

# Investigação de propriedades não enzimáticas da NTPDase2

Kipper FC<sup>1,3</sup>, Tamajusuku ASK<sup>2</sup>, Lenz G<sup>3</sup>, Wink MR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UFCSPA, <sup>2</sup>Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana, <sup>3</sup>Departamento 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 ( $1 \times 10^5$ ) 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).

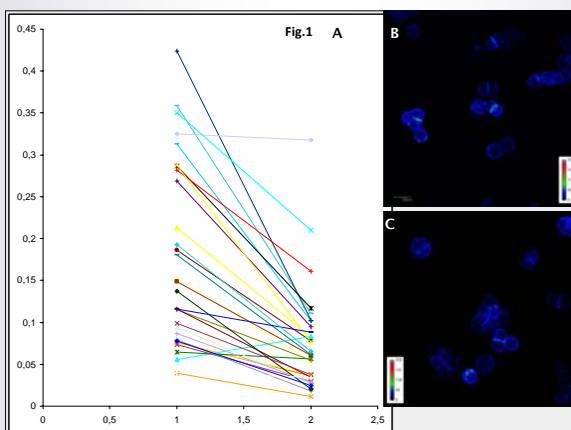


Figura 1: A – gráfico mostrando a esquerda a concentração de EGFP no centro/2 e a direita a correlação da mesma célula na área de membrana livre. B e C – representação das fotomicrografias com escala de intensidade.

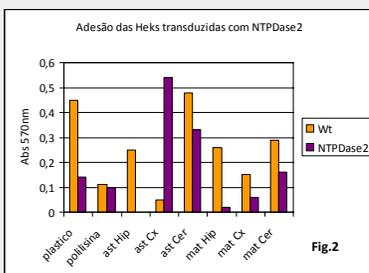


Figura 2: Adesão de Hek293 e Hek transduzida com NTPDase2 sobre plástico, matriz de polilisina, monocamada de astrócitos em cultura ou matriz secretada por astrócitos de Hipocampo (Hip), Córtex (Cx) e Cerebelo (Cer). Após os tempos de 15 minutos sobre astrócitos e 30 minutos para os demais, as células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

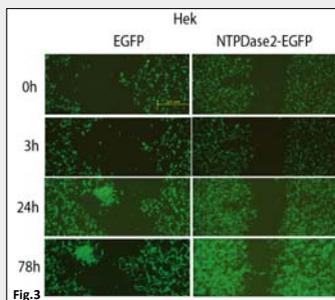


Figura 3: Ensaio de migração celular do tipo Scratch Wound Assay em Hek293 transduzida com EGFP fusionada ou não a NTPDase2. As fotomicrografias mostram que no decorrer do tempo não houve migração em direção ao centro de cada imagem. Houve proliferação acentuada em ambas linhagens.

## 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

