

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Investigação das Ectonucleotidases de Células Musculares Lisas

Vasculares:

Efeito dos Hormônios Tireoideanos e Estradiol

ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Oliveira Battastini

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

Porto Alegre

2005

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Ana M.O. Battastini, pela orientação deste trabalho e principalmente por me dar a oportunidade de participar deste fantástico mundo da pesquisa científica. Obrigada pelos ensinamentos, correções, discussões, pela abertura a novas idéias e pela amizade.

Ao Prof^o Dr^o Sarkis e à Prof^a Dr^a Carla Bonan, pelo agradável convívio no laboratório, pelos ensinamentos e discussões nos seminários.

À Prof^a Dr^a Maria Luiza M. Barreto-Chaves, pela disponibilidade e excelente colaboração neste trabalho assim como pela hospitalidade em São Paulo.

À Prof^a Dr^a Márcia Wink, pela colaboração neste trabalho tornando possíveis novas técnicas no laboratório, pelos conselhos, pela amizade, pelo estímulo e exemplo de perseverança a ser seguido. Também ao Prof^o Dr^o Guido Lenz, pelas valiosas trocas de idéias!

À colega Elizandra Braganhol, antes de tudo minha amiga, obrigada pelo precioso auxílio nos experimentos, pelo olhar crítico, pelo incentivo e companheirismo!

Aos colegas e amigos de laboratório, em especial: Ale, Ana Paula, Déia, Andressa, Bá, Cris, Dani, Denise, Émerson, Fernanda Morrone, Giana, Grace, Jean, Joséli, Luci, Rafael, Rô, Sandra, Tiana, Vanessinha e Vanessa Silveira, pelo convívio, pela troca de experiências e ajudas no dia-a-dia.

À Prof^a Dr^a Fátima Guma e seus alunos, principalmente a Cláudia e o Eduardo, pelas ajudas nas técnicas de imunocitoquímica e RT-PCR, pelas discussões e amizade.

À Dr^a Débora, pelas fotos do gel de agarose do RT-PCR.

Ao Prof^o Msc. Günther Gehlen, pelas fotos da imunocitoquímica.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica, pelas aulas e pelas ajudas constantes em resolver os mais variados problemas.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e à PROPESQ pelo auxílio financeiro para os congressos.

Aos meus pais, Jorge e Elisa, e minha irmã Simone, pelo incentivo à educação, pelo suporte, pela torcida e pelo carinho.

Ao meu Deus, único e verdadeiro Mestre.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 <i>Sistema Purinérgico.....</i>	9
1.1.1 Nucleotídeos da Adenina.....	9
1.1.2 Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (NTPDases).....	11
1.1.3 Ecto-5'-nucleotidase.....	16
1.2 <i>Células Musculares Lisas Vasculares.....</i>	18
1.3 <i>Hormônios Tireoideanos.....</i>	20
1.4 <i>Hormônios Esteróides Sexuais.....</i>	23
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 <i>Materiais.....</i>	28
2.1.1 Animais.....	28
2.1.2 Reagentes.....	28
2.2 <i>Métodos.....</i>	31
2.2.1 Cultura de Células.....	31
2.2.2 Tratamento com os Hormônios.....	32
2.2.3 Ensaio da Atividade Enzimática das Ectonucleotidases.....	32
2.2.4 Determinação da Proteína.....	33
2.2.5 Imunocitoquímica.....	33
2.2.6 RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa.....	34
2.3 <i>Análise Estatística.....</i>	36
3 RESULTADOS.....	37
3.1 <i>Células Musculares Lisas Vasculares e Ectonucleotidases.....</i>	37
3.1.1 Padronização da cultura e identificação do tipo celular extraído.....	37
3.1.2 Padronização das condições de ensaio das ectonucleotidases em CMLVs.....	39
3.1.3 Investigação das NTPDases expressas em CMLVs.....	41
3.2 <i>Tratamento Hormonal nas Culturas de CMLVs.....</i>	43

3.2.1	Tratamentos com hormônios tireoideos e estradiol alteram a hidrólise de ATP e AMP	43
3.2.2	O efeito dos hormônios T ₃ , T ₄ e E ₂ sobre as atividades ATPásica e AMPásica é dependente do tempo de tratamento	46
3.2.3	A ativação da ecto-5'-NT é dose dependente para o estradiol, mas não para os hormônios tireoideos	49
3.2.4	Os tratamentos com T ₃ e E ₂ aumentam a expressão gênica da ecto-5'-nucleotidase	52
3.2.5	Tratamento com os hormônios T ₃ , T ₄ e E ₂ parecem alterar a expressão das NTPDases.....	54
4	DISCUSSÃO.....	56
4.1	<i>Presença de Ectonucleotidases nas CMLVs</i>	56
4.1.1	Nucleot(s)ídeos da adenina na vasodilatação mediada por CMLVs	57
4.1.2	Nucleot(s)ídeos da adenina na proliferação de CMLVs.....	59
4.2	<i>Hormônios Tireoideos e Estradiol e Ectonucleotidases</i>	61
4.2.1	Efeito dos hormônios T ₃ , T ₄ e E ₂ sobre as NTPDases	61
4.2.2	Hormônios T ₃ , T ₄ e E ₂ regulam positivamente a ecto-5'-NT	64
5	CONCLUSÕES.....	69
6	PERSPECTIVAS	70
7	BIBLIOGRAFIA	71

RESUMO

Nucleotídeos extracelulares (ATP, ADP, AMP) e seu derivado adenosina são conhecidos sinalizadores do sistema cardiovascular podendo mediar vários processos fisiológicos entre eles a proliferação celular, agregação plaquetária, inflamação e o tônus vascular. Os níveis destas substâncias, localmente e na circulação sanguínea, são controlados pelas ecto-NTPDases em conjunto com a ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT) que realizam a degradação completa do ATP até adenosina. Os hormônios tireoideanos tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) e o hormônio esteróide sexual estradiol (E_2) atuam ativamente no sistema vascular promovendo vasodilatação. Nosso objetivo foi investigar quais enzimas da família das NTPDases estão presente em células musculares lisas vasculares (CMLVs) e se a atividade destas enzimas pode ser influenciada pela ação desses hormônios, uma vez que seus substratos e produtos podem sinalizar processos de relaxamento/contração muscular.

Para tanto, as CMLVs foram extraídas da artéria aorta de ratos Wistar adultos e cultivadas em meio de cultura DMEM. Após atingirem a confluência, as células foram tratadas com 50 nM de T_3 ou T_4 ou 1 μ M de 17 β -estradiol por 72 horas. As atividades enzimáticas foram medidas pela liberação de fosfato inorgânico enquanto que a expressão das ectonucleotidases foi verificada por imunocitoquímica (proteína) e RT-PCR (RNAm).

Os resultados deste trabalho mostram que as CMLVs expressam as NTPDases 1, 2, 3, 5 e 6 e a ecto-5'-NT, responsáveis pelo controle dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. O tratamento com os hormônios T_3 , T_4 e E_2 nestas células mostrou que a atividade da ecto-5'-NT foi aumentada pelos três hormônios. A análise do RT-PCR demonstrou que os tratamentos foram capazes de aumentar também a quantidade de RNAm da ecto-5'NT, indicando mecanismos de ação genômica dos hormônios estudados. Por outro lado, O tratamento com os hormônios tireoideos não alterou as atividades ATPásica e ADPásica, somente o estradiol foi capaz de aumentar a atividade ATPásica. Estes resultados também sugerem que, pela hidrólise aumentada do AMP, disponibilizem-se níveis maiores de adenosina, com importante potencial vasodilatador local. Entretanto, o fato de o estradiol ter aumentado a hidrólise de ATP, mas não a de ADP, nos permite pensar que o ADP, agregador plaquetário bem estabelecido, possa estar acumulando extracelularmente, contribuindo para o desenvolvimento de problemas circulatórios.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação das NTPDases.....	16
Figura 1.2 - Representação de um corte transversal de um vaso sanguíneo	18
Figura 3.1 - Imunocitoquímica de uma CMLV com anticorpo anti- α -actina	38
Figura 3.2 - Curva de tempo e substrato das atividades ATPásica, ADPásica e AMPásica de CMLVs	40
Figura 3.3 – Imunodeteccção das NTPDases expressas nas CMLVs.....	42
Figura 3.4 – Hidrólise de ATP em CMLVs tratadas com T ₃ , T ₄ e E ₂ por 72 h.....	44
Figura 3.5 – Hidrólise de ADP em CMLVs tratadas com T ₃ , T ₄ e E ₂ por 72 h.....	44
Figura 3.6 – Hidrólise de AMP em CMLVs tratadas com T ₃ , T ₄ e E ₂ por 72 h	45
Figura 3.7 – Curva de tempo de tratamento com T ₃ , T ₄ e E ₂ na hidrólise de ATP	47
Figura 3.8 - Curva de tempo de tratamento com T ₃ , T ₄ e E ₂ na hidrólise de AMP	48
Figura 3.9 – Curva de dose de T ₃ e T ₄ na hidrólise de AMP em CMLVs	50
Figura 3.10 – Curva de dose de E ₂ na hidrólise de AMP em CMLVs	51
Figura 3.11 - Expressão da ecto-5'-NT (CD73) em CMLVs tratadas com T ₃ e E ₂ por RT-PCR.....	53
Figura 3.12 – Expressão das NTPDases de CMLVs tratadas com T ₃ , T ₄ e E ₂ por RT- PCR..	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Agonistas preferenciais dos receptores P2 em mamíferos.	11
Tabela 1.2 – Nomenclatura das NTPDases	14
Tabela 2.1 - Pares de <i>primers</i> das ectonucleotidases e da β -actina de rato	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina 5'-Difosfato

AE – Atividade Específica

AMP – Adenosina 5'-Monofosfato

ATP – Adenosina 5'-Trifosfato

cDNA – Ácido Desoxiribonucléico complementar

CMF-BSS – Solução Salina Balanceada – Livre de Cálcio e Magnésio

CMLV – Célula Muscular Lisa Vascular

DAPI - 4',6'-diamidino-2-fenilindole hidrocloreto

DMEM – Meio Eagle – Dulbecco modificado

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

EP – Erro Padrão

E₂ – 17β-estradiol

HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanosulfônico

PBS – Solução Tamponada de Fosfato

RNA – Ácido Ribonucléico

RNA_m – RNA mensageiro

T₃ – triiodotironina

T₄ - tiroxina

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA PURINÉRGICO

1.1.1 Nucleotídeos da Adenina

Entre as moléculas de sinalização estudadas atualmente, os nucleotídeos extracelulares e seus derivados nucleosídeos têm representado um grupo de grande sucesso evolutivo/adaptativo, desempenhando as mais diversas funções em praticamente todos os tecidos. O envolvimento do ATP extracelular em processos fisiológicos e patológicos como neurotransmissão e neuromodulação no sistema nervoso central e periférico (Boarder et al., 1995); nocicepção (Buell et al., 1996); controle da secreção de glândulas endócrinas (Thorn e Jarvis, 1996); transporte de Cl⁻ no epitélio das vias aéreas (Zimmermann, 1996); na função renal (Dzhandzhugazyan e Bock, 1993) e em doenças dos sistemas ósseo e cartilaginoso (Dzhandzhugazyan e Bock, 1997) nos exemplifica tal funcionalidade. Estes processos relacionados aos nucleotídeos da adenina, ATP e ADP, ocorrem através da interação destas moléculas com os mais variados membros da família de receptores de membrana específicos (P2). Basicamente, os receptores P2 dividem-se em P2X, ionotrópicos que formam canais para passagem de íons quando ativados e P2Y, receptores metabotrópicos acoplados à proteínas G.

Os receptores P2X contêm dois domínios transmembrana e uma grande alça extracelular, glicosilada contendo dez cisteínas conservadas (Idelson, 2001). Atualmente, estão descritos os subtipos de receptores P2X₁₋₇ (Ralevic e Burnstock, 1998) que se distribuem amplamente pelos tecidos desencadeando cascatas de sinalização de diferentes vias. Seu principal agonista é o ATP,

embora outros nucleotídeos como o ADP, UTP e UDP possuam uma afinidade reduzida pelos receptores P2X. Assim, quando o ATP, por exemplo, liga-se a esses receptores, ocorre a abertura de canais não seletivos de cátions, onde a entrada de Ca^{2+} é o principal mecanismo de sinalização. Entre os receptores P2X, o subtipo P2X₇ comporta-se um pouco diferente na medida em que é capaz de abrir um poro na membrana plasmática quando ativado permitindo a entrada de moléculas com peso molecular maior que 900 Da. Além disso, ele próprio parece interagir com diversas proteínas citoplasmáticas (DiVirgilio, 1995; Kim et al, 2001) e só é ativado em altas concentrações de ATP na faixa de mM (Robertson et al, 2001).

Os receptores metabotrópicos P2Y possuem domínios que atravessam sete vezes a membrana plasmática, um domínio N-terminal extracelular e um C-terminal intracelular. Acoplados à proteína G ($G_{i/o}$ ou $G_{q/11}$), estes receptores agem via geração de IP_3 pela fosfolipase C e conseqüente liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares ou via estímulo/inibição da adenilato ciclase (von Kugelgen e Wetter, 2000). Os vários subtipos de receptores P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12 e 13} distinguem-se farmacologicamente pela ordem de efetividade dos agonistas, sendo que alguns preferem pirimidinas a purinas (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Agonistas preferenciais dos receptores P2 em mamíferos. Adaptado de Di Virgilio e Solini, 2002.

Subtipo	Nº de Aminoácidos	Agonistas preferenciais	Transdução de Sinal
P2Y₁	362	ADP	IP ₃ , AMPc
P2Y₂	373	UTP,ATP	IP ₃
P2Y₄	352	UTP	IP ₃
P2Y₆	379	UDP	IP ₃
P2Y₁₁	371	ATP	IP ₃ , AMPc
P2Y₁₂	342	ADP	AMPc
P2Y₁₃	334	ADP	IP ₃ , AMPc
P2X₁	399	ATP	Correntes iônicas
P2X₂	472	ATP	Correntes iônicas
P2X₃	397	ATP	Correntes iônicas
P2X₄	388	ATP	Correntes iônicas
P2X₅	455	ATP	Correntes iônicas
P2X₆	379	ATP	Correntes iônicas
P2X₇	595	ATP	Correntes iônicas

No sistema cardiovascular, os nucleotídeos da adenina mono-, di- e trifosfatados, ao se ligarem em seus receptores de membrana P2, modulam eventos fisiológicos de crescimento celular (Erlinge, 1998), contração/dilatação dos vasos, agregação plaquetária e modulação da transmissão simpática (Ralevic e Burnstock, 1991). Tais eventos, quando desregulados, podem trazer desequilíbrio ao sistema e ao organismo como um todo, tornando-o mais suscetível ao desenvolvimento de doenças cardíacas.

1.1.2 *Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (NTPDases)*

Os níveis de nucleotídeos/nucleosídeos no meio extracelular são finamente controlados por um sistema organizado de enzimas da família das ecto-

nucleotidases as quais atuam coordenadamente em seqüência defosforilando os nucleotídeos, impermeáveis à membrana, até seu nucleosídeo correspondente.

As NTPDases têm capacidade de hidrolisar as ligações dos fosfatos γ e β de nucleosídeos 5'-tri e difosfatos. Dessa maneira fazem parte de seu repertório de substratos não só os nucleotídeos da adenina, mas também os nucleotídeos da guanosina, inosina e uridina. As diferentes especificidades por determinados nucleotídeos revelam características importantes das NTPDases, associadas às suas mais variadas funções e localizações.

As NTPDases compartilham cinco regiões altamente conservadas na seqüência de aminoácidos, provavelmente relacionadas com o sítio catalítico dessas enzimas, e a dependência a cátions divalentes, em geral Ca^{2+} e /ou Mg^{2+} , para sua atividade máxima (Zimmermann, 2001). Embora inibidores clássicos das ATPases dos tipos P, F e V não afetem suas atividades, agentes quelante, azidas e análogos não hidrolisáveis do ATP diminuem significativamente suas habilidades hidrolíticas.

Desde que foram descritas pela primeira vez por Meyerhof em 1945, as NTPDases, que constituem uma família de 8 membros já clonados e caracterizados, receberam diversas denominações. Inicialmente, foram denominadas ATP-difosfohidrolase ou apirase, pela sua capacidade em hidrolisar os dois últimos fosfatos do ATP ou ainda ecto-ATPase, quando a preferência pelo ATP era evidente (Komoszynski e Wojtczak, 1996; Martin-Romero et al., 1996). Com o início das pesquisas moleculares e o seqüenciamento genômico humano, pesquisadores da área como Wang e Guidotti, em 1996, identificaram a proteína

CD39 de superfície celular de linfócitos como uma ecto-apirase. A identificação foi realizada a partir da transfecção do antígeno de ativação linfóide CD39 em células COS-7, o que promoveu um aumento na atividade ATPásica e ADPásica dependente de Ca^{2+} e Mg^{2+} . A partir daí as apirases e ATPases extra e intracelulares começaram a ser distinguidas também pela nomenclatura CD39 (ecto-apirase) e variações: CD39 L1 (ecto-ATPase).

Desde o “2º Workshop Internacional de Ecto-ATPases e Ectonucleotidasas Relacionadas” na Bélgica, em 1999, pesquisadores da área propuseram-se a unificar as denominações dessas enzimas e atualmente, a nomenclatura mais aceita é das NTPDases (*ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*), embora a denominação CD39 ainda seja muito usada no caso das NTPDases de humanos. A Tabela 1.2 reúne os nomes utilizados na literatura associados à nova nomenclatura.

Tabela 1.2 – Nomenclatura das NTPDases

NTPDases	Primeiros nomes	Primeiras Referências
NTPDase 1	CD39/ ATPDase/ ecto-apirase	Wang e Guidotti, 1996, Kaczmarek et al, 1996
NTPDase 2	CD39L1/ ecto-ATPase	Chadwick e Frischauf, 1997, Heine et al, 1999 e Mateo et al, 1999
NTPDase 3	CD39L3/ HB6	Smith et al, 1998
NTPDase 4	UDPase/ LALP70	Wang e Guidotti, 1998
NTPDase 5	CD39L4/ ER-UDPse/ PCPH	Mulero et al, 1999, Trombetta e Helenius, 1999 e Paez et al, 2001
NTPDase 6	CD39L2	Hicks-Berger et al, 2000 e Braun et al, 2000
NTPDase 7	LALP1	Shi et al, 2001
NTPDase 8	---	Bigonnesse et al, 2004

A **NTPDase1**, a **NTPDase2**, a **NTPDase3** e a **NTPDase8** possuem 2 domínios transmembrana próximos de cada porção terminal N- e C- da proteína e o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Elas existem como homo-oligômeros (di-, tri- ou tetrâmeros) e são altamente glicosiladas sendo que seu peso molecular altera de 55kDa de estrutura primária para 70-80 kDa na proteína glicosilada (Carl et al, 1998). A presença de sítios de fosforilação para ação da proteína cinase C e para a proteína cinase dependente de AMPc na porção C-terminal da NTPDase1, sugere que esta enzima possa ser regulada por fosforilação citoplasmática, estando envolvida em padrões de transdução de sinal através da membrana (Smith e Kirley, 1998). De fato, em nosso laboratório, Wink

et al (2000) demonstraram evidências de fosforilação da NTPDase1 de cérebros de rato, o que dá suporte à hipótese de modulação da enzima por fosforilação.

Uma das características importantes que tem sido utilizada para diferenciar as NTPDases encontra-se na razão de hidrólise ATP/ADP que são 1:1, 30:1, 3:1 e 2:1 para as NTPDases 1, 2, 3 e 8 respectivamente, o que reflete suas preferências de substrato.

Já as **NTPDase4**, **NTPDase5**, **NTDase6** e a **NTPDase7** apresentam seu sítio catalítico voltado para o lúmen de organelas intracelulares como aparelho de Golgi e retículo endoplasmático. Entre estas, as NTPDase 5 e 6 podem localizar-se também na membrana plasmática por somente um domínio transmembrana na porção N-terminal, o que permite que elas sejam clivadas proteoliticamente e liberadas para o meio extracelular (Mulero et al, 1999). Enfim, os membros dessa família estão largamente distribuídas nos organismos pluricelulares desde plantas, vermes (*C.elegans*) e animais invertebrados e vertebrados. Apesar de tantas proteínas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos, são as diferenças na velocidade da reação, localização e preferência de substrato e a combinação entre elas que as tornam ferramentas úteis evolutivamente no controle dos níveis de nucleotídeos nas mais diversas situações e processos biológicos.

Por exemplo, dentro do próprio sistema circulatório, existem diferenças entre artérias e veias de cães quanto à remoção do ATP liberado nos vasos sanguíneos sugerindo a expressão diferenciada dos membros das NTPDases (Bobalova et al, 2003). Interessantemente, Sévigny et al em 2002 demonstraram que a NTPDase1 está mais expressa no endotélio e em menor extensão nas

células musculares lisas, enquanto que a NTPDase2 está associada com a adventícia, pericitos microvasculares e outras células do espaço subendocárdico.

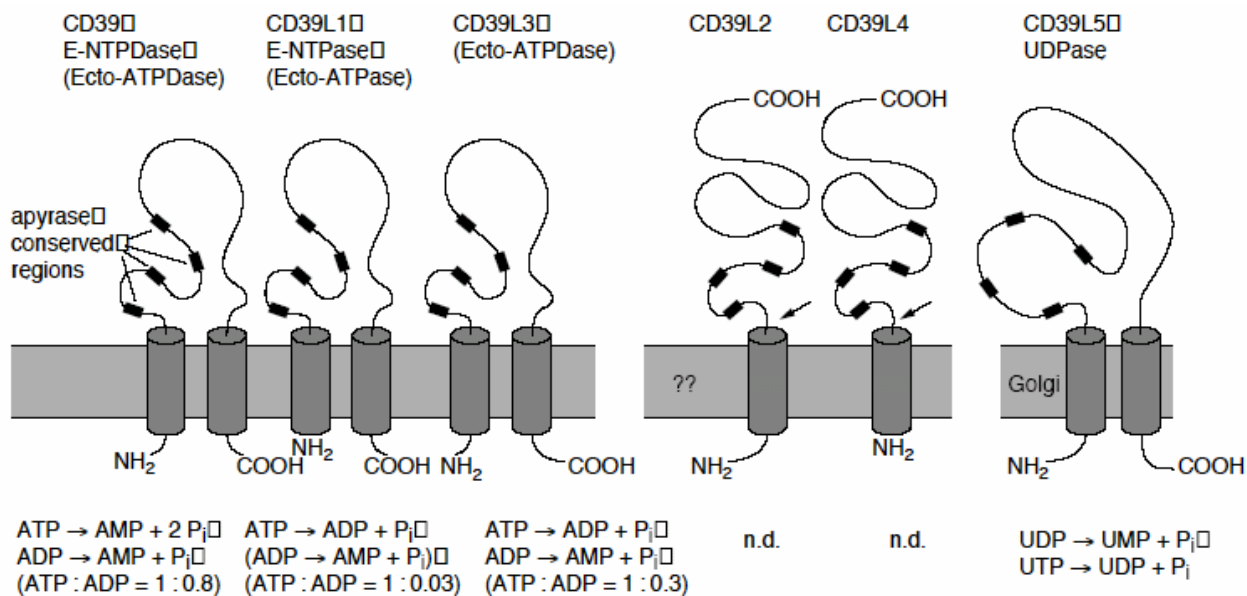


Figura 1.1 - Retirado de Zimmerman, 1999. Topografia de membrana dos membros da família das E-NTPases. As regiões conservadas da apirase situam-se na metade N-terminal de todas as seqüências. Potenciais sítios de clivagem na seqüência hidrofóbica das CD39L2 e L4, que poderiam liberar a forma solúvel da enzima, estão indicados com uma seta. As razões indicam a preferência relativa das ectonucleotidases para ATP e ADP.

1.1.3 Ecto-5'-nucleotidase

Complementando a ação das NTPDases, encontra-se uma enzima denominada ecto-5'-nucleotidase (5'-NT) que retira o fosfato (α) do AMP, liberando adenosina. Sua atividade enzimática não é dependente de cátions divalentes adicionados, mas pode ser aumentada pela adição de concentrações milimoles de Mg₂₊ (Zimmermann, 1992). Contudo, agentes quelantes metálicos provocam uma grande queda na sua atividade, provavelmente interferindo nos potenciais sítios de

ligação ao zinco (Knofel e Strater, 1999). ATP, ADP na faixa de micromolar e α,β -metileno-ADP na faixa de nanomolar (Naito e Lowenstein, 1985) também constituem-se inibidores da ecto-5'-NT. Presente em diferentes tipos celulares: hepatócitos, fibroblastos, células endoteliais, linfócitos, células gliais (Resta et al, 1973), a ecto-5'-NT ocorre como um homodímero de massa molecular entre 62 e 74 kDa ligado por pontes dissulfeto, essenciais para sua atividade (Knofel e Strater, 1999), e está ancorada à membrana através de um resíduo glicosil-fosfatidil-inositol, uma característica que a permite estar associada a microregiões na membrana plasmática denominada "rafts" de lipídios (Babiychuk e Draeger, 2000). Os "rafts" de lipídios proveêm um ambiente favorável a interações específicas, principalmente aquelas envolvidas na transdução de sinal (Simons e Toomre, 2000). Além da sua atividade enzimática, a ecto-5'-NT é descrita como uma importante molécula de adesão e interação celular (Airas et al, 1997), bem como molécula sinalizadora do sistema imune (Resta et al, 1994). Também identificada como um antígeno de ativação linfóide, a ecto-5'-NT também recebe a denominação de CD73 (Airas et al, 1997). Sua importância torna-se ainda maior à medida que seu produto de hidrólise, a adenosina, é um importante nucleosídeo que tem dois destinos no meio extracelular: i) ligar-se aos seus receptores específicos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ ou ii) ser recaptada para o interior celular através de transportadores de nucleosídeos, onde pode ser refosforilada na rota de salvação das purinas gerando mais ATP ou ainda seguir a via de degradação das purinas até ácido úrico. Muitas ações têm sido associadas a esta versátil molécula: vasodilatação (Marshall, 2000), pré-condicionamento e proteção do coração contra

seqüelas da isquemia (Rongen et al, 1997), inibição da agregação plaquetária (Kawashima et al, 2000), aumento da produção de óxido nítrico pelas células endoteliais (Li et al, 1995), liberação de superóxido pelos neutrófilos (Roberts et al, 1985), entre outras.

1.2 CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

As células musculares lisas vasculares (CMLV) são as células que se dispõem na camada média, direcionalmente organizadas entre a camada íntima composta de células endoteliais e a camada adventícia. Possuem morfologia alongada e por sua característica contrátil, participam de muitos processos fisiológicos que incluem a contração e relaxamento dos músculos dos vasos sanguíneos.

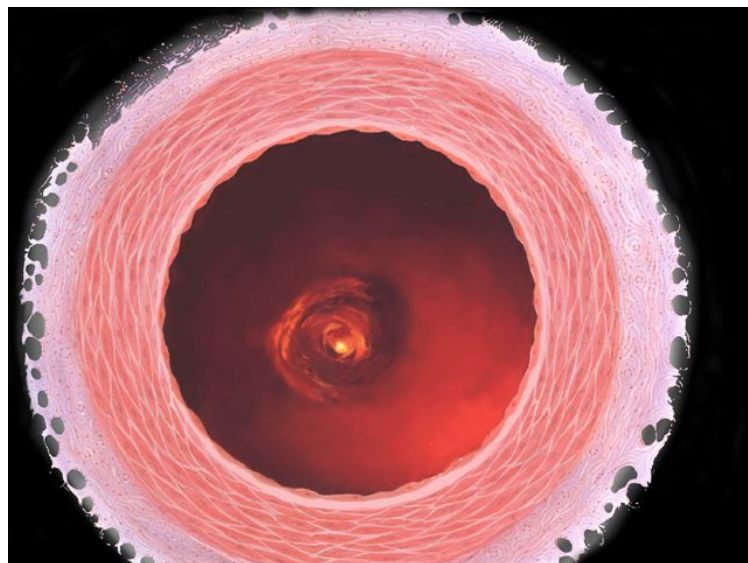


Figura 1.2 - Representação de um corte transversal de um vaso sanguíneo

A presença de receptores purinérgicos (Erlinge, 1998) e membros da família das NTPDases na superfície das membranas destas células (Pearson et al, 1980 e Gordon et al, 1989) apontam para a existência de um sistema adenosinérgico atuante e modulável. De fato, as moléculas ATP e adenosina são consideradas potentes vasodilatadores, capazes de modificar parâmetros hemodinâmicos (Rongen et al, 1997). Tem sido sugerido que fatores externos também contribuem para a modulação desse sistema atuando em conjunto com os nucleotídeos, como por exemplo, polifenóis derivados da uva que podem atuar na liberação de nucleotídeos vasodiladores (Mendes et al, 2003). Além disso, este tipo celular responde ao estímulo do ATP extracelular acionando eventos importantes na proliferação celular como a síntese de DNA, a síntese de proteína, a ativação dos genes de ação imediata, a progressão do ciclo celular e a fosforilação da tirosina (Erlinge, 1998). Ainda, esta ação mitogênica do ATP aumenta grandemente na presença de outros fatores de crescimento: IGF, EGF, PDGF e inclusive a insulina (Erlinge et al., 1993 e Wang et al, 1992). Tais efeitos mitogênicos do ATP e ADP tornam-se relevantes uma vez que a proliferação das CMLVs é um dos passos da formação da placa de aterosclerose.

Estudos com agonistas de receptores P2 demonstraram que os efeitos contráteis do ATP são mediados por receptores P2X (Ralevic e Burnstock, 1991) enquanto que os efeitos mitogênicos seriam mediados pela ativação dos receptores P2Y (Erlinge, 1998 e Di Virgilio e Solini, 2002).

Por fim, este tipo celular apresenta dois fenótipos. O fenótipo contrátil, encontrada principalmente em indivíduos adultos, apresenta-se como uma célula diferenciada com proteínas do citoesqueleto necessárias para a

contração/relaxamento celular. Em algumas circunstâncias patológicas, como a lesão aterosclerótica ou restenose após angioplastia, esta célula pode reverter para o fenótipo sintético, tornando-se uma célula menos diferenciada, mais característica ao estado fetal, adquirindo habilidade proliferativa e secretória (Gorsky e Walsh, 1995). Nesta fase, as CMLVs passam a secretar IL-8, MCP-1, $TNF\alpha$, IL-1, $TGF\beta$ (Watson et al, 1998) cuja interação com as células endoteliais provoca respostas inflamatórias, permitindo a adesão de leucócitos e diapedese e sensibilizando-os às citocinas liberadas pela circulação sistêmica (Kiechl et al, 2001). Neste contexto, estudos com expressão de receptores P2 mostraram que de acordo com o fenótipo da CMLV existe uma expressão diferenciada dos receptores P2 (Erlinge et al, 1998), apontando mais uma vez para o importante envolvimento do sistema purinérgico neste tipo celular.

1.3 HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

Os hormônios tireoideanos são fundamentais não somente durante o período embrionário marcando um padrão de desenvolvimento temporal adequado, mas também na manutenção da qualidade da vida adulta regulando crescimento, diferenciação e o metabolismo do organismo como um todo. Para isso, a glândula tireóide, sob ação do hormônio tireotrófico (TSH) produzido pela hipófise, secreta basicamente tiroxina (T_4) que é distribuída por todo o corpo através da circulação sangüínea. A molécula de T_4 então é transformada em triiodotironina (T_3), o principal hormônio tireoideano, pela ação das desidases, que retiram um iodo do T_4 conforme a regulação de cada tecido. As diferentes isoformas de desidases (D1, D2 e D3) também contribuem para o nível

diferenciado de T_3 em locais e tempos específicos (Nunes, 2003). A D1 está presente na glândula tireóide, no fígado, no rim e muitos outros tecidos e mantem os níveis de T_3 circulantes, enquanto que a D2 encontra-se em poucos tecidos incluindo o sistema nervoso central e na gordura marrom de ratos e está mais relacionada à produção local de T_3 .

O mecanismo de ação mais conhecido do T_3 é a sua interação com receptores nucleares (TRs) que são eles próprios fatores de transcrição capazes, portanto, de ligarem-se a seqüências específicas de DNA que contenham um elemento responsivo ao hormônio tireoideo (TREs). Os receptores TRs estão subdivididos em $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$, $TR\beta_1$ e $TR\beta_2$ e compõem uma família de receptores nucleares juntamente com os receptores de glicocorticóide, mineralocorticóides, estrogênios, progestogênios, vitamina D e ácido retinóico. Esta ligação do receptor ao DNA promove a ativação ou inibição da expressão das proteínas codificadas pelos seus genes-alvo, muitas vezes com a participação de outras proteínas co-ativadoras e co-repressoras respectivamente. Diversos são os genes alvos do hormônio tireóideos T_3 , entre eles podem-se citar os genes: a) do hormônio do crescimento, participando ativamente do processo de crescimento (Volpato e Nunes, 2001), b) das cadeias pesadas de miosina responsáveis pelo aumento da velocidade de contração nos músculos cardíaco e esquelético (Santos et al, 2001), c) do fator de crescimento neural NGF possibilitando a proliferação neural, mielinização, sinaptogênese e vascularização do SNC e, portanto essencial para o desenvolvimento neural (Smith et al, 2002), d) do TSH exercendo “feedback” negativo (Shupnik, 2000) e das enzimas relacionadas ao metabolismo

ajudando a manter o equilíbrio metabólico. A presença das quatro isoformas dos receptores TR nas CMLVs evidenciam que esta via de ação dos hormônios tireoideanos é funcional (Ojamaa et al, 1996).

Entretanto, alguns efeitos dos hormônios tireoideanos têm sido observados em tempos muito curtos para uma ação nuclear ou ocorrem na presença de actinomicina, um bloqueador da transcrição gênica, ou ainda em células anucleadas como as hemácias. Tais evidências apontam para uma ação não genômica destes hormônios, atribuindo inclusive diferentes rotas de sinalização envolvendo AMPc, calmodulina, fosfatidilinositol e proteínas cinases (Davis e Davis, 1996).

No sistema cardiovascular, muitos são os efeitos dos hormônios tireoideanos, entre eles, alterações nos parâmetros hemodinâmicos: diminuição da resistência vascular sistêmica, aumento do relaxamento diastólico, aumento da contratilidade e da taxa cardíaca, causando a elevação no “output” cardíaco (Levey e Klein, 1990). Em nível molecular, os hormônios tireoideanos regulam uma série de genes miócitos-específicos e portanto, a expressão das seguintes proteínas: cadeia pesada da miosina (MHC), ATPase cálcio-ativada do retículo endoplasmático (SERCA), fosfolambam, receptores α - e β -adrenérgicos, adenilato ciclase, proteína cinase C, e uma variedade de canais iônicos (Sussman, 2001). Os hormônios tireoideanos são vasodilatadores bastante conhecidos na clínica diminuindo a resistência vascular cardíaca quando administrados após cirurgia cardíaca (Klemperer et al, 1995) ou ainda, em estudos *in vitro* atuando diretamente no relaxamento de CMLVs cultivadas sobre uma matrix deformável

(Ojamaa et al, 1996). Embora ambos os hormônios tireoideanos T_3 e T_4 relaxem artérias pré-contraídas, o T_3 é muito mais efetivo (Park et al, 1997). Além disso, Mizuma et al, 2001, mostraram a expressão da desidrase tipo II nesse tipo celular, dando suporte ao envolvimento direto das CMLVs no relaxamento muscular de vasos tratados com hormônio tireoideanos, entretanto o mecanismo de ação deste processo ainda é desconhecido.

1.4 HORMÔNIOS ESTERÓIDES SEXUAIS

Os hormônios esteróides, sintetizados a partir do colesterol, atuam por todo o organismo participando em diversos processos fisiológicos. Dentre essa grande família, os hormônios esteróides sexuais têm sob sua regulação o desenvolvimento dos órgãos e características sexuais desde a embriogênese até a vida adulta. Os hormônios esteróides sexuais femininos estrogênio e progesterona são produzidos pelos ovários estimulados pelo hormônio folículo estimulante (FSH) liberado da glândula pituitária anterior. Uma vez na circulação, os hormônios esteróides atingem todos órgãos e atuam sobre as células que possuem os receptores específicos para eles. Os receptores mediadores dos efeitos dos hormônios esteróides sexuais podem ocorrer em três níveis celulares: de membrana, citosólico e nuclear. Os sítios alvos de membrana e citosólico envolvem sinalizações via cascatas de cinases e por isso os efeitos são denominados não-genômicos. Os receptores nucleares $ER\alpha$ e $ER\beta$, por sua vez, desencadeiam mecanismos genômicos clássicos no qual o complexo hormônio-receptor ativa diretamente a transcrição de genes que contenham, na sua região promotora, um elemento responsivo a esteróides (SRE) (Valverde e Parker, 2002).

Independente do mecanismo de ação, os hormônios esteróides podem influenciar diversos processos fisiológicos e patológicos no sistema cardiovascular, evidenciado principalmente por estudos comparativos entre os períodos pré-menopausa, no qual os hormônios esteróides são sintetizados ciclicamente, e pós-menopausa, quando essa síntese é praticamente nula. Por muitas décadas os hormônios esteróides tiveram seu papel cardioprotetor bem documentado: provocando mudanças nos perfis de lipídios no plasma, diminuindo colesterol total (Farish e tal, 1996), atuando como potentes anti-oxidantes, diminuindo a peroxidação lipídica e a formação de espécies reativas de oxigênio (Ayers et al, 1998) e também como vasodilatador, via liberação de óxido nítrico (Collins et al, 1994). Nas CMLVs, os estrogênios promovem diminuição da proliferação celular, rápida vasodilatação e podem reduzir a secreção de colágeno e a deposição de matrix extracelular (Farhat et al, 1996),

Por outro lado, recentes testes clínicos randomizados dos grupos de pesquisa HERS (The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study) de Hulley et al, 1998, o ERA (Estrogen and Atherosclerosis) de Herrington et al, 2000 e o WHI-HRT (Women's Health Initiative Hormone Replacement Trial) em 2002 alertaram para os dados controversos obtidos com a terapia de reposição hormonal. Este tratamento aumentou o risco de doenças cardíacas, derrame, câncer de mama invasivo e tromboembolismo venoso. Nesse sentido, vários trabalhos surgiram na tentativa de explicar os mecanismos envolvidos nessa contradição. He e colaboradores, em 2001 mostraram a elevação de fatores pró-coagulantes FVIIa (fator VII ativado), FVIII (fator VIII) e vWF (fator von Willebrand) no plasma do grupo que recebia altas doses de estradiol (E_2). No estudo da WHI,

mulheres que desenvolveram doenças cardíacas coronarianas tinham níveis basais de IL-6, uma citocina envolvida na etiologia dessas doenças, maiores que o grupo controle.

Inclusive o sistema purinérgico tem sido investigado e alguns trabalhos já evidenciam sua ligação com os hormônios esteróides sexuais. Exposições ao estradiol regulam positivamente uma Ca^{2+} -ATPase de membrana via sinalização da PI3K/Akt (Pedram et al, 2002) e inibem as correntes iônicas de ativação do receptor P2X_7 (Cario-Toumaniantz et al, 1998). Enquanto que a privação de hormônios esteróides por ovariectomia causa um aumento da expressão da ecto-ATPase em determinadas regiões cerebrais (Nedeljkovic et al, 2000) e da ecto-5'-NT de sinaptossomas de córtex (Rücker et al, 2005).

Tantas controvérsias advêm, em parte, da diversidade das doses de hormônio, do tempo de tratamento, da forma de administração dos hormônios, da expressão diferenciada dos receptores ER e das espécies de animais utilizados em cada estudo. Nakamura e colaboradores, em 2004, mostraram que o efeito inibitório na proliferação de CMLVs era mediado por receptores $\text{ER}\alpha$, receptor ativado com baixas concentrações de E_2 e que estes receptores estão diminuídos em CMLVs de mulheres com aterosclerose. A proteína reativa-C (CRP) utilizada como marcador inflamatório de altos riscos de doenças cardiovasculares, por exemplo, encontra-se aumentada em tratamentos com estradiol oral (Pradham et al, 2002), mas não com o estradiol administrado transdermicamente (Decensi et al, 2002). A elevação desta mesma proteína foi inibida dose-dependentemente pela co-administração de progestinas ao tratamento de CEE (estrogênios eqüinos

conjugados), sugerindo que as progestinas poderiam inibir os efeitos pró-inflamatórios dos estrogênios (Wakatsuki et al, 2002). Muitos estudos ainda são necessários para melhor entender os mecanismos pelos quais os hormônios esteróides atuam e para que num futuro não tão distante as terapias de reposição hormonal possam ser direcionadas de acordo com a forma de hormônio administrado, as ocasiões necessárias, as doses e o tempo de tratamento e principalmente de acordo com o perfil da paciente em questão.

Considerando os efeitos fisiológicos dos hormônios tireoideanos e estradiol no sistema cardiovascular e ao mesmo tempo considerando a possibilidade de os nucleotídeos serem lançados ao meio externo para serem ainda clivados por ectonucleotidases até a formação de adenosina, o principal objetivo deste trabalho é investigar o efeito do tratamento com hormônios tireoideano e estradiol sobre a hidrólise dos nucleotídeos em células musculares vasculares lisas. Antes disto, considerando que em nosso laboratório não trabalhávamos com células musculares lisas, a primeira etapa deste trabalho se constituiu na padronização da extração e do cultivo destas células assim como as condições de ensaio das ectonucleotidases nestas culturas.

OBJETIVOS

Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho são:

- 1) Padronizar o preparo e as condições de cultivo de células musculares lisas de aorta de rato;
- 2) Padronizar a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP por células musculares lisas em cultura;
- 3) Identificar a expressão das NTPdases (1,2,3,5 e 6) nestas células;
- 4) Investigar o efeito dos hormônios tireoideanos (T_3 e T_4) e do 17- β -estradiol sobre a hidrólise dos nucleotídeos;
- 5) Investigar o efeito dos hormônios tireoideanos (T_3 e T_4) e do 17- β -estradiol sobre a expressão das ectonucleotidases nestas células.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos Wistar adultos, de 60 dias de idade, procedentes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Para anestésiar os animais foi utilizado Tiopental Sódico da Abbott.

2.1.2 Reagentes

2.1.2.1 Cultura de células

As garrafas e placas de 24 poços foram adquiridas da TPP. Os reagentes para as soluções da cultura seguem-se listados juntamente com sua devida marca: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/DMEM (Gibco), NaHCO₃ (Nuclear), HEPES (Sigma), Glicose (Reagen), Penicilina/Streptomicina (Gibco), Soro Fetal Bovino (Cultilab), Tripsina (Gibco), NaCl (Nuclear), KCl (Reagen), Na₂HPO₄ (Merck), KH₂PO₄ (Merck). O meio de cultura DMEM foi preparado com DMEM 1%, HEPES 8,39 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, 100 U Penicilina/Streptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino ou 30% quando indicado, sendo seu pH ajustado para 7,3. A solução de CMF-BSS (Calcium- and Magnesium-Free Balanced Salt Solution), pH 7,4, utilizada para lavar as células antes da tripsinização, continha NaCl 137 mM, KCl 5,36 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM e glicose 6,1 mM. Todas as soluções utilizadas na cultura de células foram preparadas em água do aparelho MilliQ e esterilizadas por filtração em membrana de 0,2 mm de poro da Millipore.

Para o tratamento com os hormônios, foram utilizados 3,3,5-triiodotiroxina (T_3), tiroxina (T_4) e 17- β -estradiol (E_2) encapsulado por ciclodextrina, todos da Sigma.

2.1.2.2 Ensaio da Atividade Enzimática das Ectonucleotidases

Para estes experimentos foram utilizados:

a) meio de incubação das células contendo, na concentração final, $CaCl_2$ (Merck) 2 mM, para incubação com ATP e ADP ou $MgCl_2$ (Merck) 2 mM, para incubar AMP, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, glicose 10 mM, Hepes 20 mM, pH 7,4. Os nucleotídeos ATP, ADP e AMP foram adquiridos da Sigma. O ácido tricloroacético (TCA) foi proveniente da Nuclear.

b) Os reagentes para o preparo do reagente de cor: Verde Malaquita 0,812% (Sigma), Molibdato de Amônio 5,7% (Nuclear) e Álcool Polivinílico 23,6% (Vetec) foram preparados separadamente e misturados por 30 minutos antes do uso na proporção de 2:2:1:1 de verde de malaquita, água milliQ, molibdato de amônio e álcool polivinílico, respectivamente. Como padrão de fosfato inorgânico foi utilizada uma solução de KH_2PO_4 200nmol/mL.

c) Para a dosagem da proteína utilizaram-se os reagentes NaOH 1M (Synth) para solubilizar as amostras; reagente de cor: 1g de Coomassie Brilliant Blue G (Sigma) dissolvido em 50 mL de álcool etílico 95% e 100 mL de ácido ortofosfórico 85% (Quimex) em 1000mL de água, filtrado 2 vezes em papel filtro; e Albumina Bovina da Sigma como padrão de proteína.

2.1.2.3 Imunocitoquímica

As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro (*coverslips*) (Glasstécnica) e incubadas em placas de Petri de 6 cm de diâmetro da TPP. Os demais reagentes utilizados na imudeteção foram: Tampão Fosfato (PBS) (Na_2HPO_4 1,5 mM, NaCl 138 mM, KCl 2,68 mM, pH 7,4) Álcool Metílico (Vetec), Albumina Bovina, Triton X-100 (Nuclear), anticorpos primários feitos por imunização de coelhos com um peptídeo correspondente a cada proteína relatada neste estudo, anticorpos secundários Alexafluor 594 (anti-soro de camundongo) e 488 (anti-soro de coelho) da Invitrogen na concentração de 2 mg/mL, 4',6'-diamidino-2-fenilindole hidrocloreto (Dapi) da Molecular Probes e Fluoromount-G da Southern Biotechnology Associates.

2.1.2.4 RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa

Reagentes para extração de RNA: Trizol (Invitrogen), Clorofórmio (Merck), Álcool Isopropílico (Merck) e Álcool Etílico 75% (Quimex).

Nas reações de RT-PCR foram utilizados: Enzima Transcriptase Reversa (Promega), *Primers* OligodT (RW Genes), dNTPs (Gibco), Enzima Taq Polimerase (CenBiot-UFRGS) e *Primers* Específicos construídos pela Invitrogen.

O gel de eletroforese foi feito de Agarose (Promega) com Brometo de Etídio (Gibco) diluídos em Tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1mM) e as amostras preparadas para a corrida com tampão de amostra composto de Glicerol 30% (USB) e Azul de Bromofenol 0,25% (Merck). O Padrão de 100 pares de base foi proveniente da Promega.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cultura de Células

Para extração das células musculares lisas vasculares foi utilizada a técnica de explante na qual os ratos, 2 ou 3 animais, anestesiados com 1mL de Tiopental Sódico, tiveram suas cavidades abdominais abertas longitudinalmente e a artéria aorta dissecada, colocadas em uma placa de Petri contendo DMEM suplementado com 30% SFB (DMEM 30% SFB), em gelo e levadas para a capela de fluxo laminar. Todos os passos seguintes foram realizados dentro da capela sob condições assépticas. Retirado o tecido conjuntivo que envolve o vaso, a artéria foi cortada em 4 ou 5 fragmentos de 1cm aproximadamente. Os fragmentos foram abertos longitudinalmente, expondo o interior do vaso. Com auxílio de uma pequena espátula, o endotélio foi retirado por raspagem. Após este procedimento, os fragmentos abertos foram transferidos para outra placa de Petri, para cultura de células, com o interior voltado para baixo em contato direto com a superfície da placa e em cima deles adicionado 30 μ L de DMEM 30% SFB. As placas foram levadas a estufa de 37°C, com atmosfera enriquecida com 5%CO₂. Os fragmentos foram incubados por aproximadamente dois dias nestas condições, com constantes adições de 30 μ L de DMEM 30% SFB, suficientes para formar uma pequena poça ao redor deles. Nesse período, espera-se que as CMLVs pelo estímulo da alta concentração de soro proliferem e façam adesão à placa. Ao final deste período, os fragmentos foram retirados com uma pinça estéril e a placa totalmente preenchida com DMEM 30% SFB para permitir o crescimento das células. Após aproximadamente duas semanas, as células foram tripsinizadas e

transferidas para uma garrafa de cultura de 25 cm². A partir daí as células foram utilizadas para os diversos experimentos respeitando o limite de 3 a 4 passagens e o soro do meio DMEM reduzido para 10%.

2.2.2 *Tratamento com os hormônios*

Placas de 24 poços contendo CMLVs confluentes foram submetidas ao tratamento com 50 nM de T₃ ou 50 nM de T₄ ou 1 μM de estradiol dissolvidos em DMEM suplementado com 0,5% de soro fetal bovino até 72 horas. As concentrações e o tempo foram variados em experimentos específicos.

2.2.3 *Ensaio da Atividade Enzimática das Ectonucleotidases*

As placas de 24 poços contendo as CMLVs foram lavadas com o meio de incubação livre de fosfato por três vezes a 37°C. A incubação iniciou-se com a adição de 1mM de nucleotídeo ATP, ADP ou AMP dissolvidos nos seus respectivos meios de incubação. Após 10 minutos de reação a 37° C, uma alíquota de 150 μL de cada poço foi transferida para um tubo *ependorf* contendo 150 μL de TCA 10% em gelo. Controles sem a adição de nucleotídeos e na ausência de células foram devidamente realizados. Quando necessárias, diluições foram feitas a partir dos *ependorfs* para a coloração de verde malaquita. Esta técnica, descrita por Chan, 1986, mede a quantidade de fosfato inorgânico, neste caso, proveniente da hidrólise dos nucleotídeos oferecidos às enzimas. Em cada amostra foi adicionado então 1mL do reagente de cor e após 20 min foram lidas em espectrofotômetro a 360nm. Como padrão foi utilizada uma solução de fosfato inorgânico. Após medida da proteína conforme descrito a seguir, as atividades específicas foram expressas em nmol de Pi/min/mg de proteína.

2.2.4 Determinação da proteína

Após as incubações, a camada celular foi solubilizada em NaOH 1M e a proteína total quantificada pelo método do Coomassie Blue (Bradford,1976), considerando como proteína padrão albumina bovina sérica 1mg/mL.

2.2.5 Imunocitoquímica

Para confirmar a extração do tipo celular deste estudo e também no intuito de identificar quais enzimas da família das NTPDases estavam presentes nas CMLVs, estas células foram semeadas sobre lamínulas de vidro estéreis. Durante o experimento, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS), fixadas com metanol absoluto por 20 min a -20°C e lavadas novamente. Uma vez permeabilizadas e bloqueadas com triton X-100 0,1% diluído em solução de albumina 3% por 10 min, as lamínulas foram incubadas durante uma noite a 4°C separadamente com os anticorpos primários específicos para cada proteína: anti- α -actina e anti-vimentina (monoclonal, Sigma); C10 anti-NTPDase1 de rato, BZ3 anti-NTPDase2 de rato, anti-NTPDase3 de humano, anti-NTPDase5 de humano e anti-NTPDase6 de humano (policlonais). As diluições foram de 1:400 para a anti- α -actina e de 1:200 ou 1:100 para os anticorpos das demais proteínas. Após este período, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário acoplado a um fluoróforo (molécula que emite fluorescência quando excitada por um determinado comprimento de onda), neste estudo: rodamina (anti-IgG de camundongo) e fluoresceína (anti-IgG de coelho), na diluição de 1:500 por 2 horas à temperatura ambiente. Por fim, as células foram incubadas com DAPI 300 nM por 5 minutos para marcação do núcleo e montadas em lâminas de microscópio sobre uma

substância que mantém a fluorescência denominada Fluoromount. A visualização das lâminas foi feita em microscópio de fluorescência nos filtros para fluoresceína 525 nm, para rodamina 488 nm e para DAPI 400 nm. As fotos das células foram tiradas em filme fotográfico de 24 poses, asa 400. As fotos digitalizadas foram sobrepostas com o programa Image J.

2.2.6 RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa

Para estudar a expressão das ecto-nucleotidases, garrafas contendo as CMLVs com ou sem tratamento, foram lavadas em gelo com tampão fosfato PBS gelado e lisadas com 500 μ L de TRIZOL. O homogeneizado foi raspado com um raspador de células estéril e recolhido em um tubo livre de RNAses. O RNA total foi extraído seguindo o seguinte protocolo: adicionou-se 300 μ L de clorofórmio e após três minutos de agitação à temperatura ambiente, centrifugou-se por 15 min a 12.000 rpm. Separada a fase aquosa, adicionou-se 750 μ L de isopropanol, com agitação de 10 min seguida de centrifugação por 10 min a 12.000 rpm. O sobrenadante desta centrifugação foi descartado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 75% gelado e centrifugado novamente por 10 min a 12.000 rpm. O sobrenadante mais uma vez foi descartado e o tubo foi deixado aberto por aproximadamente 10 min para evaporação do etanol remanescente. As amostras foram solubilizadas em 20 μ L de água livre de RNAses e alíquotas foram retiradas para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Iguais quantidades de RNA (2,5 μ g) foram separadas para a reação da transcriptase reversa, realizada segundo as recomendações do fabricante (Promega). Neste

passo, o RNA serve de molde para a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNA (cDNA).

O cDNA de interesse foi amplificado pela Taq Polimerase na reação de PCR com o anelamento de *primers* específicos para um determinado fragmento do gene em questão. Neste estudo foi utilizado 1 µL do produto da reação de RT (cDNA), 0,5 µM de cada par de *primer* e 0,5 U de Taq Polimerase em um volume final de 20 µL. Os *primers* utilizados nesse estudo basearam-se no artigo de Vollmayer et al, 2001 e estão listados na Tabela 1.

Tabela 2.1 - Pares de *primers* das ectonucleotidases e da β-actina de rato

<i>Primer</i>	Seqüência	Tamanho do produto
NTPDase1 sense NTPDase1 antisense	5'-GATCATCACTGGGCAGGAGGAAGG-3' 5'-AAGACACCGTTGAAGGCACACTGG -3'	543 pb
NTPDase2 sense NTPDase2 antisense	5'-GCTGGGTGGGCCGGTGGATACG -3' 5'-ATTGAAGGCCCGGGGACGCTGAC -3'	331 pb
NTPDase3 sense NTPDase3 antisense	5'- CGGGATCCTTGCTGTGCGTGGCATT-3' 5'-TCTTTCTAGAGGTGCTCTGGCAGGAATCAGT -3'	267 pb
NTPDase5 sense NTPDase5 antisense	5'- GGGATCCTTTGAGATGTTTAACAGCACT-3' 5'- GAATTCTTGGTTACCACCATACTGGTA-3'	210 pb
NTPDase6 sense NTPDase6 antisense	5'-GAATTCCTTGTCGGGGATGACTGTGTT-3' 5'-ATCTGAGTGGATCCTCCGCCCAA-3'	156 pb
5'-NT sense 5'-NT antisense	5'-CCCGGGGGCCACTAGCACCTCA-3' 5'-GCCTGGACCACGGGAACCTT-3'	403 pb
β-actina sense β-actina antisense	5'-TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG-3' 5'-TACTCCTGCTTCCTGATCCACAT-3'	210 pb

Os passos dos ciclos foram estabelecidos em: 1 min a 95°C, 1 min a 94°C, 1 min a 60°C (temperatura de anelamento dos *primers*), 1 min a 72°C e uma

extensão final de 10 min a 72°C. Terminada a reação, as amostras foram preparadas com a adição de tampão de amostra (glicerol e azul de bomofenol) na proporção de 1:5 de tampão e amostra, respectivamente. Dez microlitros dos produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 1% contendo 1 µL de Brometo de Etídio para cada 100 mL juntamente com um padrão de 100 pares de bases. O brometo de etídio é um corante fluorescente que se intercala entre as bases do DNA e, sob radiação ultravioleta permite a visualização e a fotografia digital do DNA em aparelho transluminador. A corrida foi realizada em tampão TAE com corrente elétrica de voltagem constante de 100 V, 80 mA por aproximadamente 40 minutos.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste trabalho foram analisados utilizando-se o teste T de Student ao comparar controle e tratamentos. No caso de verificação de dependência de dose ou tempo realizou-se uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey em conjunto com regressão linear. O programa estatístico utilizado foi o SPSS para Windows e foram considerados significativos valores de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $F > 4$. O valor do “n” variou com os experimentos, estando sempre indicado nas figuras.

3 RESULTADOS

3.1 CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES E ECTONUCLETIDASES

3.1.1 Padronização da cultura e identificação do tipo celular extraído

Inicialmente, foram objetivos desta dissertação a implementação e a padronização da extração das Células Musculares Lisas Vasculares (CMLV) a partir da dissecação da artéria aorta de ratos adultos pela técnica de explante. Uma vez obtida uma cultura de células com as características morfológicas descritas para estas células, a saber: formato alongado e disposição ordenada quando em confluência, utilizamos uma proteína marcadora de células musculares lisas a fim de confirmar nosso processo de extração e verificar a pureza da cultura obtida. Para tanto, as células extraídas foram plaqueadas em lamínulas de vidro, fixadas e submetidas à imunodeteção utilizando-se anticorpo monoclonal anti- α -actina. A Figura 3.1 mostra que as células extraídas por explante apresentam uma intensa marcação para este anticorpo, podendo-se observar as fibras de estresse espalhadas por toda célula, confirmando a prevalência deste tipo celular nas culturas. A falta de marcação na imunodeteção com anticorpo anti-vimentina, proteína marcadora de fibroblasto, nos permite excluir contaminações com estas células na cultura de CMLV. Células incubadas somente com o anticorpo secundário não apresentaram fluorescência (dado não mostrado).

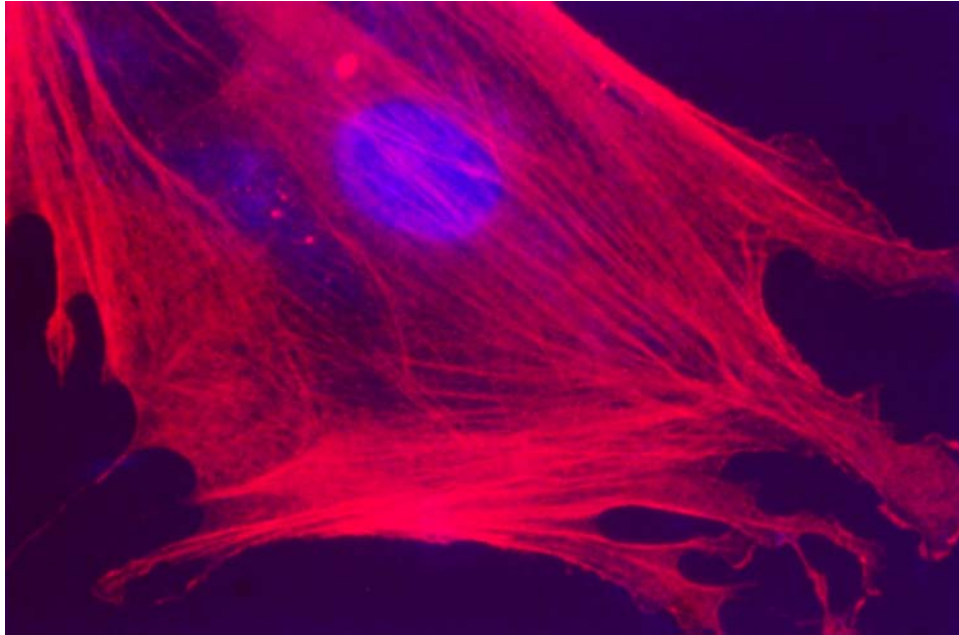


Figura 3.1 - Imunocitoquímica de uma CMLV marcada com anticorpo anti- α -actina em vermelho; os núcleos estão marcados em azul. Aumento de 4000x. Figura representativa de 3 experimentos independentes.

3.1.2 *Padronização das condições de ensaio das ectonucleotidases em CMLVs*

Uma vez estabelecidas as condições de cultura das CMLVs, iniciamos a padronização das condições de ensaio das ectonucleotidases neste material. Para tanto, foram realizadas curvas de tempo e substrato para determinar o tempo e a concentração dos respectivos substratos a fim de garantir a linearidade da reação. Primeiramente, monocamadas de CMLVs foram incubadas com os substratos das ectonucleotidases por diferentes tempos de reação. Os resultados estão representados na Figura 3.2A que mostra a quantidade de fosfato inorgânico liberado na reação por minuto. Entre os tempos 5 e 20 minutos as três atividades de hidrólise são lineares com o tempo, demonstrando que a enzima está em velocidade inicial nas condições de estabelecidas. Na Figura 3.2B pode-se verificar que entre as concentrações de 1,0 e 5,0 mM, a quantidade de fosfato inorgânico liberado não foi significativamente diferente, o que nos assegura que nessas concentrações de substrato, as enzimas devem estar saturadas nas condições de incubação utilizadas. A partir desses resultados, escolhemos o tempo de incubação de 10 minutos e a concentração de 2,0 mM de substrato para os próximos experimentos.

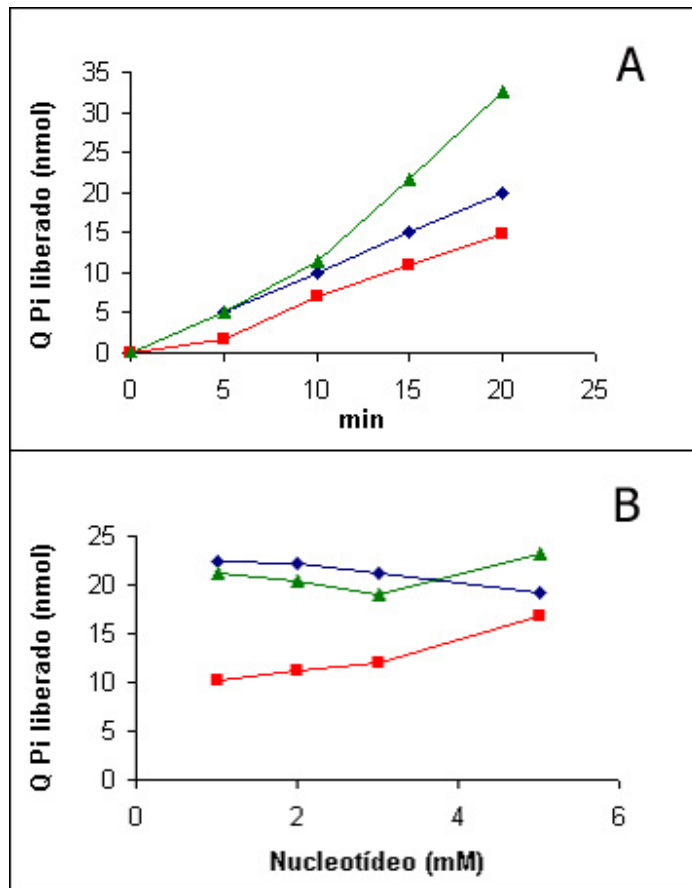


Figura 3.2 - Curva de tempo (A) e de substrato (B) das atividades ATPásica (losango), ADPásica (quadrado) e AMPásica (triângulo) de CMLVs. As culturas de células foram incubadas como descrito em Material e Métodos com diferentes concentrações de nucleotídeos por tempos variados. n = 3

3.1.3 *Investigação das NTPDases expressas em CMLVs*

Embora a existência de ectonucleotidasas em CMLVs tenha sido descrita já há algum tempo, nada se sabe acerca da expressão das diferentes enzimas da família das NTPDases nestas células. Desta forma, a fim de investigar quais enzimas da família das NTPDases estariam presentes nas CMLVs foi realizada imunodectecção com anticorpos específicos contra pelo menos seis das diferentes NTPDases responsáveis pela hidrólise de ATP e ADP. Novamente, as células foram submetidas a experimentos de imunocitoquímica utilizando-se anticorpos primários policlonais. Os resultados, agrupados na Figura 3.3 mostram que as CMLVs expressam as NTPDases 1, 2, 3, 5 e 6. Controles de incubação com somente o anticorpo secundário não apresentaram nenhuma marcação.

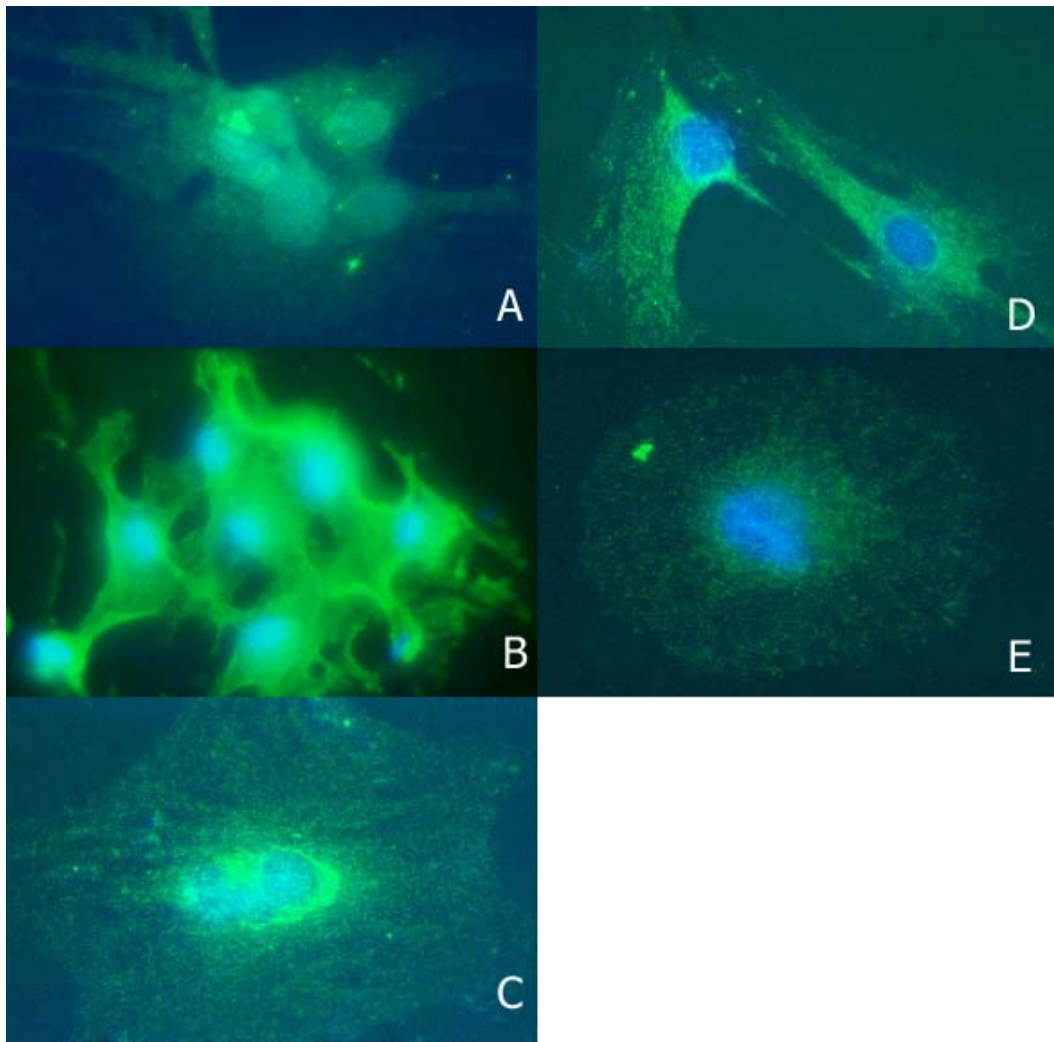


Figura 3.3 – Imunodeteção das NTPDases expressas nas CMLVs. Foram utilizados anticorpos primários policlonais, em verde, contra as seguintes proteínas: (A) NTPDase 1, (B) NTPDase 2, (C) NTPDase 3, (D) NTPDase 5 e (E) NTPDase 6. Em azul, tem-se a marcação do núcleo. Aumento de 1000x nas fotos A, B e D e 4000x em C e E. Figura representativa de 3 experimentos independentes.

3.2 TRATAMENTO HORMONAL NAS CULTURAS DE CMLVS

3.2.1 *Tratamentos com hormônios tireoideanos e estradiol alteram a hidrólise de ATP e AMP*

Diversos trabalhos têm evidenciado o envolvimento tanto dos hormônios tireoideanos quanto do estradiol na modulação do sistema cardiovascular. No intuito de verificar se as enzimas ectonucleotidásicas estariam participando, pelo menos em parte, desta modulação exercida pelos hormônios, culturas de CMLVs foram submetidas a um tratamento de 50nM de T₃ ou T₄ ou de 1 μM de E₂ por 72 h. Logo após esse período, incubações com o substrato das ectonucleotidases permitiram medir a atividade dessas enzimas. Estas doses farmacológicas foram escolhidas a partir da literatura, de maneira que fossem suficientes para podermos verificar a existência ou não de um efeito hormonal. Nessas concentrações, os hormônios tireoideanos não alteraram a hidrólise de ATP e ADP (Fig 3.4 e 3.5).

Por outro lado, o estradiol causou um aumento de 50% na hidrólise do ATP (controle: 50,02 ± 13,87 nmol Pi liberado/min/mg), mas não na degradação de ADP. Já a atividade da ecto-5'NT (AMPásica) foi aumentada pelos três hormônios. Os hormônios T₃, T₄ e E₂ aumentaram a hidrólise do AMP em 75%, 75% e 36%, respectivamente, em relação aos seus controles (59,06 ± 39,36 nmolPi/min/mg) (Fig 3.6) .

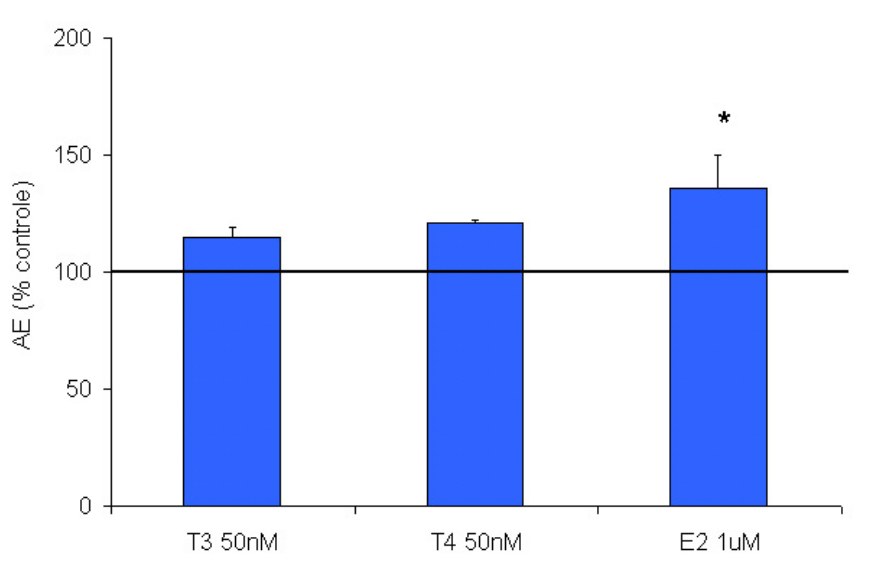


Figura 3.4 – Atividade ATPásica das CMLVs com o tratamentos dos hormônios T₃, T₄ e E₂ por 72 h. As células foram incubadas com 2 mM de ATP por 10 min. A atividade específica está representada como % da AE do controle 100% ± EP (50,02 ± 13,87 nmolPi/min/mg) ; n = 5; teste T, * vs controle com p<0,05.

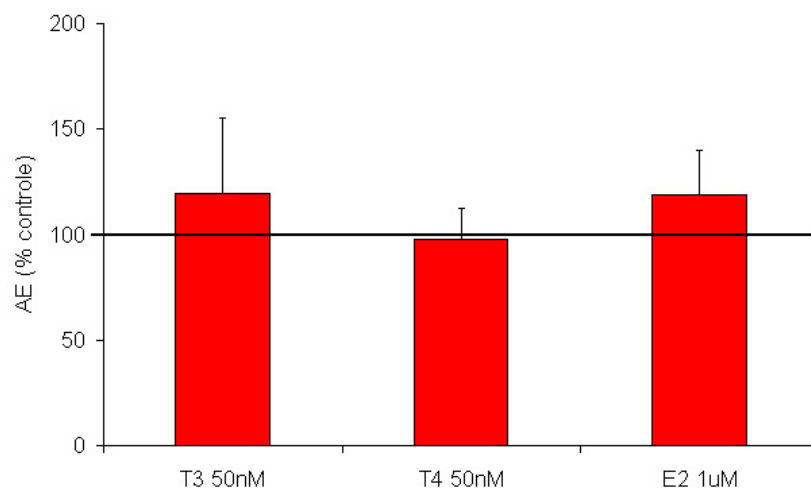


Figura 3.5 – Atividade ADPásica das CMLVs tratadas com os hormônios T₃, T₄ e E₂ por 72 h. As células foram incubadas com 2 mM de ADP por 10 min. A atividade específica está representada como % da AE do controle 100% ± EP (24,63 ± 2,77 nmolPi/min/mg); n = 4.

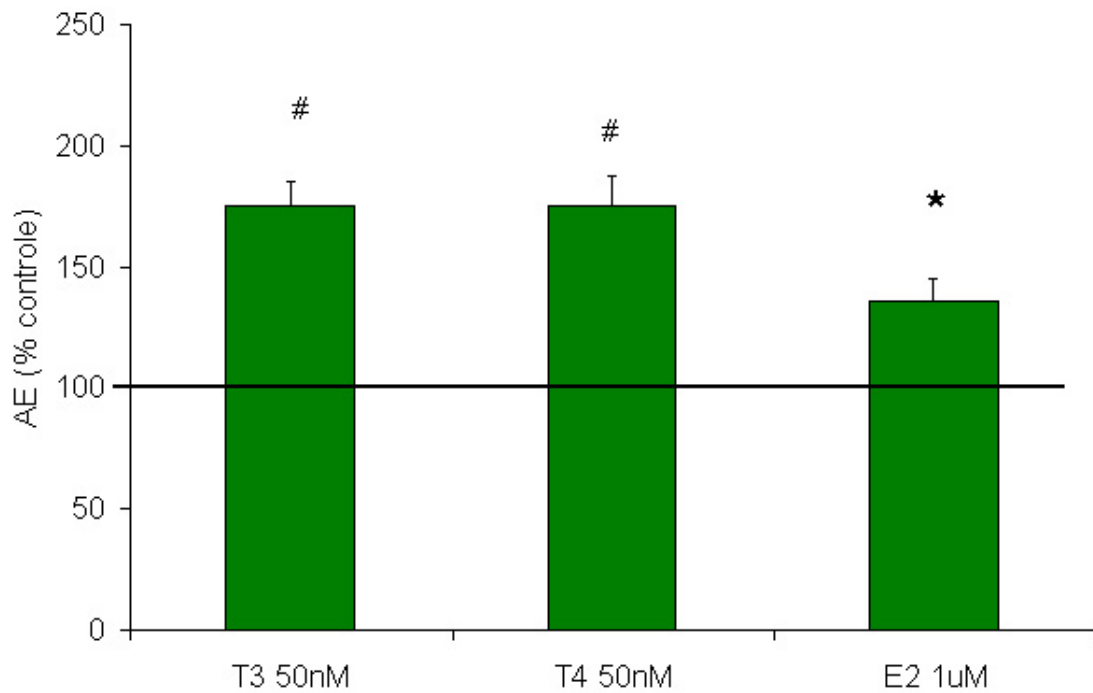


Figura 3.6 - Atividade AMPásica das CMLVs tratadas com os hormônios T₃, T₄ e E₂ por 72 h. As células foram incubadas com 2 mM de AMP por 10 min. A atividade específica está representada como % da AE do controle 100% ± EP (59,06 ± 39,36 nmolPi/min/mg); n = 6; teste T, * vs controle com p<0,05, # vs controle com p<0,01.

3.2.2 O efeito dos hormônios T_3 , T_4 e E_2 sobre as atividades ATPásica e AMPásica é dependente do tempo de tratamento

Para melhor investigar os efeitos causados pelos hormônios sobre a hidrólise de ATP e AMP, foram realizadas curvas de tempo de tratamento com os hormônios T_3 e T_4 (50 nM) e E_2 (1 μ M) por 24, 48 e 72 h. Após cada período, as culturas de CMLVs foram incubadas com ATP 2 mM (Fig. 3.7) e AMP 2 mM (Fig. 3.8) por 10 min e o fosfato inorgânico liberado medido conforme descrito em Material e Métodos. Confirmando os resultados anteriores, nenhum dos hormônios tireoideos alterou a hidrólise de ATP e somente o estradiol foi capaz de aumentar a degradação deste nucleotídeo. Pode-se observar que este efeito parece aumentar com o tempo de tratamento, tornando-se significativamente diferente do controle após o último dia de tratamento (72h).

Este mesmo efeito pôde ser observado na hidrólise de AMP, no qual o aumento na degradação de AMP acompanhou os dias de tratamento dos três hormônios estudados. Entre os hormônios tireoideanos, o T_3 mostrou-se mais eficaz que o T_4 em modular a atividade da ecto-5'-nucleotidase, uma vez que a diferença significativa apareceu após 24h de tratamento. O estradiol manteve o mesmo perfil de aumento encontrado na hidrólise de ATP.

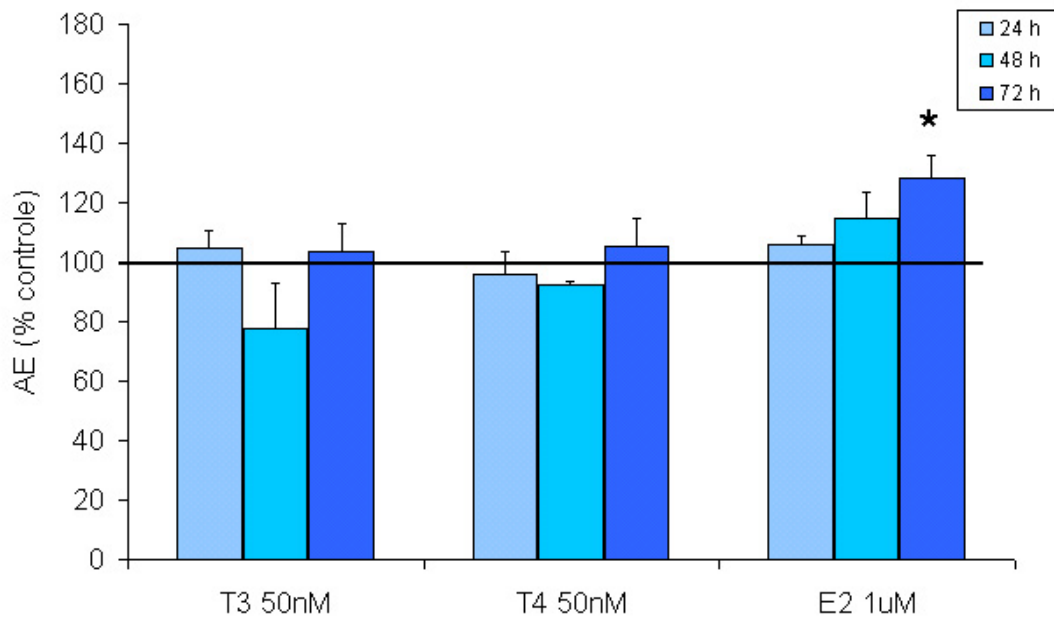


Figura 3.7 – Curva de dias de tratamento com os hormônios T₃, T₄ e E₂ na hidrólise de ATP. Após os tempos indicados, as culturas tratadas foram incubadas com 2 mM de ATP por 10 min como descrito em Material e Métodos. A atividade específica está representada como % da AE do controle 100% ± EP (24h = 111,28 ± 34,77; 48h = 111,09 ± 37,46; 72h = 115,92 ± 44,72 nmolPi/min/mg); n = 4; ANOVA, * vs controle com p < 0,05, ANOVA.

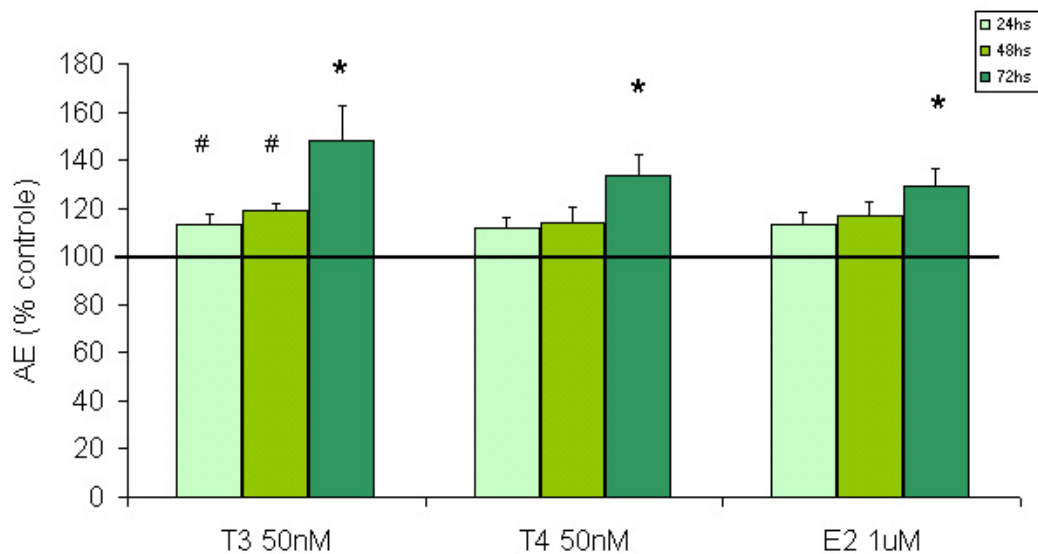


Figura 3.8 - Curva de dias de tratamento com os hormônios T₃, T₄ e E₂ na hidrólise de AMP. Após os tempos indicados, as culturas tratadas foram incubadas com 2 mM de AMP por 10 min como descrito em Material e Métodos. A atividade específica está representada como % da AE do controle 100% ± EP (24h = 152,62 ± 28,91; 48h = 150,20 ± 33,20; 72h = 130,01 ± 28,91 nmolPi/min/mg); n = 6; * vs controle com p<0,05; # vs controle com p<0,01, ANOVA.

3.2.3 *A ativação da ecto-5'-nucleotidase é dose dependente para o estradiol, mas não para os hormônios tireoideanos*

Diante do resultado anterior, tornou-se interessante também investigar se a atividade da ecto-5'-NT variava também com concentrações menores dos hormônios em questão. Para tanto, as culturas de CMLVs receberam 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 50 e 100 nM de T₃ ou T₄ por 72 h, já que neste período os efeitos na degradação de AMP são maiores. A Figura 3.9 mostra que os hormônios tireoideanos comportaram-se da mesma maneira: desde as concentrações mais baixas pode-se constatar um aumento da atividade AMPásica que atingiu seu efeito máximo na concentração de 1 nM. Nas concentrações de maiores de 10, 30, 50 e 100 nM, a atividade retorna a níveis de ativação das primeiras concentrações, evidenciando um possível efeito bifásico tanto do T₃ quanto do T₄ sobre a atividade da ecto-5'-nucleotidase.

Já o tratamento de culturas de CMLVs com E₂ nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 nM por 72 h (Fig. 3.10), apontou um tipo de ativação da hidrólise de AMP dependente da dose testada. Assim, concentrações maiores de hormônio levaram a hidrólises maiores de AMP.

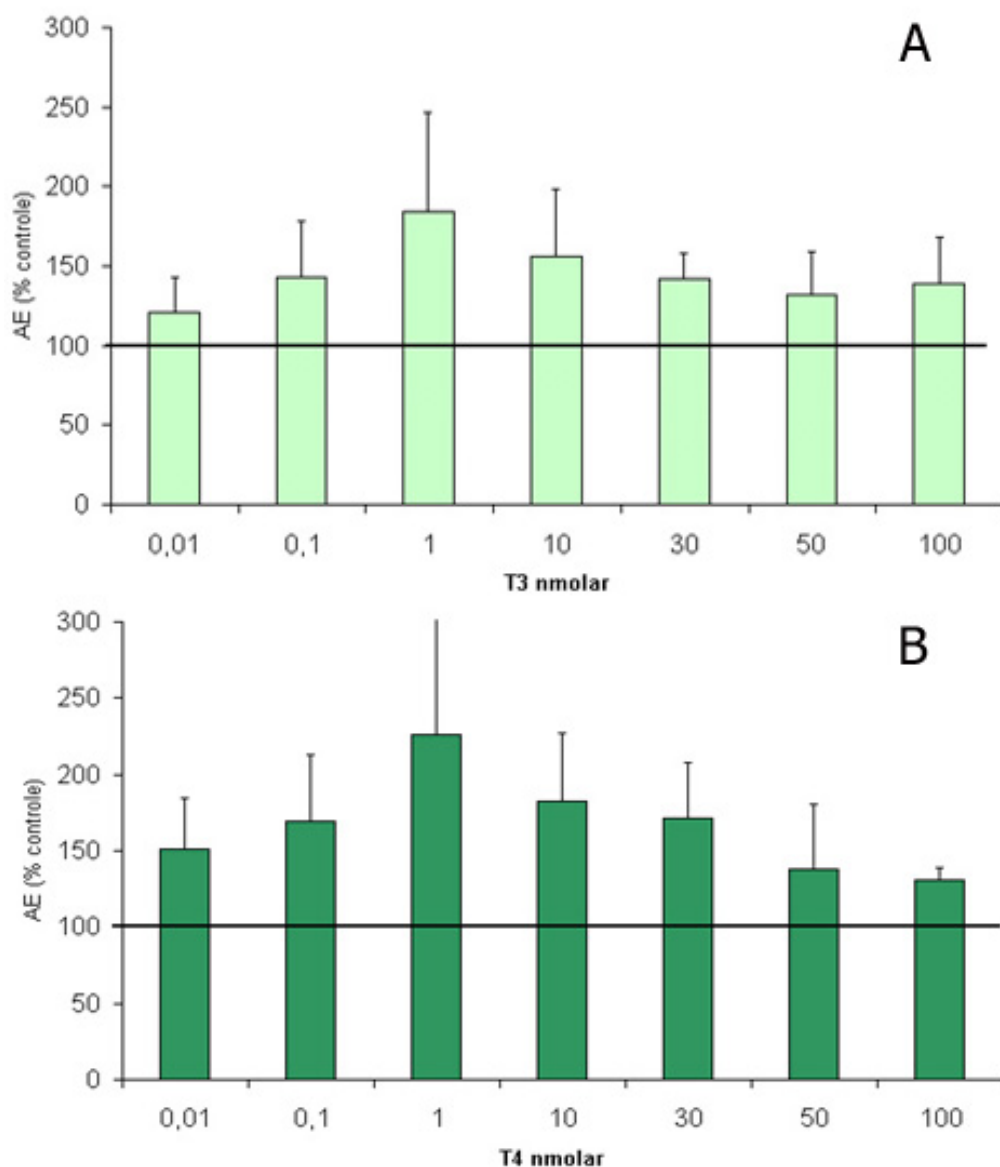


Figura 3.9 - Hidrólise de AMP pelas CMLVs sob diferentes concentrações de hormônio T₃ (A) ou T₄ (B). Culturas de CMLVs foram tratadas com diferentes concentrações de T₃ ou T₄, citadas no gráfico, por 72 h e incubadas com 2 mM de AMP por 10 min. A atividade específica está representada como % da AE do controle 100% ± EP (CT₃ = 304,06 ± 84,27; CT₄ = 186,11 ± 33,11 nmolPi/min/mg); n = 3.

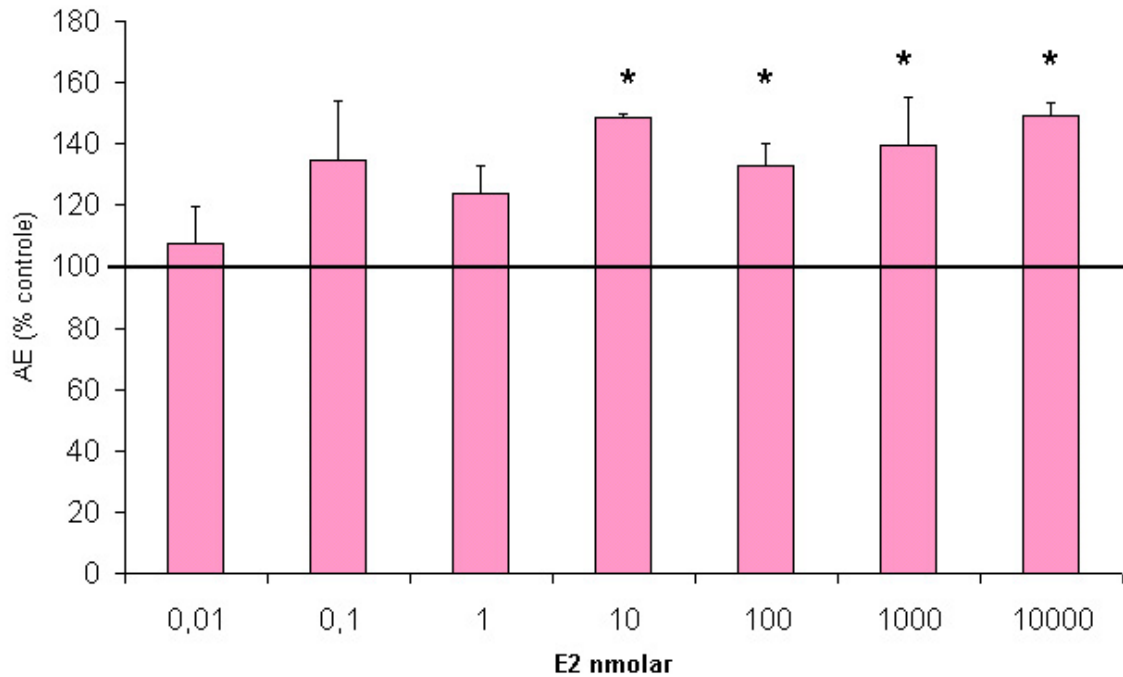


Figura 3.10 – Hidrólise de AMP pelas CMLVs sob diferentes concentrações de estradiol. Culturas de CMLVs foram tratadas com diferentes concentrações de E₂, citadas no gráfico, por 72 h e incubadas com 2 mM de AMP por 10 min. A atividade específica está representada como % da AE do controle 100% ± EP (318,35 ± 23,52 nmolPi/min/mg); ANOVA; n = 3, * vs controle p < 0,05.

3.2.4 Os tratamentos com T_3 e E_2 aumentam a expressão gênica da ecto-5'-nucleotidase

Para melhor elucidar o efeito dos hormônios estudados sobre as ectonucleotidases em CMLVs, o próximo passo deste estudo foi verificar se o T_3 , o T_4 e o estradiol estariam atuando via mecanismos clássicos para eles descritos, o que incluiria sua interação com receptores nucleares cuja função seria o estímulo da transcrição de genes alvos desses hormônios. Focando este objetivo, culturas de CMLVs foram novamente submetidas ao tratamento de 50 nM de T_3 ou 1 μ M de E_2 por 72 h e, ao final deste tempo, o RNA total foi extraído e o cDNA sintetizado. Utilizando-se os *primers* específicos para a ecto-5'-NT e para a β -actina, curvas de ciclos foram realizadas a fim de identificar os ciclos em que a enzima Taq Polimerase não estivesse saturada permitindo a comparação entre as células tratadas e as controle. Dessa maneira, foram escolhidos como não-saturados o ciclo 33 para o primer da ecto-5'-NT e o ciclo 25 para β -actina. O PCR, então foi realizado novamente com esses números de ciclos e os produtos dessas reações separados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio. Na Fig. 3.11(A), podemos observar que os tratamentos tanto com o T_3 quanto com o E_2 aumentaram a quantidade de RNAm da ecto-5'-NT sem alterar o controle interno da β -actina. Em (B) tem-se a razão do RNAm da ecto-5'-NT/ β -actina pela quantificação das intensidades das bandas obtidas, demonstrando um acréscimo de 4,5 e 9 vezes desta razão para o T_3 e o E_2 respectivamente.

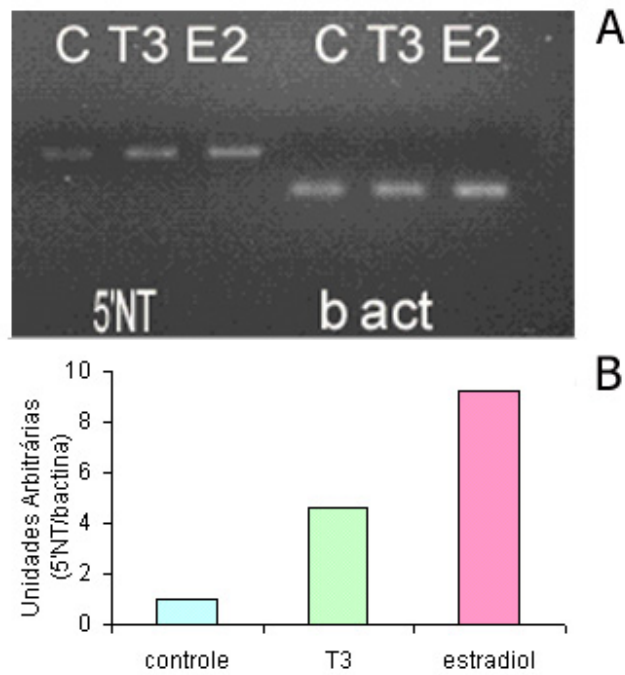


Figura 3.11 - Expressão da ecto-5'-nucleotidase (CD73) em CMLVs por RT-PCR. O RNA total de células controle e tratadas com 50 nM de T₃ ou 1 μM de E₂ por 72 h foi extraído e submetido ao PCR com primers específicos para a ecto-5'-NT e para a β-actina. (A) Foto dos produtos do PCR separados em gel de agarose 1%; (B) Densitometria das bandas do PCR na razão 5'NT/βactina em unidades arbitrárias. Experimento representativo de 2 com resultados semelhantes.

3.2.5 Tratamento com os hormônios T_3 , T_4 e E_2 alteraram a expressão das NTPDases.

Também as NTPDases parecem ser alteradas pelo tratamento com os hormônios aqui estudados. Confirmando os dados obtidos com a imunocitoquímica, a Figura 3.12 demonstra que as CMLVs de fato expressam todas as NTPDases investigadas pois pode-se verificar, por RT-PCR, a presença do RNAm dessas proteínas nos lisados deste tipo celular, evidenciando uma expressão maior das NTPDases 5 e 6. Além disso, resultados preliminares sobre o efeito dos hormônios sobre a expressão do RNAm das ectonucleotidases estudadas neste trabalho por RT-PCR com 35 ciclos, mostram que entre as NTPDases estudadas, a NTPDase 5 tem a expressão gênica regulada pelo tratamento com T_3 e estradiol. Entretanto são necessários mais experimentos a fim de que não haja conclusões precipitadas e se possa confirmar os resultados obtidos.

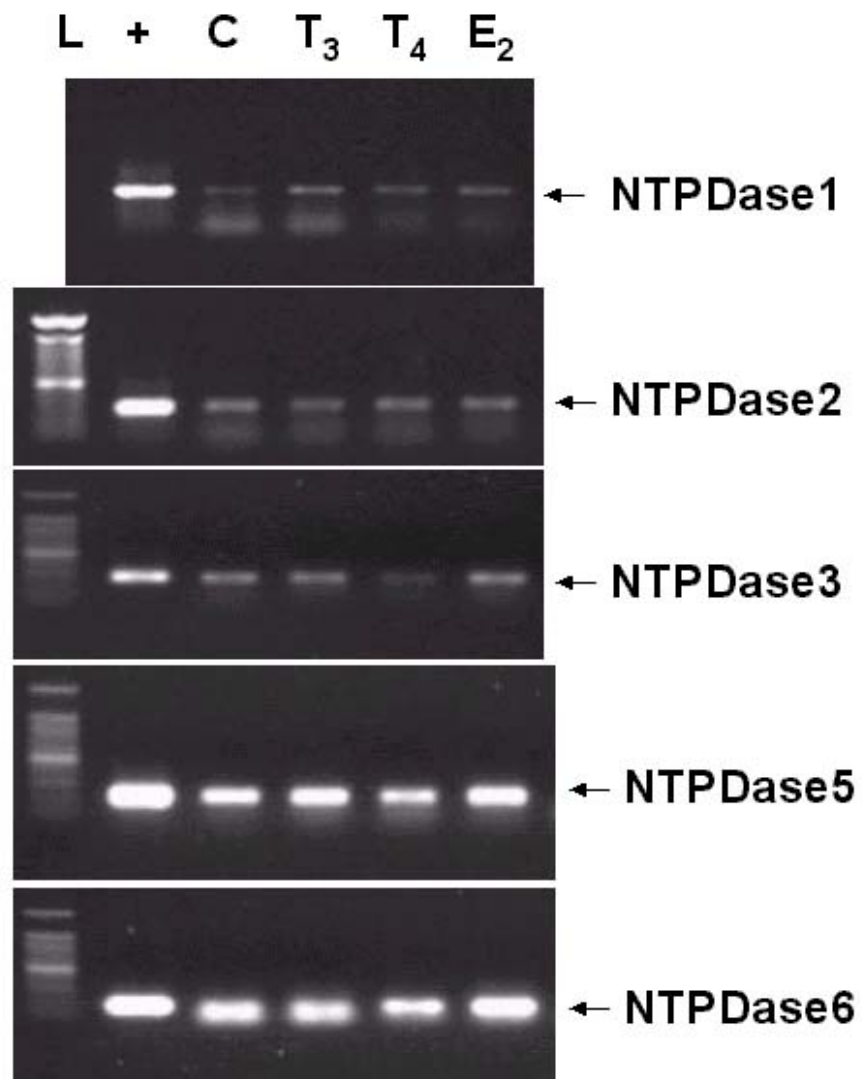


Figura 3.12 – Expressão das NTPDases de CMLVs sob tratamento de T₃, T₄ e E₂ por RT-PCR. O RNA total de células controle e tratadas com 50 nM de T₃ ou T₄ ou ainda 1 μM de E₂ por 72 h foi extraído e submetido ao PCR com primers específicos para as NTPDases 1, 2, 3, 5 e 6. Os produtos do PCR foram separados em gel de agarose 1%.

4 DISCUSSÃO

4.1 PRESENÇA DE ECTONUCLEOTIDASES NAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

As atividades ectonucleotidásicas na vasculatura foram sugeridas pela primeira vez por Binet e Burnstein, em 1950, ao constatarem que o ATP era degradado durante uma única passagem através de um vaso capilar. Desde então, estas atividades de hidrólise de nucleotídeos têm sido observadas em diversas preparações celulares isoladas como as células endoteliais e as células musculares lisas (Pearson et al. 1980). Entretanto, a identificação de quais enzimas eram responsáveis por esta atividade nas CMLVs não foi explorada tanto quanto nas células endoteliais. Confirmando dados anteriores de CMLVs de porcos (Gordon et al, 1989), as culturas de CMLVs extraídas da artéria aorta de ratos adultos apresentaram atividade de hidrólise para ATP, ADP e AMP.

Os experimentos de imunocitoquímica mostraram que a maioria das enzimas da família das NTPDases está presente nas CMLVs, sendo que todas elas (NTPDases 1, 2, 3, 5 e 6) podem estar envolvidas na hidrólise dos nucleotídeos observadas. A falta de inibidores específicos para cada enzima ainda não permite verificar a contribuição de cada uma nas hidrólises de ATP e ADP observadas, desta forma, experimentos com a tecnologia de RNA de interferência seriam ferramentas úteis nesta análise.

A atividade AMPásica observada nestes experimentos provavelmente deve-se à proteína ecto-5'-nucleotidase (CD73), uma conhecida enzima produtora de adenosina. A imunodeteção desta enzima neste trabalho foi impedida pela falta de anticorpos anti-CD73 para as técnicas de *Western Blot* e Imunocitoquímica.

Porém, a análise de RNAm da CD73 na segunda parte deste trabalho certifica a presença desta enzima. A adenosina gerada pela ação da ecto-5'-NT, além de atuar em seus receptores específicos P1, pode estar sendo captada. De fato, já foi demonstrado em CMLVs, sob condições controles, a existência de um gradiente de concentração transmembrana de adenosina direcionado de fora para dentro da célula, resultado de uma rápida refosforilação da adenosina intracelular (Mattig e Deussen, 2001).

Estas atividades de defosforilação do ATP em cascata, cujo produto final é a adenosina, parecem estar organizadas de modo que os nucleotídeos exerçam seus efeitos mais nas próprias CMLVs do que nas células vizinhas. O papel fisiológico destas enzimas, portanto, tem sido postulado em relação aos diversos sinais desencadeados pelo ATP, ADP e pela adenosina nas CMLVs.

4.1.1 Nucleot(s)ídeos da adenina na vasodilatação mediada por CMLVs

Na parede vascular, a fonte de ATP é bastante variada: pode ser liberado por células endoteliais, pelas próprias CMLVs (Di Virgilio e Solini, 2002), por trombócitos agregados e por terminais nervosos simpáticos, onde é co-liberado com a noradrenalina (Burnstock e Sneddon, 1985). Esta fonte variada de ATP associada aos diferentes tipos de receptores P2 nas células dos vasos sanguíneos acaba por conferir uma ação dupla vasodilatador/vasoconstritor ao ATP. Quando interage com os receptores P2Y das células endoteliais, o ATP estimula a liberação de fatores de relaxamento endotélio-derivados causando vasodilatação. Vários trabalhos têm descrito o envolvimento desses receptores utilizando o antagonista específico para P2Y (Reactive Blue 2) para inibir a

vasodilatação causada por análogos não-hidrolizáveis de ATP em anéis aórticos (Mendes et al 2003). Entretanto, nas CMLVs, ao interagir com receptores do tipo P2X, este ATP promove uma vasoconstrição. O principal receptor envolvido no mecanismo de vasoconstrição do ATP nas CMLVs, parece ser o P2X₁, cujo agonista α,β -Me ATP potencializa esse efeito (Erlinge et al, 1998) via influxo de Ca²⁺. Outros trabalhos têm demonstrado um efeito direto de relaxamento do ATP endotélio-independente em células musculares sugerindo a interação com receptores P2Y das próprias células musculares (Rongen et al, 1997). Portanto, se a camada endotelial se mantiver intacta, o ATP luminal acarretará uma vasodilatação e não chegará a alcançar as células musculares lisas. Já o ATP co-liberado como neurotransmissor irá potencializar a resposta vasoconstritora da noradrenalina (Burnstock e Sneddon, 1985). Também o ATP proveniente das células endoteliais pode causar vasoconstrição via receptor P2X₁ nas células musculares, já que este receptor é o mais expresso nas CMLVs em comparação com os demais receptores P2X e P2Y (Wang et al, 2003). Por isso, mesmo que os receptores P2Y, cuja ativação provoca vasorelaxamento, estejam presentes nas CMLVs, como o receptor P2X₁, mediador da vasoconstrição, é mais expresso então a resposta primeira é uma vasoconstrição. Nestas situações, as ectonucleotidases têm a importante função de acabar com este sinal no espaço intersticial, após o ATP ter exercido seu efeito evitando uma contração permanente das CMLVs, e liberando adenosina.

A adenosina, além de liberada por cardiomiócitos, células musculares lisas e células endoteliais, pode ser também gerada extracelularmente pela degradação

do ATP via ectonucleotidases presente nestes tipos celulares. Ao interagir com os receptores A2 das CMLVs, a adenosina, que chegou a ser proposta como um hormônio local (Pearson et al, 1980), provoca uma forte vasodilatação. Seu efeito relaxador também pode ser mediado por mecanismos endoteliais e por isso o local de formação de adenosina, intersticial ou luminal, é que determina se a vasodilatação é direta ou indireta. Em resposta ao insulto isquêmico os níveis desta molécula encontram-se elevados no sangue e no tecido do miocárdio (Mubagwa et al, 1996), mostrando que ambas as vias contribuem para papel cardioprotetor atribuída à adenosina. Além disso, a adenosina inibe a liberação de noradrenalina por modulação pré-sináptica dos terminais nervosos simpáticos (Burnstock e Sneddon, 1985) como mecanismo regulatório negativo, inibindo conseqüentemente a contração muscular.

4.1.2 Nucleot(s)ídeos da adenina na proliferação de CMLVs

O ATP extracelular é um conhecido fator mitogênico para as CMLVs com a habilidade de estimular diversos eventos da proliferação celular: síntese de DNA e conseqüentemente a progressão do ciclo celular, síntese de proteína, ativação de genes de resposta imediata, entre outros (Erlinge, 1998). Em combinação com outros fatores de crescimento conhecidos, o ATP age sinergisticamente, potencializando de 2 a 4 vezes o efeito de fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento insulina-relacionada 1(IGF-1). Também o ADP é capaz de levar à proliferação celular. Embora a adenosina tenha sido citada no trabalho de Erlinge, 1998 como um fator mitogênico fraco, Dubey e

colaboradores em 1996 e 1998 estabeleceram a adenosina como inibidor do crescimento celular via ativação de receptores A2B.

Os receptores candidatos a serem mediadores desta ação proliferativa dos nucleotídeos da adenina estão na classe P2Y. Estudos de RT-PCR em células musculares vasculares demonstraram a presença dos subtipos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ P2Y₁₁, sendo o P2Y₂ expresso em maior quantidade que os demais (Wang L. et al, 2002). Evidências do envolvimento deste receptor na proliferação das CMLVs mediada por ATP vieram do mesmo grupo que demonstrou que este receptor quando regulado positivamente por citocinas aumentou as respostas mitogênicas do ATP e UTP (Hou et al, 2000).

A função dos nucleotídeos purinérgicos, principalmente o ATP, nas células musculares lisas depende das suas quantidades no meio extracelular e, portanto, das atividades ectonucleotidásicas e dos receptores purinérgicos presentes neste tipo celular. Interessantemente, a expressão dos receptores P2 varia de acordo com os fenótipos contrátil e sintético das células musculares lisas. O fenótipo contrátil, encontrado nos organismos adultos, caracteriza-se por uma célula diferenciada que expressa proteínas do citoesqueleto específicas que as tornam capazes de contrair. As ectonucleotidases nesse fenótipo, como discutido anteriormente, teriam entre as suas funções principais terminar com a sinalização para a contração exercida pelo ATP extracelular. Em algumas circunstâncias, a CMLV pode reverter para o fenótipo sintético na qual torna-se proliferativa e secretória similar ao estado encontrado no feto durante a vasculogênese. Esta mudança de fenótipo é um dos pré-requisitos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, entre elas as placas ateroscleróticas, restenose e possivelmente

hipertensão (Burnstock, 2002). Com a transição de contrátil para sintético, a célula muscular lisa diminui a quase nada a expressão de P2X₁ (receptor mediador da vasoconstrição) e aumenta a expressão dos receptores P2Y₁ e P2Y₂, efetores da proliferação celular (Erlinge et al, 1998). Esta modificação de expressão de receptores P2 pode ser verificada também quando se aplica um *shear stress* de maior intensidade (Wang et al, 2003). Neste estudo, o receptor contrátil P2X₁ é regulado negativamente e os P2Y₂ e P2Y₆, positivamente. Com estes exemplos, verifica-se claramente como uma mudança de expressão dos receptores purinérgicos das CMLVs confere a uma mesma molécula sinalizadora, ATP, diferentes efeitos. Assim, as mesmas ectonucleotidases teriam no fenótipo proliferativo o papel fisiológico de controle da proliferação celular das CMLVs através dos níveis de nucleotídeos extracelulares. Esta transição também ocorre com as CMLVs durante o cultivo celular. Estudos na literatura mostram que a partir da 5ª passagem, elas já adquirem um fenótipo sintético (Erlinge et al, 1998). Os experimentos realizados neste estudo foram feitos com CMLVs até a 4ª passagem, provavelmente durante a transição entre um fenótipo e outro e talvez esta seja a causa de grande variação encontrada nas atividades ectonucleotidásicas entre os experimentos. Estudos estão em andamento para investigar a expressão e atividade das ectonucleotidases nos diferentes fenótipos.

4.2 HORMÔNIOS TIREOIDEOS E ESTRADIOL E ECTONUCLEOTIDASES

4.2.1 Efeito dos hormônios T₃, T₄ e E₂ sobre as atividades das NTPDases

Os hormônios tireoideanos T₃ e T₄ nas concentrações de 50 nM não alteraram as hidrólises de ATP e ADP nas CMLVs, embora possa ser observado

um pequeno aumento não significativo na defosforilação do ATP (Fig. 3.4). Esta hipótese pode ser reforçada pelos resultados preliminares apresentados na Fig 3.12, na qual observa-se uma banda de intensidade um pouco mais forte que a do controle na linha da NTPDase 5, relacionada às CMLVs tratadas com T₃. Entretanto, estudos mais detalhados são necessários para investigar melhor a ação tiroideana sobre as NTPDases.

Já o hormônio estradiol alterou a hidrólise do ATP extracelular, sem exercer mudanças nos níveis de fosfato liberado a partir do ADP oferecido. Este comportamento sugere um desequilíbrio na cascata enzimática ATP-ADP-AMP-adenosina nas células tratadas com 1 μM de estradiol, que possibilita que o ADP acumule ou que pelo menos, permaneça por mais tempo no meio extracelular. A NTPDase envolvida nesta regulação ainda é uma incógnita. Teoricamente, todas as NTPDases expressas nas CMLVs podem estar sujeitas à regulação tanto genômica como não-genômica (Knowles e Chiang, 2003). A Figura 3.12 parece apontar para um aumento de expressão das NTPDases 5 e talvez da NTPDase 6. O que não satisfaz os resultados das hidrólises de ATP (aumentada) e ADP (não alterada), porque as NTPDases 5 e 6 ocorrem no meio intracelular ou na forma solúvel secretada para o meio extracelular e têm preferência por nucleotídeos difosfatados. Como as culturas de células eram lavadas 3 vezes antes da incubação para retirar o fosfato do meio de cultura, as enzimas solúveis provavelmente teriam sido descartadas e o tempo de 10 minutos de incubação seria limitante para a liberação de proteína suficiente para a detecção da atividade enzimática. Mesmo que isso fosse possível, seria observado uma modificação na

hidrólise de ADP, o que não aconteceu nas CMLVs sob tratamento com estradiol. Também um possível aumento na NTPDase 1 não explicaria o aumento somente na atividade ATPásica, uma vez que esta proteína, mesmo que ancorada à membrana, hidrolisa ATP e ADP com as mesmas velocidades, sem preferências de substrato. Na verdade, este aumento único da quebra de ATP aponta para uma possível modulação de outras enzimas da família: as NTPDases 2, 3 e 8. Estas enzimas além de estarem presas à membrana plasmática posicionando seus sítios catalíticos para o meio extracelular, apresentam preferência por substratos trifosfatados numa razão de velocidade de hidrólise ATP:ADP de 30:1, 3:1 e 2:1, respectivamente. Por conseguinte, uma regulação positiva dessas enzimas estaria mais de acordo com os resultados obtidos com a liberação de fosfato inorgânico. Estudos focados mais nas NTPDases 2, 3 e 8 já estão sendo desenhados para esclarecer essa dúvida. Também uma regulação direta do estradiol na proteína (não-genômica) não deve ser descartada, embora menos provável já que o hormônio não foi adicionado durante o ensaio enzimático. Outros possíveis alvos de investigação, não abordados neste trabalho, seriam as enzimas da família das fosfodiesterases, capazes de hidrolisar ATP em outras condições de ensaio. Desta forma, qual enzima sofre a regulação exercida pelo estradiol permanece como uma questão a ser melhor avaliada.

A maior concentração de ADP, gerado pelo aumento na atividade ATPásica, pode atuar como um sinal de agregação plaquetária, principalmente em casos de lesões endoteliais onde as CMLVs poderão estar em contato com a luz dos vasos sanguíneos. Ou ainda, ativar os receptores P2Y₁, cujo agonista preferencial é o ADP (Tabela 1.1), podendo proporcionar efeitos proliferativos dos

nucleotídeos de adenina nas CMLVs. Mesmo quando o ATP é co-liberado com a noradrenalina dos terminais nervosos simpáticos, a demora da produção da adenosina poderia acarretar um atraso no *feedback* negativo realizado por esta molécula. Deste modo, este resultado poderia constituir a contribuição negativa do sistema purinérgico para a pré-disposição das mulheres que tomam hormônios esteroidais ao desenvolvimento de problemas circulatórios e de trombozes nos controversos resultados da terapia de reposição hormonal.

4.2.2 Hormônios T_3 , T_4 e E_2 regulam positivamente a ecto-5'-nucleotidase

Neste estudo, a enzima ecto-5'-nucleotidase se mostrou a mais responsiva aos tratamentos realizados com os hormônios T_3 e T_4 50 nM e E_2 1 μ M. Nessas concentrações as atividades enzimáticas da ecto-5'-NT aumentaram 75%, 101% e 105%, respectivamente. Estes aumentos foram tempo-dependente para os três hormônios estudados, contudo mostrou-se dose-dependente somente no caso do tratamento com estradiol. Já as concentrações crescentes de T_3 e T_4 resultaram numa curva em forma de sino, onde uma concentração intermediária de 1 nM provocou um aumento máximo que diminui nas concentrações maiores. Estas respostas diferenciadas a concentrações crescentes de hormônios tireoideanos e estradiol aplicadas apontam para vias de sinalização diferentes entre si, mas que causam o mesmo efeito de aumentar a atividade da ecto-5'-nucleotidase.

O aumento da atividade enzimática acompanhada pela elevação dos níveis de RNAm da ecto-5'-NT permite propor que o T_3 e o E_2 estejam interagindo em seus respectivos receptores tireoideanos (TRs) e receptores de estradiol (ERs),

pertencentes a mesma superfamília de receptores esteróides, ativando a transcrição do gene correspondente a esta proteína.

Resultados semelhantes foram descritos pelo nosso grupo mostrando que o T_3 era capaz de regular positivamente a ecto-5'-NT em nível transcricional em células de glioma C6 de rato (Wink et al, 2003), o que suporta a idéia de que a ecto-5'-NT está sob regulação dos hormônios tireoideanos genomicamente. De fato, estudos no promotor da ecto-5'-NT revelaram diversos sítios de ligação ao SP1, fator de transcrição que pode ser recrutado pelo complexo hormônio-receptor. Este fator SP1 interage com os TAFs (TBP-associated factors) que recruta outras proteínas estabilizadoras da maquinaria de transcrição estimulando a transcrição (Hansen et al., 1995; Kim et al., 1999; Spsychala et al., 1999). A presença da enzima desidase do tipo II nas CMLVs (Mizuma et al, 2001) e a identificação de RNAm das quatro isoformas dos receptores dos hormônios tireoideanos (Ojamaa et al, 1996) demonstram que estas são células-alvo da ação do T_3 e que dispõem de mecanismos clássicos da ativação de transcrição nuclear. Assim, acredita-se que os resultados verificados com o hormônio T_4 são reflexos da ação do T_3 , molécula ativa que se liga com muito mais afinidade aos receptores tireoideanos.

Como resultado desta regulação positiva ocasionada pelos hormônios tireoideanos encontra-se a maior disponibilidade de níveis de adenosina. Essa condição poderia ter diversas conseqüências. Primeiramente estaria atuando como feedback negativo para mais liberação de ATP dos terminais nervosos simpáticos evitando sinais de contração muscular. Atuando sobre os receptores A2 das CMLVs desencadearia cascatas de sinalização da vasodilatação. Por fim,

interagindo também com seus receptores específicos, causaria uma inibição da proliferação celular. Em conjunto, esses efeitos poderiam explicar, pelo menos em parte, a proteção cardiovascular encontrada em pacientes hipertireoideos, os quais apresentam aumentada taxa cardíaca e *output* cardíaco e diminuída resistência vascular sistêmica devido ao relaxamento das CMLVs (Klein e Ojamaa, 2001). Não-genomicamente, a exposição de CMLVs ao T₃ tem provocado um relaxamento rápido destas células cultivadas em matrizes deformáveis. Este efeito foi seletivo para o T₃ e não foi mediado por AMPc ou óxido nítrico (Ojamaa et al, 1996).

Há muito tempo, os estrógenos têm sido descritos como fatores benéficos do sistema cardiovascular. Esta proteção cardiovascular é derivada da constatação de uma certa proteção das mulheres no período pré-menopausa a problemas cardíacos em comparação com mulheres pós-menopausa ou homens da mesma idade. Terapias de reposição hormonal logo se tornaram como uma solução para mulheres na menopausa. Entretanto, nos últimos anos, estudos com estas pacientes evidenciaram riscos maiores de câncer de mama invasivo (WHI, 2002), choque cerebrovascular (Viscoli et al, 2001), doença de Alzheimer (Mulnard et al, 2000) e doenças cardiovasculares (Hulley et al, 1998).

Dentre as células da parede vascular, as CMLVs são alvo também do estradiol possuindo os dois receptores de estrogênio descritos sendo ambos ER α e ER β mediadores desses efeitos (Rubanyi et al, 2002). Estudos *in vivo*, em humanos e animais experimentais, mostram que estrógenos promovem vasodilatação. Já *in vitro*, o 17- β estradiol inibe a proliferação celular de CMLVs e

melhora as lesões que ocorrem na aterosclerose (Tostes et al, 2003). Tanto mecanismos genômicos quanto não genômicos têm sido descritos para os efeitos dos estrogênios.

Neste estudo o 17β -estradiol parece estar modulando a ecto-5'-NT genomicamente. Como no promotor da ecto-5'-NT não foi descoberto um elemento responsivo aos esteróides, a interação com outros fatores de transcrição deve acontecer, porém a identificação de qual molécula estaria envolvida aqui ainda permanece obscura.

Por fim, a participação da ecto-5'-nucleotidase *per se* como fator proliferativo e seu envolvimento em processos de interação célula-célula e célula-matrix (Zimmermann, 1992) vem complementar a resposta proliferativa da adenosina quando a ecto-5'NT é aumentada sob ação dos três hormônios estudados.

Assim, neste trabalho foi demonstrado que culturas de CMLVs de artéria aorta de ratos expressam as ecto-nucleotidases NTPDases 1, 2, 3, 5 e 6 e a ecto-5'-nucleotidase responsáveis pelo controle dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. O tratamento com os hormônios T_3 , T_4 e E_2 nestas células mostrou que a ecto-5'-NT está sob regulação positiva desses hormônios apontando para vias de ação genômicas. Por outro lado, somente a atividade ATPásica parece ser regulada por estradiol, sendo que o mecanismo de ação e a enzima envolvida necessita de investigações mais detalhadas. Tendo em vista as diferentes respostas desencadeadas pelos nucleotídeos de adenina extracelulares, a expressão dos receptores com os quais interagem e a

modulação enzimática observada, os resultados aqui apresentados podem contribuir para as explicações da ação dos hormônios T₃, T₄ e E₂, especialmente nas terapias de reposição hormonal ou no uso farmacológico do T₃ em cirurgias cardíacas.

5 CONCLUSÕES

- a. CMLVs, extraídas da artéria aorta de ratos adultos, em cultura são capazes de hidrolisar os nucleotídeos purínicos ATP, ADP e AMP, liberando fosfato inorgânico.
- b. As prováveis enzimas responsáveis por esta hidrólise pertencem à família das NTPDases, sendo que foram identificados os membros 1, 2, 3, 5 e 6. Já a hidrólise de AMP deve-se à presença da ecto-5'-nucleotidase.
- c. CMLVs tratadas com os hormônios T_3 e T_4 na concentração de 50 nM por 72 h não alteraram a hidrólise de ATP e ADP medido pela liberação de fosfato inorgânico. O tratamento com E_2 1 μ M, no mesmo período, conferiu um aumento na hidrólise de ATP, mas não na de ADP.
- d. O mesmo tratamento, acima citado, permitiu a observação de uma hidrólise de AMP aumentada, significativamente, em relação ao controle.
- e. A elevação das atividades enzimáticas nestas situações foi dependente do tempo de tratamento realizado.
- f. O efeito dos hormônios tireoideos sobre a hidrólise de AMP mostrou-se independente da dose, mas apresentou um comportamento bifásico. Já no caso do estradiol, o aumento da atividade hidrolítica acompanhou o aumento das concentrações de hormônio estudadas.
- g. Os tratamentos com T_3 e E_2 aumentaram os níveis de RNAm da ecto-5'-nucleotidase, o que permite a conclusão de que os aumentos encontrados na hidrólise de AMP sob o tratamento com estes hormônios são conseqüências da ativação da transcrição do gene da ecto-5'-nucleotidase.

6 PERSPECTIVAS

- a. Verificar se o tratamento com o estradiol é capaz de aumentar quantidades de RNAm dos membros da família das NTPDases.
- b. Estudar o perfil de hidrólise de ATP nas culturas de CMLVs sob os tratamentos realizados neste estudo para identificar os metabólitos gerados desta degradação através da técnica de HPLC.
- c. Averiguar se a expressão dos receptores P1 e P2 é modificada sob o tratamento de hormônios tireoideos e estradiol, a fim de melhor entender a sinalização iniciada pelos nucleotídeos e nucleosídeos do sistema purinérgico.
- d. Investigar se as ecto-nucleotidases estariam envolvidas na mudança de fenótipo destas células, podendo assim contribuir para o desenvolvimento de doenças cardíacas dependentes desta conversão.

7 BIBLIOGRAFIA

- AIRAS, L., NIEMELA, J., SALMI, M., PUURUNEN, T., SMITH, D.J., JALKANEN, S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J. Cell Biol.* 136, 421-431, 1997.
- AYERS, S., TANG, M., SUBBIAH, M.T.R. Estradiol-17 β as an antioxidant: distinct features when compared to other fat soluble antioxidants. *J. Laborat. Clin. Med.* 128, 367-375, 1996.
- BABIYCHUK, E.B., DRAEGER, A., annexins in cell membrane dynamics: Ca²⁺-regulated association of lipid microdomains. *J. Cell Biol.* 150, 1113-1123, 2000.
- BIGONNESSE, F., LEVESQUE, S.A., KUKULSKI, F., LECKA, J., ROBSON, S.C., FERNANDES, M.J.G., SEVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43, 5511-5519, 2004.
- BOARDER, M.R. WEISMAN, G.A., TURNER, J.T., WILKINSON, G.F. G protein-coupled P2 purinoceptors: from molecular biology to functional responses. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 133-139, 1995.
- BOBALOVA, J., MUTAFOVA-YAMBOLIEVA, V.N. Membrane-bound and releasable nucleotidase activities: differences in canine mesenteric artery and vein. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30, 194-202, 2003.
- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 248-254, 1976.
- BRAUN, N., FENGLER, S., EBELING, C., SERVOS, J. ZIMMERMANN, H. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem. J.* 351, 639-647, 2000.
- BUELL, G., COLLO, G., RASSENDREN, F. P2X receptors: an emerging channel family. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2221-2228, 1996.

- BURNSTOCK, G., SNEDDON, J.D. Evidence for ATP and noradrenaline as cotransmitters in sympathetic nerves. *Clin Sci.* 68, 89-92, 1985.
- CARIO-TOUMANIANTZ, C., LOIRAND, G., FERRIER, L., PACAUD, P. Non-genomic inhibition of human P2X7 purinoceptor by 17 β -oestradiol. *J. Physiol.* 508, 659-666, 1998.
- CARL, S.A.L., SMITH, T.M., KIRLEY, T.L. Cross-linking induces homodimer formation and inhibits enzymatic activity of chicken stomach ecto-ATPase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44, 463-470, 1998.
- CHADWICK, B.P., FRISCHAUF, A.M. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. *Mamm. Genome* 8, 668-672, 1997.
- CHAN K. M., DELFERT D., JUNGER K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ - stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380, 1986.
- COLLINS, P., SHY, J., JIANG, C., MOSS, J. Nitric oxide accounts for dose dependent estrogen mediated coronary relations after acute estrogen withdrawal. *Circulation* 90, 1964-1968, 1994.
- DAVIS P.J., DAVIS, F.B. Non-genomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 6, 497-504, 1996.
- DECENSI, A., OMODEI, U., ROBERTSON, C., BONANNI, B., GUERRIERI-GONZAGA, A., RAMAZZOTTO, F., JOHANSSON, H., MORA, S., SANDRI, M., CAZZANIGA, M., FRANCHI, M., PECORELLI, S. Effect of transdermal estradiol and oral conjugated estrogen on c-reactive protein in retinoid-placebo trial in healthy women. *Circulation* 106, 1224-1228, 2002.
- DI VIRGILIO, F. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol. Today* 16, 524-528, 1995.
- DI VIRGILIO, F., SOLINI, A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol.* 135, 831-842, 2002.
- DUBEY, R.K., GILLESPIE, D.G., JACKSON, E.K. Adenosine inhibits growth of human aortic smooth muscle cells via A2B receptors. *Hypertension* 31, 516-521, 1998.

- DUBEY, R.K., GILLESPIE, D.G., MI, Z., JACKSON, E.K. Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts: role of A2B receptors. *Circulation* 96, 2656-2666, 1997.
- DZHANDZHUGAZYAN, K., BOCK, E. Demonstration of (Ca²⁺)-Mg²⁺)-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett.* 336, 279-283, 1993.
- DZHANDZHUGAZYAN, K., BOCK, E. Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding. *Biochemistry* 36, 15381-15395, 1997.
- ERLINGE, D. Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen. Pharmacol.* 31, 1-8, 1998.
- ERLINGE, D., HOU, M., WEBB, T.E., BARNARD, E.A., MOLLER, S. Phenotype changes of the vascular smooth muscle cell regulate P2 receptor expression as measured by quantitative RT-PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 864-870, 1998.
- ERLINGE, D., YOO, H., EDVINSSON, L., REIS, D.J., WAHLESTEDT, C. Mitogenic effects of extracellular ATP on vascular smooth muscle cells vs. Other growth factors and sympathetic cotransmitters. *Am. J. Physiol.* 265, H1089-H1097, 1993.
- FARHAT, M.Y., LAVIGNE, M.C., RAMWELL, P.W. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.* 10, 615-624, 1996.
- FARISH, E., SPOWART, K., BARNES, J.F., FLETCHER, C.D., HART, P.M., DEGEN, M.M. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipoproteins including Lp(a) and LDL subfractions. *Atheroscl.* 126, 77-84, 1996.
- GORDON, E.L., PEARSON, J.D., DICKINSON, E.S., MOREAU, D., SLAKEY, L.L. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 264, 18986-18992, 1989.
- GORSKI, D.H., WALSH, K. Mitogen-responsive nuclear factors that mediate growth control signals in vascular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 30, 585-592, 1995.

- HANSEN, K.R., RESTA, R., WEBB, C.F., THOMPSON, L.F. Isolation and characterization of the promoter of the human 5'-nucleotidase (CD73)-encoding gene. *Gene* 167, 307-312, 1995.
- HE, S., BREMME, K., SILVEIRA, A., VAN ROOIJEN, M., BLOMBACK, M. Hypertcoagulation in surgical postmenopausal women having hormone replacement with overdose estradiol. *Blood Coagul. Fibrinol.* 12, 677-681, 2001.
- HEINE, P., BRAUN, N., HEILBRONN, A., ZIMMERMANN, H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATPdiphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur. J. Biochem.* 262, 102-107, 1999.
- HERRINGTON, D.M., REBOUSSIN, D.M., BROSNIHAN, K.B., SHARP, P.C., SHUMAKER, S.A., SNYDER, T.E., FURBERG, C.D., KOWALCHUK, G.J., STUCKEY, T.D., ROGERS, W.J., GIVENS, D.H., WATERS, D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343, 522-529, 2000.
- HICKS-BERGER, C.A., CHADWICK, B.P., FRISCHAUF, A.M., KIRLEY, T.L. Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). *J. Biol. Chem.* 275, 34041-34045, 2000.
- HOU, M., MOLLER, S., EDVINSSON, L, ERLINGE, D. Cytokines induce upregulation of vascular P2Y2 receptors and increased mitogenic responses to UTP and ATP. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2064-2069, 2000.
- HULLEY, S., GRADY, D., BUSH, T., FURBERG, C, HERRINGTON, D., RIGGS, B., VITTINGHOFF, E. Randomized trials of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and estrogen/progestin replacement study (HERS) Research Group. *JAMA* 280, 605-613, 1998.
- IDELSON, G.H. Molecular diversity of P2 receptors. *Modulator* 14, 11-13, 2001.
- KACZMARECK, 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.
- KAWASHIMA, Y., NAGASAWA, T., NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96, 2157-2162, 2000.
- KIECHL, S., EGGER, G., MAYR, M., WIEDERMANN, C.J., BONORA, E., OBERHOLLENZER, F., MUGGEO, M., XU, Q., WICK, G., POEWE, W., WILLET, J. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation* 103, 1064-1070, 2001.
- KIM, M., JIANG, L.H., WILSON, H.L., NORTH, R.A., SURPRENANT, A. Proteomic and functional evidence for P2X₇ receptor signalling complex. *EMBO J.* 20, 6347-6358, 2001.
- KIM, M.K., LEE, J.S., CHUNG, J.H. *In vivo* transcription factor recruitment during thyroid hormone receptor-mediated activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10092-1009, 1999.
- KLEIN, I., OJAMAA, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 344, 501-509, 2001.
- KLEMPERER, J., KLEIN, I., GOMEZ, M., HELM, R.E., OJAMAA, K., THOMAS, S.J., ISOM, O.W., KRIEGER, K. Effects of thyroid hormone supplementation in cardiac surgery. *N. Engl. J. Med.* 333, 1522-1527, 1995.
- KNOFEL, T., STRATER, N. X-ray structure of the Escherichia coli periplasmic 5'-nucleotidase containing a dimetal catalytic site. *Nat. Struct. Biol.* 6, 448-453, 1999.
- KNOWLES, A.F., CHIANG, W.C. Enzymatic and transcriptional regulation of human ecto-ATPase/E-NTPDase 2. *Arch. Biochem. Biophys.* 418, 217-227, 2003.
- KOMOSZYNSKI, M., WOJTCZAK, A. Apyrases (ATP-diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1310, 233-241, 1996.

- LEVEY, G.S., KLEIN, I. Catecholamine-thyroid hormone interactions and cardiovascular manifestations of hyperthyroidism. *Am. J. Med.* 88, 626-631, 1990.
- LI, J.M., FENTON, R.A., CUTLER, B.S., DOBSON, J.G.Jr. Adenosine enhances nitric oxide production by vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 269, C519-523, 1995.
- MARSHALL, J.M. Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia. *Acta Physiol. Scand.* 168, 561-573, 2000.
- MARTIN-ROMERO, F.J., GARCIA-MARTIN, E., GUTIERREZ-MERINO, C. Inactivation of ecto-ATPase activity of rat brain synaptosomes. *Biochim Biophys. Acta* 1283, 51-59, 1996.
- MATEO, J., HARDEN, T.K., BOYER, J.L. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* 128, 396-402, 1999.
- MATTIG, S., DEUSSEN, A. Significance of adenosine metabolism of coronary smooth muscle cells. *Am J. Heart Circ. Physiol.* 280, H117-H124, 2001.
- MENDES, A., DESGRANGES, C., CHEZE, C., VERCAUTEREN, J., FRESLON, J.L. Vasorelaxant effects of grape polyphenols in rat isolated aorta. Possible involvement of a purinergic pathway. *Fundamental & Clinical Pharmacol.* 17, 673-681, 2003.
- MIZUMA, H., MURAKAMI, M., MORI, M. Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells – Expression of type II iodothyronine deiodinase. *Circ. Res.* 88, 313-318, 2001.
- MUBAGWA, K., MULLANE, K., FLAMENG, W. Role of adenosine in the heart and circulation. *Cardiovasc. Res.* 32, 797-813, 1996.
- MULERO, J.J., YEUNG, G., NELKEN, S.T., FORD, J.E. CD39L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J. Bio. Chem.* 274, 20064-20067, 1999.
- NAITO, Y. LOWENSTEIN, J.M. 5'-nucleotidase from rat heart membranes: inhibition by adenine nucleotides and related compounds. *Biochem. J.* 226, 645-651, 1985.

- NAKAMURA, Y., SUZUKI, T., MIKI, Y., TAZAWA, C., SENZAKI, K., MORIYA, T., SAITO, H., ISHIBASHI, T., TAKAHASHI, S., YAMADA, S., SASANO, H. Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Mol. Cel. Endocrinol.* 219, 17-26, 2004.
- NEDELJKOVIC, N., DJORDJEVIC, V., HORVAT, A., NIKEZIC, G., KANAZIR, D.T. Effect of steroid hormone deprivation on the expression of ecto-ATPase in distinct brain regions of female rats. *Physiol. Res.* 49, 419-426, 2000.
- NUNES, M.T. Thyroid hormones: mechanism of action and biological significance. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 47, 639-643, 2003.
- OJAMAA, K., KLEMPERER, J.D., KLEIN, I. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid* 6, 505-512, 1996.
- PAEZ, J.G., RECIO, J.A., ROUZAUT, A., NOTARIO, V. Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene. *Int. J. Oncol.* 19, 1249-1254, 2001.
- PARK, K.W., DAÍ, H.B., OJAMAA, K., LOWENSTEIN, E., KLEI, I., SELLKE, F.W. The direct vasomotor effect of thyroid hormones on rat skeletal muscle resistnce arteries. *Anesth. Analg.* 85, 734-738, 1997.
- PEARSON, J.D., CARLETON, J.S., GORDON, J.L. Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem. J.* 190, 421-429, 1980.
- PEDRAM, A., RAZANDI, M., AIKENHEAD, M., HUGHES, C.C.W. Integration of non-genomic and genomic actions of estrogen – Membrane-iniciated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J.Biol. Chem.* 277, 50768-50775, 2002.
- PRADHAM, A.D., MANSON, J.E., ROSSOUW, J., SISCOVICK, D, MOUNTON, C., RIFAI, N., WALLACE, R., JACKSON, R., PETTINGEER, M., RIDKER, P. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, anf incident coronary heart disease. *JAMA* 288, 13-26, 2002.
- RALEVIC, V., BURNSTOCK, G. Receptors for purine and pyrimidines. *Pharmacol. Ver.* 50, 413-492, 1998.

- RALEVIC, V., BURNSTOCK, G. Roles of P2-receptors in the cardiovascular system. *Circulation* 84, 1-14, 1991.
- RESTA, R. HOOKER, S.W., LAURENT, A.B., SHUCK, J.K., MISUMI, Y., IKEHARA, Y., KORETZKY, G.A., THOMPSON, L.F. Glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor is not required for T cell activation through CD73. *J. Immunol.* 153, 1046-1053, 1994.
- RESTA, R., HOOKER, S.W., HANSEN, K.R. Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* 133, 171-177, 1973.
- ROBERTS, P.A., NEWBY, A.C., HALLETT, M.B., CAMPBELL, A.K Inhibition by adenosine of reactive oxygen metabolite production by human polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. J.* 227, 669-674, 1985.
- ROBERTSON, S.J., ENNION, S.J., EVANS, R.J., EDWARDS, F.A. Synaptic P2X receptors. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 378-386, 2001.
- RONGEN, G.A., FLORAS, J.S., LENDERS, J.W.M. Cardiovascular pharmacology of purines. *Clin. Sci.* 92, 13-24, 1997.
- RUBANYI, G.M., KAUSER, K., JOHNS, A. Role of estrogen receptors in the vascular system. *Vascul. Pharmacol.* 38, 81-88, 2002.
- RÜCKER, B., POCHMANN, D., FURSTENAU, C.R., CARNEIRO-RAMOS, M.S., BATTASTINI, A.M.O., BARRETO-CHAVES, M.L.M., SARKIS, J.J.F. Effects of steroid hormones on synaptosomal ectonucleotidase activities from hippocampus and cortex of adult female rats. *Gen Comp Endocrinol.* 140, 94-100, 2005.
- SANTOS, R.A., GIANNOCCO, G., NUNES, M.T. Thyroid hormone stimulates myoglobin expression in soleus and extensorum digitalis longus muscles of rats: concomitant alterations in the activities of Krebs cycle oxidative enzymes. *Thyroid* 11, 545-550, 2001.
- SEVIGNY, J., SUNDBERG, C., BRAUN, N., GUCKELBERGER, O., CSIZMADIA, E., QAWI, I., IMAI, M., ZIMMERMANN, H., ROBSON, S.C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99, 2801-2809, 2002.

- SHI, J.D., KUKAR, T., WANG, C.Y., LI, Q.Z., CRUZ, P.E., DAVOODI-SEMIROMI, A., YANG, P., GU, Y., LIAN, W., WU, D.H., SHE, J.X. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1) *J. Biol. Chem.* 276, 17474-17478, 2001.
- SHUPNIK, M.A. Thyroid hormone suppression of pituitary hormone gene expression. *Ver. Endocr. Metab. Disord.* 1, 35-42, 2000.
- SIMONS, K., TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39, 2000.
- SMITH, J.W., EVANS, A.T., COSTALL, B., SMYTHE, J.W. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci.Biobehav. Ver.* 26, 45-60, 2002.
- SMITH, T.M., KIRLEY, T.L. Cloning, sequencing and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys. Acta* 386, 65-78, 1998.
- SPYCHALA, J., ZIMMERMANN, A.G., MITCHELL, B.S. Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter – Role of the cAMP response element site in mediating repression by the upstream regulatory region. *J. Biol. Chem.* 274, 22705-22712, 1999.
- SUSSMAN, M. When thyroid speaks, the heart listens. *Circ. Res.* 89, 557-559, 2001.
- THORN, J.A., JARVIS, S.M. Adenosine transporters. *Gen Pharmacol.* 27, 613-620, 1996.
- TOSTES, R.C., NIGRO, D., FORTES, Z.B., CARVALHO, M.H.C. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1143-1158, 2003.
- TROMBETTA, E.S., HELENIUS, A. Glycoprotein regluco-sylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 18, 3282-3292, 1999.
- VALVERDE, M.A., PARKER, M.G. Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *Trends Biochem. Sci.* 27, 172-173, 2002.

- VISCOLI, C.M., BRASS, L.M., KERNAN, W.N., SARREL, P.M., SUISSA, S., HORWITZ, R.I. A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 345, 1243-1249, 2001.
- VOLLMAYER P., KOCH M., BRAUN N., HEINE P., SERVOS J., ISRAR E., KEGEL B. AND ZIMMERMANN, H. Multiple ecto-nucleotidase in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression. *J. Neurochem.* 78, 1019-1028, 2001.
- VOLPATO, C.B., NUNES, M.T. Functional evidence for the presence of type II 5'-deiodinase in somatotropes and its adaptative role in hypothyroidism. *Neuroendocrinol.* 74, 220-226, 2001.
- VON KUGELGEN, I., WETTER, A. Molecular pharmacology of P2Y receptors. *Naunyn Schmieddeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 310-323, 2000.
- WAKATSUKI, A., OKATANI, Y., IKENOUE, N., FUKAYA, T. Effect of medroxyprogesterone acetate on vascular inflammatory markers in postmenopausal women receiving estrogen. *Circulation* 105, 1436-1439, 2002.
- WANG, D.J., HUANG, N.N., HEPPEL, L.A. Extracellular ATP and ADP stimulate proliferation of porcine aortic smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 153, 221-233, 1992.
- WANG, L., ANDERSSON, M., KARLSSON, L., WATSON, M.A., COUSENS, D.J., JERN, S., ERLINGE, D. Increased mitogenic and decreased contractile P2 receptors in smooth muscle cells by shear stress in human vessels with intact endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1370-1376, 2003.
- WANG, L., KARLSSON, L., MOSES, S., HULTGARDH-HILSSON, A., ANDERSSON, M., BORNA, C., GUDBJARTSSON, T., JERN, S., ERLINGE, D. P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 40, 841-853, 2002.
- WANG, T.F., GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase. *J. Bio. Chem.* 271, 9898-9901, 1996.

- WANG, T.F., GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J. Biol. Chem.* 273, 11392-11399, 1998.
- WATSON, M.L., GRIX, S.P., JORDAN, N.J., PLACE, G.A., DODD, S., LEITHEAD, J., POLL, C.T., YOSHIMURA, T., WESTWICK, J. Interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein 1 production by cultured human airway smooth muscle cells. *Cytokine* 10, 346-352, 1998.
- WINK, M.R., LENZ, G., RODNIGHT, R., SARKIS, J.J.F., BATTASTINI, A.M.O. Evidences for the phosphorylation of rat brain apyrase. *Mol. Cell. Biochem.* 213, 11-16, 2000.
- WINK, M.R., TAMAJUSUKU, A.S.K., BRAGANHOL, E., CASALI, E.A., BARRETO-CHAVES, M.L.M., SARKIS, J.J.F., BATTATINI, A.M.O. Thyroid hormones upregulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 in C6 rat glioma cells. *Mol. Cel. Endocrinol.* 205, 107-114, 2003.
- WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 288, 321-333, 2002.
- ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclatures. *Drug Dev. Res.* 52, 44-62, 2001.
- ZIMMERMANN, H. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev. Res.* 39, 337-352, 1996.
- ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *TIPS* 20, 231-236, 1999.
- ZIMMERMANN, H., 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285, 345-365, 1992.