

Investigação de propriedades não enzimáticas da NTPDase2

Kipper FC^{1,3}, Tamajusuku ASK², Lenz G³, Wink MR¹

¹Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UFCSPA, ²Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana, ³Departamento de Biofísica, UFRGS

INTRODUÇÃO

- A NTPDase 2 é uma ectonucleotidase transmembrana com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular e tem a função de hidrolisar nucleotídeos tri em di-fosfatados, e, em menor proporção (30:1), di em mono-fosfatados.
- É expressa em grandes quantidades em astrócitos, porém praticamente não é expressa em gliomas.
- Supõe-se que além da função de hidrólise também esteja envolvida em outras funções celulares.

MATERIAIS E MÉTODOS

- **Adesão célula-célula:** as células transduzidas com NTPDase2-EGFP foram fotografadas utilizando microscópio confocal e a quantidade de fluorescência entre as células e nas áreas de membrana livre foram mensuradas utilizando o software ImageJ
- **Adesão célula-matriz:** a placa contendo astrócitos e polilisina foi preparada no dia anterior ao ensaio. As células (1×10^5) foram plaqueadas sobre plástico, polilisina e matriz secretada por astrócitos. Foram utilizados astrócitos de 3 regiões distintas do cérebro: córtex (Cx), cerebelo (Ce) e hipocampo (Hi). A adesão foi mensurada pelo método do Cristal de Violeta.
- **Ensaio de migração celular (Scratch-wound assay):** um risco sob a camada de células Hek293 transduzida com NTPDase2-EGFP ou apenas com o vetor EGFP foi realizado com o auxílio de uma ponteira de 200ul. Depois as células foram lavadas para a remoção de debris e colocadas novamente na incubadora. Em tempos pré-determinados as áreas riscadas foram analisadas e fotografadas.

RESULTADOS

- A NTPDase2 concentra-se principalmente nos pontos de adesão célula-célula (Fig.1).
- A enzima diminui a adesão das células em todos os substratos, incluindo aqueles onde há elevada expressão da NTPDase2 (monocamada de astrócitos) (Fig.2)
- Não é possível mensurar se essa enzima é capaz de alterar a capacidade de migração através do Scratch Wound Assay na linhagem Hek293 (Fig.3).

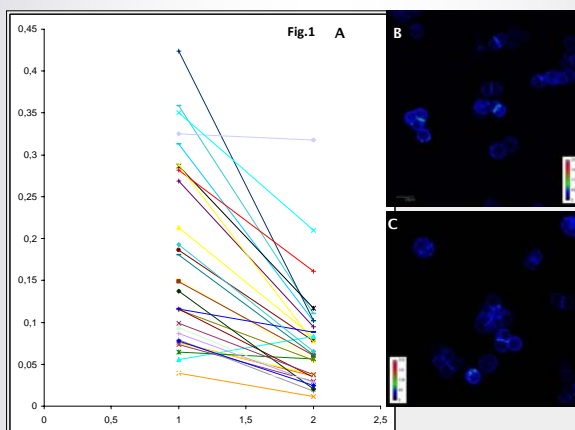


Figura 1: A – gráfico mostrando a esquerda a concentração de EGFP no centro/2 e a direita a correlação da mesma célula na área de membrana livre. B e C – representação das fotomicrografias com escala de intensidade.

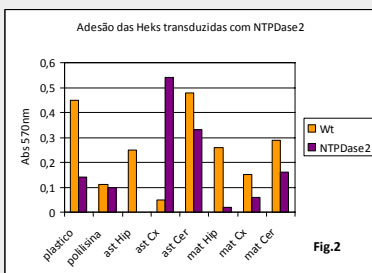


Figura 2: Adesão de Hek293 e Hek transduzida com NTPDase2 sobre plástico, matriz de polilisina, monocamada de astrócitos em cultura ou matriz secretada por astrócitos de Hipocampo (Hip), Córtex (Cx) e Cerebelo (Cer). Após os tempos de 15 minutos sobre astrócitos e 30 minutos para os demais, as células não aderidas foram removidas e as aderidas foram fixadas, coradas e a absorbância lida em 570 nm.

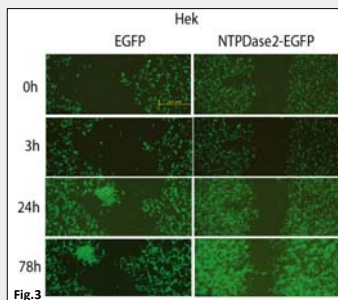


Figura 3: Ensaio de migração celular do tipo Scratch Wound Assay em Hek293 transduzida com EGFP fusionada ou não a NTPDase2. As fotomicrografias mostram que no decorrer do tempo não houve migração em direção ao centro de cada imagem. Houve proliferação acentuada em ambas linhagens.

CONCLUSÕES

Embora as células Hek293 transduzidas com NTPDase2 apresentem uma adesão diminuída aos substratos e matrizes testadas e também às células de astrócitos, cuja expressão de NTPDase2 é elevada, a microscopia confocal revela uma possível interação entre as moléculas de NTPDase2, sugerindo seu papel como uma molécula de adesão do tipo homofílica

PERSPECTIVAS

- Realizar imunohistoquímica ou imunofluorescência com anticorpos de adesão para ver co-localização com a NTPDase2.
- Realizar adesão em outros substratos.
- Tentar outras metodologias para migração.

REFERÊNCIAS

Wink *et al.* Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD3911) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience*, 2006.
Wink *et al.* Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem. Int.*, 2003.
Wink *et al.* Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Letters*, 2003.

SUORTE FINANCEIRO

