997.
- MAREN, S. & BAUDRY, M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationship to learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63: 1-18, 1995.
- MARTÍ, E.; CANTÍ, C.; DE ARANDA, I.G.; MIRALLES, F. & SOLSONA, C. Action of suramin upon ecto-apyrase activity and synaptic depression of Torpedo electric organ. *Br. J. Pharmacol.* 118: 1232-1236, 1996.
- MASON, c.R. & COOPER, R.M. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain damage rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. *Epilepsia* 13: 663-674, 1972.
- MATHERN, G.W.; CIFUENTES, F.; LEITE, J.P.; PRETORIUS, J.K. & BABB, T.L. Hippocampal EEG excitability and chronic spontaneous seizures are associated with aberrant synaptic reorganization in the rat intrahippocampal kainate model. *Electoencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 87: 326-339, 1993.

- McNAMARA, J.O. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J. Neurosci.* 14: 3413-3425, 1994
- McNAMARA, J.O. & WADA, J.A. Kindling model. IN: *Epilepsy: a comprehensive textbook*, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 419-425, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- MEGHJI, P. & BURNSTOCK, G. Inhibition of extracellular degradation in endothelial cells. *Life Sci.* 57: 762-771, 1995.
- MEIER, C.L. & DUDEK, F.E. Spontaneous abd stimulation-induced synchronized burst afterdischarges in the isolated CA1 Of kainate-treated rats. *J. Neurophysiol.* 76: 2231-2239, 1996.
- MELDRUM, B. Amino acid neurotransmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia* 22: 140-149, 1984.
- MELDRUM, B. & CHAPMAN, A. Epileptic seizures and epilepsy. IN: *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, eds. G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, K. Fischer, M.D. Uhler, pp 755-768, 6<sup>a</sup> edição, Lippincott-Raven Publishers, 1998.
- MELLO, L.A.M.; CAVALHEIRO, E.A.; TAN, A.M. et al. Circuit mechanisms of seizures in pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 39: 985-995, 1993.
- MEYERHOF, O. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.* 157: 105-109, 1945S.
- MISUMI, Y.; OGATA, S.; HIROSE, S. & IKEHARA, Y. Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycopospholipid. *J. Biol. Chem.* 265: 2178-2183, 1990.
- MISUMI, Y.; OGATA, S.; OHKUBO, K.; HIROSE, S & IKEHARA, Y. Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur. J. Biochem.* 191: 563- 569, 1990a.
- MODY, I. & SCHWARTZKROIN, P.A. Acute seizures models (intact animals). IN: *Epilepsy: a comprehensive textbook*, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 397-404, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- MURPHY, K.J. & REGAN, C.M. Contributions of cell adhesion molecules to altered synaptic weightings during memory consolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70: 73-81, 1998.
- NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Alterações neuroquímicas associadas às epilepsias do lobo temporal. IN: *Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos*, eds. Da Costa, J.C.; Palmmini, A.; Yacubian, E.M.T., Cavalheiro. E.A., pp 75-100, São Paulo, 1998.

- NAGY, A.K.; HOUSER, C.R.; DELGADO-ESCUETA, A.V. Synaptosomal ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of humans with focal epilepsy. *Brain Res.* 529: 192-201, 1990.
- NAGY, A.K.; WALTON, N.Y. & TREIMAN, D.M. Reduced cortical ecto-ATPase activity during prolonged status epilepticus induced by sequential administration of lithium and pilocarpine. *Mol. Chem. Neuropathol.* 31: 135-147, 1997.
- NESTLER, E.J.; WALAAS, I. & GREENGARD, P. Neuronal phosphoproteins: physiological and clinical implications. *Science* 225: 1357-1364, 1984.
- NISHIMURA, S.; MOHRI, M.; OKADA, Y. & MORI, M. Excitatory and inhibitory effects of adenosine on the neurotransmission in the hippocampal slices of guinea pig. *Brain Res.* 525: 165-169, 1990.
- NORMILE, H.J. & BARRACO, R.A. N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A<sub>1</sub> receptors. *Brain Res. Bull.* 27: 101-104, 1991.
- OLIVEIRA, E.M.; ROCHA, J.B.; SARKIS, J.J.F. In vitro and in vivo effects of HgCl<sub>2</sub> on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.* 102: 251-254, 1994.
- OLIVEIRA, E.M.; BATTASTINI, A.M.O.; MEIRELLES, M.N.L.; MOREIRA, C.M.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity in sarcolemmal membrane from rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 170: 115-123, 1997.
- ONG, W.Y.; MOTIN, L.G.; HANSEN, M.A.; DIAS, L.S.; AYROUT, C.; BENNET, M.R. & BALCAR, V.J. P2 purinoceptor blocker suramin antagonizes NMDA receptors and protects against excitatory behaviour caused by NMDA receptor agonist (RS)-(tetrazol-5-yl)-glycine in rats. *J. Neurosci. Res.* 49: 627-638, 1997.
- OTTMAN, R.; RISCH, N.; HAUSER, W.A.; PEDLEY, T.A.; LEE, J.H.; BARKER-CUMMINGS, C.; LUSTENBERG, A.; NAGLE, K.J.; LEE, S.K.; SEHEUR, M.L.; NEYSTAT, M.; SUSSER, M. & WILHELMSEN, K.C. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nature Genet.* 10, 56-60, 1995.
- PALMINI, A.; ANDERMANN, F.; TAMPIERI, D. & ROBITAILE, Y. Neuronal migration disorders: a contribution of modern neuroimaging techniques to the etiologic diagnosis of epilepsy. *Can. J. Neurol. Sci.* 18: 580-587, 1991.
- PALMINI, A. & COSTA, J.C. Introdução à epileptologia clínica e classificação das epilepsias e crises epilépticas. IN: Fundamentos neurobiológicos das epilepsias : aspectos Clínicos e cirúrgicos, eds. Da Costa, J.C.; Palmiini, A.; Yacubian, E.M.T., Cavalheiro. E.A., pp 149-161, São Paulo, 1998

- PARKINSON, F.E. & FREDHOLM, B.B. Autoradiographic evidence for G-protein coupled A<sub>2</sub>-receptors in rat neostriatum using [3H]-CGS 21680 as a ligand. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342:85-89, 1990.
- PATEL, B.T. & TUDBALL, N. Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase and adenosine deaminase immunoreactivities in rat brain. *Brain Res.* 370: 250-264, 1986.
- PEDATA, F.; LATINI, S.; PUGLIESE, A.M. & PEPEU, G. Investigations into the adenosine outflow from hippocampal slices evoked by ischemia-like conditions. *J. Neurochem.* 61: 284-289, 1993.
- PHILLIS, J.W. & WU, P.H. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16: 187-239, 1981
- PLESNER, L. Ecto-ATPases: Identities and Functions. *Int. Rev. Cytol.* 158, 141-214, 1995.
- POTTER, P. & WHITE, T.D. Release of adenosine and adenosine 5'-triphosphate from synaptosomes from different regions of rat brain. *Neuroscience* 5: 1351-1356, 1980.
- QUILLFELDT, J.A.; ZANATTA, M.S.; SCHMITZ, P.K.; QUEVEDO, J.; SCHAEFFER, E.; DE LIMA, J.B. MEDINA, J.H. & IZQUIERDO, I. Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66: 97-101, 1996.
- RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizures. *Electoencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32: 281-294, 1972.
- RALEVIC, V. & BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492, 1998.
- RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.L.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, C.; HERMAN, M.A.R.; REED, J.K.; CICCARELLI, R.; DI ORIO, P. & CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59: 663-690, 1999.
- RESTA, R.; HOOKER, S.W.; HANSEN, K.R.; LAURENT, A.B.; PARK, J.L.; BLACKBURN, M.R.; KNUDSEN, T.B. & THOMPSON, L.F. Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73) – cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* 133: 171-177, 1993.
- RIBEIRO, J.M.C. & GARCIA, E.S. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rodnius prolixus*. *Experientia* 37: 384-386, 1981.
- RIBEIRO, J.M.C.; VAUGHAN, J.A. & AZAD, A.F. Characterization of the salivary apyrase activity of the three rodent flea species. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 215-219, 1990.

- RIBEIRO, J.M.C.; ENDRIS, T.M. & ENDRIS R. Saliva of the tick *Ornithodoros moubi* contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A: 109-112, 1991.
- RICHARDSON, P.J. & BROWN, S.J. ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J. Neurochem.* 48: 622-630, 1987.
- RIEDEL, G. Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends Neurol. Sci.* 19: 219-224, 1996.
- ROCHA, J.B.T.; MELLO, C.F.; SARKIS, J.J.F.; DIAS, R.D. Undernutrition during the preweaning period changes calcium ATPase and ADPase activities of synaptosomal fractions of weaning rats. *British J.Nutr.* 63: 273-284, 1990.
- RØNN, L.C.B.; HARTZ, B.P. & BOCK, E. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp. Gerontol.* 33: 853-864, 1998.
- ROSEN, J.B. & BERMAN, R.F. Differential effects of adenosine analogs on amygdala, hippocampus and caudate nucleus kindled seizures. *Epilepsia* 28: 658-666, 1987
- SAJJADI, F.G.; TAKABAYASHI, K.; FOSTER, A.C.; DOMINGO, R.C. & FIRESTEIN, G.S. Inhibition of TNF- $\alpha$  expression by adenosine - Role of A<sub>1</sub> adenosine receptors. *J. Immunol.* 156: 3435-3442, 1996.
- SANDER, J.W. & SILLANPÄÄ, A.S. Natural history and prognosis. IN: *Epilepsy: a comprehensive textbook*, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 69-86, Lippincott-Raven Publishers, 1998.
- SARKIS, J.J.F.; GUIMARÃES, J.A. & RIBEIRO, J.M.C. Salivary of *Rhodnius prolixus*: Kinetic and purification. *Biochem. J.* 233: 885-891, 1986.
- SARKIS, J.J.F. & SALTÓ, C. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo Marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26: 871-876, 1991.
- SATO, T.; OBATA, T.; YAMANAKA, Y. & ARITA, M. Stimulation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors and protein kinase C-mediated activation of ecto-5'-nucleotidase in rat hearts *in vivo*. *J. Physiol.* 503: 119-127, 1997.
- SATTIN, A. & RALL, T.W. The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol Pharmacol.* 6: 13-23, 1970.
- SCHETINGER, M.R.C.; WYSE, A.T.; SILVA, L.B.; BARCELLOS, C.K.; DIAS R.D.; SARKIS, J.J.F. Effect of aluminum chloride on the kinetics of the rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC. 3.6.1.5). *Biol. Trace Elem. Res.* 50: 209-220, 1995.



- SCHETINGER, M.R.C.; BONAN, C.D.; SCHIERHOLT, R.C.; WEBER, A.; ARTENI, N.; EMANUELLI, T.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. & NETTO, C.A. Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: a possible link between preconditioning and adenosine production. *J. Stroke Cerebrovas. Dis.* 7(5): 281-286, 1998.
- SCHOEN, S.W. & KREUTZBERG, G.W. Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult dentate gyrus. *Exp. Neurol.* 127: 106-118, 1994.
- SCHOEN, S.W.; EBERT, U. & LOSCHER, W. 5'-nucleotidase activity of mossy fibers in the dentate gyrus of normal and epileptic rats. *Neuroscience* 93: 519-526, 1999.
- SCHOLEY, A.B.; ROSE, S.P.R.; ZAMANI, M.R.; BOCK, E. & SCHACHNER, M. A role for neural cell adhesion molecule in a late-consolidating phase of glycoprotein synthesis 6 hours following passive avoidance training of the young chick. *Neuroscience* 55: 499-509, 1993.
- SHORVON, S.D. Epidemiologia, classificação, história natural e genética da epilepsia. In: *Epilepsy: a lancet review*, ed. J.C.Costa, pp 3-13, The Lancet, London, 1990.
- SIMONATO, M., VARANI, K., MUZZOLINI, A., BIANCHI, C., BEANI, L., BOREA P.A. Adenosine A<sub>1</sub> receptors in the rat brain in the kindling model of epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 265, 121-124, 1994.
- SMITH, T.M. & KIRLEY, T.L. Cloning, sequencing and expression of a human brain ecto-apyrase related to both ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys.Acta* 1386: 65-78, 1998.
- SMITH, T.M. & KIRLEY, T.L. Glycosylation is essential for functional expression of a human brain ecto-apyrase. *Biochemistry* 38: 1509-1516, 1999.
- STEHLE, J.H.; RIVKEES, S.A.; LEE, J.J.; WEAVER, D.E.; DEEDS, J.D. & REPPERT, S.M. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A<sub>2</sub>-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol.* 6: 384-393, 1992.
- SUTULA, T.; HE, X.X.; CAVAZOS, J. & SCOTT, G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by anormal functional activity. *Science* 239: 1147-1150, 1988.
- SUZUKI, K.; FURUKAWA, Y.; TAMURA, H.; EJIRI, N.; SUEMATSU, H.; TAGUCHI, R.; NAKAMURA, S.; SUZUKI, Y & IKEZAWA, H. Purification and cDNA cloning of bovine liver 5'-nucleotidase, a GPI-anchored protein, and its expression in COS cells. *J. Biochem.(Tokyo)* 113: 607-613, 1993.
- TODOROV, L.D.; MIHAAYLOVA-TODOROVA, S.; WESTFALL, T.D.; SNEDDON, P; KENEDDY, C.; BJUR, R.A. & WESTFALL, D.P. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387: 76-79, 1997.

- TOGNOLI, L. & MARRÉ, E. Purification and characterization of a divalent cation-activated ATP-ADPase from *Pea steam* microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 642: 1-14, 1981.
- TRAVERSO-CORI, A. & CORI, O. Splitting of the terminal phosphate group of adenosine triphosphate by potato apyrase. *Biochim. Biophys. Acta*. 57: 158-160, 1962.
- TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARTZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z. & TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* 9: 315-335, 1983.
- TURSKI, W.A.; CZUCZWART, S.J; KLEINROK, Z. & TURSKI, L. Cholinomimetic produce seizures and brain damage in rats. *Experientia* 30: 1408-1411, 1983a.
- TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; IKONOMIDOU, C.; MELLO, L.E.A.M.; BORTOLOTTI, Z.A. & TURSKI, L. Effects of aminophylline and 2-chloroadenosine on seizures produced by pilocarpine in rats: morphological and electroencephalographic correlates. *Brain Res.* 361: 309-323, 1985.
- VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R.; GALPERIN, M.Y. & RIBEIRO, J.M.C. Purification, cloning and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex Lectularius*. *J. Biol. Chem.* 273:30583-30590, 1998.
- VALENZUELA, M.A.; LOPES, J.; DEPIX, M.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A.M.; CATALÁN, L.; CHIONG, M.; GARRIDO, J. & TRAVERSO-CORI, A. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 911-919, 1989.
- VON KULGELGEN, I. & STARKE, K. Noradrenaline- ATP cotransmission in the sympathetic nervous system. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 319-324, 1991.
- WALTER, J.; SCHNOLZER, M.; PYERIN, W.; KINZEL, V. & KÜBLER, D. Induced release of cell surface protein kinase yields CK1 and CK2-like enzymes in tandem. *J. Biol. Chem.* 271: 111-119, 1996.
- WANG, T.-F. & GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>)-apyrase. *J. Biol. Chem.* 271: 9898-9901, 1996.
- WANG, T.-F.; ROSENBERG, P.A. & GUIDOTTI, G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol. Brain Res.* 47: 295-302, 1997.
- WANG, T.-F. & GUIDOTTI, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 790: 318-322, 1998.

- WANG, T.-F.; OU, Y. & GUIDOTTI, G. The transmembrane domains of ecto-apyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J. Biol.Chem.* 273: 24814-24821, 1998.
- WHITE, T.D. Release of ATP from a synaptosomal preparation by elevated extracellular K<sup>+</sup> and by veratridine. *J. Neurochem.* 30: 329-336, 1978.
- WIERASZKO, A.; GOLDSMITH, G. & SEYFRIED, T.N. Stimulation-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slices. *Brain Res.* 485: 244-250, 1989.
- WIERASZKO, A. & SEYFRIED, T.N. ATP-induced synaptic potentiation in hippocampal slices. *Brain Res.* 491: 356-359, 1989.
- WIERASZKO, A. & EHRLICH, Y.H. On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Neurochem.* 63: 1731-1738, 1994.
- WIERASZKO, A. Facilitation of hippocampal potentials by suramin. *J. Neurochem.* 64: 1097-1101, 1995
- WIERASZKO, A. Extracellular ATP as a neurotransmitter: its role in synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Neurobiol. Exp.* 56: 637-648, 1996.
- WINK, M.R. Ecto-apyrase de cérebro de ratos: investigação dos aminoácidos na catálise e possível regulação por fosforilação. Tese de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica. UFRGS, 1999.
- WITTER, M.P.; GROENEWEGEN, H.J.; LOPES DA SILVA, F.H. & LHMAN, A.H.M. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of parahippocampal region. *Prog. Neurobiol.* 33: 161-253, 1989.
- WYSE, A.T.; SARKIS, J.J.F.; CUNHA-FILHO, J.S.; TEIXEIRA, M.V.; SCHETINGER, M.R.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M. Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 19: 1175-1180, 1994.
- YOUNG, D. & DRAGUNOW, M. Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience* 58: 245-261, 1994.
- ZANATTA, M.S.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.H.; QUEVEDO, J.; QUILLFELDT, J.A.; & IZQUIERDO, I. Sequential involvement of NMDA-dependent mechanisms in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. *Behav. Pharmacol.* 6: 341-345, 1996
- ZHANG, G.; FRANKLIN, P.H. & MURRAY, T.F. Manipulation of endogenous adenosine in the rat prepiriform cortex modulates seizure susceptibility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 1415-1424, 1993.

- ZHUO, M.; SMALL, S.A.; KANDEL, E.R. & HAWKINS, R.D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 260:1946-1950, 1993.
- ZIGANSHIN, A.U.; ZIGANSHINA, L.E.; KING, B.F.; BURNSTOCK, G.: Characteristics of ecto-ATPase of *Xenopus* oocytes and inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. *Pflugers Arch.* 429: 412-418, 1995.
- ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285: 345-365, 1992.
- ZIMMERMANN, H. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17: 420-426, 1994.
- ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49, 589-618. 1996.
- ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B. & HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system, *Neurochem. Int.* 32: 421-425, 1998.
- ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *TIPS* 20: 231-236, 1999.
- ZOU, C.J.; ONAKA, T.O. & YAGI, K. Effects of suramin on neuroendocrine and behavioural responses to conditioned fear stimuli. *NeuroReport* 9: 997-999, 1998.

## VI. ANEXOS

### ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DE VIGÊNCIA DO DOUTORADO, EM ÁREAS AFINS AO TEMA DESTA TESE.

1. Bonan C.D., Battastini A.M.O., Schetinger M.R.C., Moreira C.M., Frassetto S.S., Dias R.D., Sarkis J.J.F. Effects of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) on ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) and 5'- nucleotidase (EC3.1.3.5) from rat brain synaptosomes. **General Pharmacology** 28(5), 761-766, 1997.
2. Schetinger M.R.C, Bonan C.D., Schierholt R.J., Weber A., Arteni N., Emanuelli T., Dias R.D., Sarkis J.J.F, Netto C.A. Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: a possible link between preconditioning and adenosine production. **Journal of Stroke and Cerebrovascular diseases**, 7, 281-286, 1998.
3. Emanuelli T., Bonan C.D., Sarkis J.J.F., Battastini A.M.O. Catabolism of Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>5</sub>A by rat brain synaptosomes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 31: 1529-1532, 1998.
4. Battastini A.M.O., Emanuelli T., Wink M.R., Bonan C.D. Dias R.D., Sarkis J.J.F. Studies on the anchorage of ATP diphosphohydrolase in synaptic plasma membranes from rat brain. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 30(6): 669-678, 1998.
5. Schetinger M.R.C., Bonan C.D., Morsch V.M., Bohrer D., Valentim L.M., Rodrigues S.R. Effects of aluminum sulfate on delta-aminolevulinate dehydratase from kidney, brain, and liver of adult mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32, 761-766, 1999.
6. Schetinger M.R.C., Bonan C.D., Frassetto S.S., Wyse A.T.S., Schierholt R.C., Webber A., Dias R.D., Sarkis J.J.F., Netto, C.A. Pre-conditioning to global cerebral ischemia changes hippocampal acetylcholinesterase in the rat. **Biochemistry and Molecular Biology International**, 47, 473-478, 1999.

7. Wink, M.R., Buffon, A., Bonan, C.D., Valenzuela, M.A., Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O. Effect of protein-modifying reagents on ecto-apyrase from rat brain. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, in press.

#### **PUBLICAÇÕES EM LIVROS**

1. Battastini A.M.O., Oliveira E.M., Moreira C. M., Bonan C.D., Sarkis J.J.F. and Dias R.D. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. In **Ecto ATPases** (L. Plesner, T.L. Kirley and A.F. Knowles, eds) pp 21 – 26, Plenum Press, New York, 1997.
2. Sarkis J.J.F., Bonan C.D., Frassetto S.S., Pilla C., Battastini A.M.O. and Dias R.D. ATP diphosphohydrolase: a possible relation of this enzyme with Alzheimer's disease and thrombosis. In **Ecto ATPases** (L. Plesner, T.L. Kirley and A.F. Knowles, eds), pp 209- 212, Plenum Press, New York, 1997.
3. Schetinger M.R.C., Bonan C.D., Schierholt R., Weber A., Arteni N., Sarkis J.J.F., Dias R.D and Netto C.A. ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities from hippocampal synaptosomes after brain ischaemia. In **Ecto ATPases** (L. Plesner, T.L. Kirley and A.F. Knowles, eds), pp 213 – 220, Plenum Press, New York, 1997.