

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BIOQUÍMICA

**EFEITOS DE CRISES CRÔNICAS E AGUDAS INDUZIDAS
POR PENTILENOTETRAZOL SOBRE A HIDRÓLISE DE
NUCLEOTÍDEOS PÚRICOS EM SORO DE RATOS
ADULTOS**

ALESSANDRA NEJAR BRUNO

Orientador:
PROF. DR. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de mestre em
Bioquímica

PORTO ALEGRE

2002

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Sarkis, pela orientação prestada, por todos os ensinamentos, pelo exemplo profissional e pela oportunidade.

À Ana, pelo auxílio e ajuda tão importantes em vários passos na realização deste trabalho.

À Carla, por ter participado de maneira tão importante e ativa no trabalho. Obrigada pela preciosa ajuda, pelas dicas e pelo tempo que dedicastes as minhas questões.

À Márcia, pela disponibilidade em ajudar sempre que foi necessário.

A todos os colegas do laboratório de enzimologia, pela convivência e principalmente por terem contribuído para um ambiente de trabalho agradável e cooperativo.

A Denise, cujo trabalho é tão importante para todos nós no laboratório. Parabéns pela responsabilidade e dedicação.

Ao Jean Pierre, pela disponibilidade e pela ajuda incondicional na realização dos experimentos.

À Adriana e ao Olavo do Centro de Memória, pela participação e colaboração tanto em partes experimentais quanto na elaboração de partes decisivas do trabalho.

À minha família, pelo apoio, compreensão e dedicação a mim prestada durante todo este período.

Ao Leonardo; companheiro, amparo, apoio e incentivo.

A Deus; pela saúde, força e iluminação.

Ao CNPq pela bolsa concedida e aos demais órgãos que apoiam a pesquisa

E por fim, a todos que não foram aqui citados, tanto no Departamento de Bioquímica quanto aos amigos de meu convívio, que de uma forma ou de outra, também prestaram a sua valiosa contribuição para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. EPILEPSIA	1
I.2. PTZ -MODELO AGUDO	3
I.3. MODELO DE KINDLING	4
I.4. ATP E TRANSMISSÃO PURINÉRGICA	5
I.5. ADENOSINA	9
I.6. ATP DIFOSFOHIDROLASE	12
I.7. 5'-NUCLEOTIDEO PIROFOSFATASE / FOSFODIESTERASE	17
I.8. 5'-NUCLEOTIDASE	19
II. OBJETIVOS.....	21
III. ARTIGOS CIENTÍFICOS	
III.1. CAPÍTULO 1	22
III. 2. CAPÍTULO 2	45
IV. DISCUSSÃO	66
V. CONCLUSÕES GERAIS	74
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

RESUMO

A adenosina tem sido descrita como tendo importante efeito neuromodulatório em SNC, inibindo a liberação de neurotransmissores excitatórios através da ativação dos receptores A1. Agonistas de receptores A1, bem como adenosina e seus análogos, tem sido descritos como supressores de crises epilépticas. Uma das vias de produção de adenosina é a hidrólise extra-celular completa do ATP envolvendo as enzimas ATP difosfohidrolase (CD39) e 5'-nucleotidase (CD73). Embora esta associação enzimática já esteja bem descrita, o envolvimento da enzima fosfodiesterase não pode ser descartado, uma vez que esta hidrolisa nucleotídeos como ATP e ADP, além de outros substratos. Recentemente, foi demonstrado em nosso laboratório um aumento das atividades ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de ratos após a indução de 2 diferentes modelos de epilepsia de lobo temporal. Neste trabalho, nós investigamos o efeito de crises agudas e crônicas induzidas pelo agente pró-convulsivante pentilenotetrazol (PTZ) sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em soro de ratos, uma vez que formas solúveis de nucleotidases já estão descritas. No modelo agudo os animais receberam apenas 1 injeção de PTZ ou salina, sendo mortos por decapitação em diferentes tempos após a injeção da droga. A hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP apresentaram aumento significativo de 40 –50% nos ratos tratados em relação aos ratos controle até 24 após a última injeção. Em 48 horas, este efeito foi abolido. Já, a hidrólise do substrato artificial *p*-Nph-5'-TMP usado como marcador para a fosfodiesterase, não apresentou nenhum aumento significativo em ratos tratados quando comparado aos animais controle. No modelo crônico (kindling), os animais recebiam doses inicialmente subconvulsivantes que resultam em crises progressivamente mais intensas ao longo das subseqüentes

estimulações. Para descartar o efeito da injeção aguda, os ratos foram mortos 48 horas após a última estimulação. Com exceção do substrato artificial para a fosfodiesterase, a hidrólise dos nucleotídeos testados aumentou de maneira significativa (cerca de 40% - 45%) em soro de ratos submetidos ao modelo de kindling. Estes resultados demonstram o envolvimento de nucleotidasas solúveis no controle dos níveis do neurotransmissor ATP e do neuromodulador adenosina, sendo estas respostas presentes tanto em situações patológicas agudas, como em situações patológicas crônicas que envolvem o fenômeno de plasticidade sináptica.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

FIGURA I.1. Liberação e hidrólise de ATP até adenosina no espaço extracelular.

CAPÍTULO 1

FIGURA 1.1. Effects of seizures induced by acute administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in rat blood serum at different times after the induction of seizures.

FIGURA 1.2. Effect of increasing concentrations of PTZ (0.05mM – 20mM) on ATP (A) and ADP (2) hydrolysis in rat blood serum, *in vitro*.

FIGURA 1.3. Effects of seizures induced by acute administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) on 5'-nucleotidase activity from rat blood serum at different times after the induction of seizures.

FIGURA 1.4. Effects of seizures induced by acute administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) on phosphodiesterase activity in rat blood serum at different times after the induction of seizures.

CAPÍTULO 2

FIGURA 2.1. Effects of PTZ-kindling on ATP, ADP and AMP hydrolysis from rat blood serum.

FIGURA 2.2. Effects of PTZ-kindling on phosphodiesterase activity from rat blood.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina 5'-difosfato

AMP - adenosina 5' -monofosfato

ATP - adenosina 5' –trifosfato

CD39 – antígeno de ativação celular linfóide

CD73 - proteína de superfície de linfócitos

CHA - cyclohexyladenosine

CSF – fluido cérebro- espinhal

EBV - vírus Epstein Barr

GABA – γ -ácido aminobutírico

NMDA - n-metil-D-aspartato

NTPDase – ecto-nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase

PC-1 - Glicoproteína de Membrana Plasmática Celular –1

p-Nph-5'-TMP - *p*- Nitrofenil-5'-timidina-monofosfato

PPi - pirofosfato

PTZ - pentilenotetrazol

SNC – Sistema Nervoso Centra

I. INTRODUÇÃO

I.1. EPILEPSIA

Epilepsia é um tipo de disfunção neurológica decorrente de uma excessiva atividade neuronal anormal e hypersincrônica (MELDRUM & CHAPMAN, 1998). Os termos desordens convulsivas e crises cerebrais são sinônimos de epilepsia e referem-se a episódios recorrentes de disfunções cerebrais manifestadas por alterações estereotipadas no comportamento (ENGEL & PEDLEY, 1997).

Em epilepsia, as diferentes características das chamadas crises epiléticas são utilizadas como critério de classificação. Dentre os principais tipos de crises epiléticas, encontram-se as crises parciais simples, onde há uma preservação da responsividade do paciente durante a crise; crises parciais complexas, onde a responsividade do paciente é alterada em relação ao ambiente, e crises generalizadas, onde grande parte, ou totalidade dos hemisférios cerebrais sofrem um acometimento simultâneo, simétrico e sincrônico (PALMINI & COSTA, 1998).

A epilepsia de lobo temporal é principalmente caracterizada por crises focais e sinais psíquicos que acompanham os fenômenos motores. Ocorre preferencialmente em indivíduos adultos, apresentando alta incidência, gravidade e, conseqüentemente, grande importância clínica (SHORVON, 1990).

Crises epiléticas estão intimamente relacionadas à neurotransmissão do SNC. Envolvem alterações na excitabilidade dos neurônios e nas conexões sinápticas entre os mesmos. As anormalidades na neurotransmissão ocorrem através de um aumento da transmissão excitatória, diminuição da transmissão inibitória ou de ambos eventos (MELDRUM, 1984).

Algumas áreas cerebrais apresentam maior suscetibilidade à epilepsia que outras. Dentre as áreas mais vulneráveis destacam-se estruturas límbicas no lobo temporal mesial, hipocampo, córtex entorinal e amígdala (DICHTER, 1997).

A hipótese que relaciona modificações na transmissão inibitória GABAérgica com a presença de focos epileptogênicos, foi baseada em drogas com efeito de induzir convulsões em modelos experimentais animais, e cujo modo de ação é o bloqueio da transmissão GABAérgica (SCHWARTZKROIN & PRINCE, 1980).

Um aspecto importante tratando-se de epilepsia é o influxo de cálcio. Durante as crises, o cálcio extracelular encontra-se em baixos níveis, provavelmente devido ao seu fluxo para o meio intracelular (PUMAIN & HEINEMANN, 1985). Na ocorrência de crises sustentadas, o massivo influxo de cálcio ativa a proteína calmodulina kinase II aumentando a liberação de transmissores. Este aumento da excitabilidade neuronal pode levar em parte a um *status epilepticus* auto-sustentado (WASTERLAIN et al., 1992).

O fenômeno da plasticidade celular também está intimamente relacionado com epilepsia. O termo inclui todas as formas de reorganização que ocorrem no cérebro maduro, podendo ser estas, morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas. A plasticidade em epilepsia sob os pontos de vista morfológico, fisiológico e bioquímico incluem respectivamente: modificações na ultraestrutura de glia e neurônios, remodelamento sináptico e morte celular, bem como novas propriedades adquiridas por neurônios e modificações da expressão gênica (CHEVASSUS et al., 1997).

I.2. PTZ -MODELO AGUDO

Pentilenotetrazol é uma droga pró-convulsivante comumente usada em modelos experimentais crônicos e agudos de epilepsia.

O mecanismo de ação do PTZ baseia-se na diminuição da função GABAérgica central (CORDA et al., 1992) atuando através do antagonismo do receptor GABA_A (OLSON, 1981). Outros estudos também demonstraram que o PTZ pode atuar alterando a permeabilidade da membrana celular a potássio através de um mecanismo dependente de voltagem (MADEJA et al., 1996).

Os modelos experimentais de epilepsia são denominados agudos, quando estes são utilizados de maneira em que o animal submetido ao modelo em questão apresenta crises convulsivas apenas durante a vigência do agente indutor. No caso do modelo agudo induzido com PTZ, a droga é aplicada no animal de maneira localizada ou tópica, somente uma vez.

Está bem estabelecido que os níveis de aminoácidos excitatórios encontram-se aumentados em fluido cérebro-espinhal (CSF) de ratos após convulsões induzidas por PTZ (HALONEN et al., 1992). Trabalhos anteriores demonstraram um aumento nos níveis extracelulares de glutamato em amígdala e córtex pré-frontal após a administração aguda de PTZ (ROCHA et al., 1996).

Além do modelo agudo do pentilenotetrazol, outros modelos agudos também são utilizados. Os modelos agudos mais utilizados incluem: estimulação elétrica *in vivo*, eletrochoque e uso de inibidores de aminoácidos inibitórios como bicuculina, picrotoxina e estriçnina.

1.3 KINDLING – MODELO CRÔNICO

Kindling ou abrasamento, refere-se ao fenômeno onde repetidas aplicações de estímulos químicos ou elétricos, inicialmente subconvulsivantes, resultam em crises progressivamente mais intensas ao longo das subseqüentes estimulações (MASON &

COOPER, 1972). Após estabelecido o processo convulsivo, este poderá ser desencadeado muito tempo após o término da estimulação inicial (RACINE, 1972).

O modelo de kindling constitui um modelo crônico de epilepsia por ser caracterizado por crises recorrentes em intervalos variados de tempo, não sendo necessário a aplicação do estímulo indutor da epileptogênese para que a crise seja desencadeada (AVANZINI et al., 1997). Os modelos crônicos de epilepsia mais utilizados são aqueles que mimetizam a epilepsia de lobo temporal e dentre os modelos existentes, o modelo de kindling tem sido o mais utilizado (JAMES et al., 1997).

Uma possível explicação para a hiperexcitabilidade cerebral observada após o modelo de kindling, é a ocorrência do aumento da função de uma subpopulação de sinapses glutamatérgicas via receptores NMDA (MC NAMARA, 1994). Além disto, o brotamento de fibras musgosas em células granulares de hipocampo observadas no modelo de kindling (SUTULA et al., 1988), leva a crer que a hiperexcitabilidade cerebral que ocorre após o modelo se dá devido à formação de um novo circuito sináptico.

É possível a realização do modelo de kindling com a aplicação de estímulos elétricos, ou químicos.

No denominado kindling elétrico, repetidas aplicações focais de estímulos elétricos geram uma progressiva intensificação das crises que culminam em crises convulsivas generalizadas (GODDARD et al., 1969). Este processo pode ser produzido através de estimulação de muitas áreas cerebrais, mas não em todas. A amígdala é uma estrutura grandemente utilizada pelo fato de apresentar proporções adequadas para a estimulação (JAMES et al., 1997).

A estimulação elétrica inicial de baixa intensidade pode não provocar um comportamento detectável ou uma resposta eletrofisiológica monitorada através de

eletroencefalograma (EEG). Entretanto, estimulações subseqüentes levam ao desenvolvimento de tais respostas (GODDARD et al., 1969).

Os diferentes estágios de progressão do kindling foram descritos por RACINE, em 1972. Racine classificou estas fases de progressão em 5 diferentes estágios através das seguintes características clínicas e comportamentais: 1) clônus facial; 2) movimentos de flexão e extensão da cabeça; 3) clônus de patas dianteiras; 4) resposta de orientação, na qual o animal permanece de pé apenas sobre as patas traseiras (“rearing”); 5) “rearing” seguido de queda.

O kindling químico consiste em um modelo experimental de epilepsia onde ocorrem alterações comportamentais e eletrográficas progressivas induzidas por repetidas administrações de agentes proconvulsivantes. Os agentes químicos mais comumente utilizados incluem cocaína, picrotoxina e PTZ (McNAMARA et al., 1985).

I.4. ATP E TRANSMISSÃO PURINÉRGICA

O ATP é conhecido como um importante neurotransmissor em sistemas nervoso central e periférico, sendo indicado como o principal transmissor de sinapses purinérgicas (BURNSTOCK, 1972). Os primeiros indícios do papel do ATP como neurotransmissor surgiram com os trabalhos de HOLTON & HOLTON, 1954 e HOLTON, 1959, onde foi demonstrada a liberação de ATP em nervos sensoriais. Então, BURNSTOCK (1972), demonstrou que além da transmissão colinérgica e noradrenérgica até então conhecidas, existe uma transmissão purinérgica em sistema nervoso autônomo, onde o ATP atua como o principal neurotransmissor.

Além disto, trabalhos anteriores forneceram evidências diretas de que o ATP pode atuar como um neurotransmissor excitatório entre neurônios do sistema nervoso central (EDWARDS et al., 1992; SLINSKI et al., 1992; EVANS et al., 1992).

O ATP é liberado de fontes pré-sinápticas para o meio extracelular juntamente com outros neurotransmissores, dentre os quais podemos citar: a acetilcolina (VIZI et al., 1997), noradrenalina (KENNEDY, 1996) e serotonina (POTTER & WHITE, 1980). Esta liberação ocorre através de exocitose em um processo dependente de cálcio (PHILLIS & WU, 1981).

Uma vez liberado, o ATP pode interagir com receptores P_2 (BURNSTOCK, 1978), ser degradado até adenosina via ecto-nucleotidases (Fig. I.1) (ZIMMERMANN et al., 1979) ou servir como substrato para ecto-proteínas kinases durante o fenômeno de plasticidade sináptica (HENDLEY et al., 1988).

As ações induzidas pelo ATP são efetuadas através da interação com os receptores P_2 . Estes receptores estão envolvidos na modulação da maioria das transmissões sinápticas. Assim, o ATP pode controlar diretamente a atividade neuronal através da sua interação com os receptores P_2 (INOUE et al., 1998). Os receptores P_2 podem ser classificados em duas famílias: receptores P_2X e P_2Y . Os receptores P_2X atuam como canais ionotrópicos ativados por ATP e estão divididos em sete subtipos (P_2X_{1-7}). Os receptores metabotrópicos P_2Y são acoplados a proteínas G e estão divididos nos subtipos $P_2Y_{1,2,4,6,11}$ (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Além destes, ainda foi descrita uma terceira classe de receptores purinérgicos (receptores P_3), para os quais tem sido proposto um efeito na modulação da liberação de transmissores (SHINOZUKA et al., 1988). A classificação dos receptores P_2 foi inicialmente baseada em critérios farmacológicos (BURNSTOCK & KENNEDY,

1985), e posteriormente reforçada através de técnicas de clonagem e expressão em sistemas heterólogos (EVANS et al., 1995).

Dentre as respostas induzidas por ATP através da estimulação dos receptores P_2 excitatórios em neurônios hipocâmpais, destacam-se os efeitos de aumento das concentrações intracelulares de cálcio, e a indução da liberação de glutamato (INOUE et al., 1992, 1995).

ATP normalmente é encontrado em concentrações extracelulares baixas; entretanto, em situações como hipoxia ou isquemia, estresse, injúria, e situações que envolvem morte celular de maneira geral, o ATP é encontrado em altas concentrações em preparações como plaquetas, células endoteliais e células vasculares musculares lisas (GORDON, 1986). A partir destes resultados foi demonstrado que o ATP extracelular liberado em grandes quantidades, atua nos receptores P_2X_7 desencadeando um processo de morte celular (HARADA et al., 2000). Estes resultados condizem com o fato de que em situações patológicas, a expressão do receptor P_2X_7 é significativamente aumentada (HARADA et al., 2000). Desta forma, foi então atribuído ao ATP ações opostas, fisiológicas ou patológicas, dependendo da ativação dos receptores P_2Y_2 e P_2Y_4 , mediando proliferação celular; ou ativação do receptor P_2X_7 , mediando morte celular (HARADA et al., 2000).



Figura I.1: Liberação e hidrólise de ATP até adenosina no espaço extracelular.
(Adaptado de www.biozentrum.uni-frankfurt.de/prof/zimmermann)

I.5. ADENOSINA

A adenosina é um nucleosídeo envolvido em muitas situações fisiológicas, possuindo um importante papel na modulação da atividade neuronal de SNC. Devido aos seus efeitos modulatórios, adenosina é descrita como uma substância neuroprotetora e neuromoduladora em muitas áreas do SNC de mamíferos (PHILLIPS & WU, 1981). Apesar de seus efeitos modulatórios, a adenosina não é considerada um neurotransmissor

por não ser armazenada em vesículas sinápticas e nem liberada da mesma forma que os neurotransmissores clássicos conhecidos (BRUNDEGE & DUNWIDIE, 1997).

Fisiologicamente, a formação de adenosina pode se dar a partir da degradação de AMP catalisada pela enzima 5'-nucleotidase, ou através da clivagem de S-adenosil-homocisteína pela ação da enzima S-adenosil-homocisteína hidrolase (PATEL & TUDBALL, 1986). Posteriormente, a adenosina pode ser transportada através da membrana plasmática pelo processo de difusão facilitada através de transportadores específicos de nucleosídeos (BRUNDEGE & DUNWIDIE, 1997). A metabolização de adenosina se dá através de desaminação até inosina pela ação da enzima adenosina deaminase (ADA), ou através de fosforilação até 5'-AMP realizada pela enzima adenosina quinase (ADK) (BRUNDEGE & DUNWIDIE, 1997). A adenosina quinase é considerada uma enzima chave no metabolismo da adenosina devido ao baixo valor do K_m .

Adenosina exerce os seus efeitos modulatórios através da interação com purinoreceptores P_1 . Tais receptores foram identificados e clonados, sendo então divididos em quatro subtipos: A_1 , A_{2A} (receptores de alta afinidade), A_{2B} e A_3 (receptores de baixa afinidade (BRUNDEGE & DUNWIDIE, 1997). Os dois principais subtipos de receptores ativados por adenosina, A_1 e A_2 , estão envolvidos com diversos fatores como adenilato ciclase, inositol fosfato, canais de potássio, canais de cálcio e liberação de neurotransmissores (WILLIAMS, 1990). Os efeitos modulatórios da adenosina estão associados com o subtipo de receptor ativado pela mesma. Sabe-se que o efeito de inibição da liberação de neurotransmissores, em particular aminoácidos excitatórios, é mediado pelos receptores A_1 (DRAGUNOW, 1988; BRUNDEGE & DUNWIDIE, 1997). Dentre os neurotransmissores cuja liberação é inibida pela interação da adenosina com os receptores A_1 , pode-se citar a acetilcolina, glutamato, dopamina e noradrenalina (RIBEIRO &

SEBASTIÃO, 1986; DOLPHIN & ARCHER, 1983; BRUNDEGE & DUNWIDIE, 1997). Os receptores A_1 estão localizados em praticamente todo o cérebro, sendo portanto os mais abundantes em SNC (REPPERT et al., 1991). Os efeitos inibitórios mediados pela ativação dos receptores A_1 na neurotransmissão, ocorrem devido à inibição da atividade da adenilato ciclase e a conseqüente diminuição dos níveis de AMP cíclico (BRUNDEGE & DUNWIDIE, 1997).

O envolvimento dos receptores A_2 tem sido demonstrado em situações de plasticidade sináptica, atividade locomotora e comportamental, e na modulação de respostas sinápticas excitatórias em SNC (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 1996). A ativação destes receptores estimulam a adenilato ciclase aumentando a produção de AMP cíclico (LONDOS et al., 1980). Além disso, foi demonstrado que a transmissão sináptica em hipocampo de ratos é facilitada pelos receptores A_2 via proteína quinase C (CUNHA & RIBEIRO, 2000). Devido a estes efeitos sobre a adenilato ciclase, e conseqüentemente sobre a modulação na neurotransmissão, os receptores A_1 são também denominados inibitórios, enquanto que os receptores A_2 são também chamados facilitatórios.

Os estudos de DRURY e SZENT-GYORGI (1929) demonstraram alguns efeitos fisiológicos da adenosina, dentre eles, o efeito de vasodilatação coronária. Além do efeito na vasodilatação, a adenosina também atua como um inibidor da agregação plaquetária (KITAKAZE et al., 1991). Este efeito confere à adenosina uma propriedade antitrombogênica (KITAKAZE et al., 1991).

Os níveis sinápticos de adenosina encontram-se aumentados em situações de grande demanda metabólica. Uma elevação significativa dos níveis extracelulares de adenosina, foi demonstrada em situações como hipóxia (LLOYD et al., 1993), isquemia (RUDOLPHI et

al., 1992; PEDATA et al., 1993), estimulação elétrica (LLOYD et al., 1993) e convulsões (WINN et al., 1979).

O papel neuroprotetor da adenosina em situações como isquemia ocorre devido a mecanismos de manutenção da homeostase intracelular do cálcio, diminuição da liberação de aminoácidos excitatórios, manutenção do potencial de membrana, e impedimento da excessiva despolarização da pré e pós- sinapse (RUDOLPHI et al., 1992).

Adenosina também está envolvida no aspecto da citoproteção neuronal pois ativa enzimas do sistema antioxidante como: catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, apresentando um eficiente mecanismo de proteção aos danos causados pelos radicais livres (MAGGIRWAR et al., 1994).

Evidências crescentes suportam a idéia de que adenosina atua como uma substância anticonvulsivante endógena. Crises convulsivas induzidas por agentes pró-convulsivantes induzem um aumento nos níveis de adenosina (WINN et al., 1979; BERMAN et al., 2000). Muitos trabalhos tem demonstrado que adenosina e agonistas de receptor A₁ apresentam proteção significativa contra crises induzidas por uma variedade de mecanismos pró-convulsivantes (AULT & WANG, 1986; CHIN, 1989; MALHOTRA & GUPTA, 1997). Este efeito anticonvulsivante tem sido observado em crises induzidas experimentalmente *in vivo* (DRAGUNOW, 1988) e *in vitro* (AULT AND WANG, 1986). Além disto, antagonistas de receptor A₁ possuem efeito pró-convulsivante, à medida que facilitam o desenvolvimento e a severidade da atividade convulsiva (CHESI & STONE, 1997).

Todos estes resultados levam a crer, que o *status epilepticus* pode ser causado pela perda dos mecanismos anticonvulsivantes da adenosina (YOUNG & DRAGUNOW, 1994).

1.6. ATP DIFOSFOIDROLASE

O nome ATP difosfoidrolase ou apirase (EC 3.6.1.5), primeiramente proposto por MEYERHOF em 1945, é uma designação geral para enzimas que hidrolizam todos os nucleotídeos di e trifosfatados até os seus respectivos nucleosídeos monofosfatados e fosfato inorgânico, liberando 2 mol de Pi (fosfato inorgânico) por mol de nucleosídeo trifosfatado e 1 mol de Pi por mol de nucleosídeo difosfatado. A apirase é um membro da família das ecto-ATPases tipo-E, que caracterizam-se principalmente por serem dependentes de cálcio ou magnésio, insensíveis a inibidores específicos de ATPases intracelulares tipo-P, tipo-F e tipo-V, e hidrolisarem todos nucleotídeos di e trifosfatados, mas não nucleotídeos monofosfatados (PLESNER, 1995).

A partir de 1945, e principalmente na última década, ATP difosfoidrolases de diferentes fontes foram descritas em diferentes tipos de células, sugerindo para estas um importante papel no metabolismo celular. Estudos sobre a localização e mecanismos de catálise das ATP difosfoidrolases, indicam o envolvimento destas enzimas na regulação dos níveis de nucleotídeos e seus produtos de hidrólise em células e tecidos (KOMOSZYNSKY, 1994). A ação de nucleotídeos purinérgicos no sistema nervoso é inativada por uma cascata enzimática que envolve as enzimas ATP difosfoidrolase (SARKIS & SALTÓ, 1991; BATTASTINI et al., 1991) e 5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 1996), levando o ATP à degradação seqüencial até adenosina.

Atualmente, uma nova nomenclatura tem sido adotada para designar ecto-nucleotidasas. Segundo a nova nomenclatura, apirases pertencem a uma família denominada E-NTPDase (ectonucleotídeo trifosfato difosfoidrolase). Seis membros desta família tem sido clonados e caracterizados em mamíferos (ZIMMERMANN, 2001). A NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATPdifosfohidrolase) hidrolisa ATP e ADP

igualmente bem (HEINE et al., 1999; WANG & GUIDOTTI, 1996). A enzima NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) possui uma preferência 30 vezes maior pela hidrólise do ATP que pela hidrólise do ADP (KIRLEY, 1997). A coexistência destas distintas enzimas foi demonstrada em cérebro de ratos (KEGEL et al., 1997) e em estômago e moela de galinha (CARL & KIRLEY, 1997).

CD39 é uma glicoproteína de membrana de 70.000 a 100.000 daltons, expressa principalmente em linfócitos ativados (MALISZEWSKI et al., 1994) e inicialmente descrita como uma proteína marcadora de células B transformadas pelo vírus Epstein Barr (WANG & GUIDOTTI, 1996).

Em 1996, a apirase solúvel de batata foi clonada e purificada (HANDA & GUIDOTTI, 1996). De acordo com evidências como: uma grande similaridade da seqüência de aminoácidos entre a apirase clonada e CD39, a coincidência do padrão de expressão da CD39 e da ecto-apirase sobre as células imunocompetentes e a presença de atividade ecto-apirásica sobre os linfócitos EBV transformados que expressam CD39 como marcador de superfície, obteve-se a confirmação de que CD39 é uma ecto-apirase (WANG & GUIDOTTI, 1996).

As apirases de cérebro de ratos e de humanos, logo após foram clonadas e seqüenciadas (WANG et al., 1997; SMITH & KIRLEY, 1998). A ecto-apirase de cérebro humano é altamente glicosilada, possuindo sete sítios potenciais de glicosilação (SMITH & KIRLEY, 1999). As apirases também podem ser reguladas por fosforilação, podendo conseqüentemente estar envolvidas em processos de transdução de sinal (SMITH & KIRLEY, 1998). A ecto-apirase de cérebro de ratos na forma fosforilada foi recentemente demonstrada em nosso laboratório (WINK et al., 2000).

Através da análise das seqüências de apirases de diversas fontes, foi demonstrada a presença de quatro regiões conservadas que foram chamadas de ACR (“ACR I – V apyrase conserved regions”) (HANDA & GUIDOTTI, 1996).

Ecto-enzimas normalmente são ligadas a membranas através de uma única cadeia peptídica ou através de lipídios específicos. Entretanto, as ecto-apirases de mamíferos (CD39) são proteínas integrais de membrana possuindo dois domínios transmembrana com segmentos NH₂ e COOH terminais citoplasmáticos, além de um grande domínio extracelular com atividade enzimática (WANG & GUIDOTTI, 1998). As ecto-apirases, em sua maioria, são enzimas inativadas por detergentes normalmente usados para solubilizar proteínas de membrana, fato este que dificulta a purificação da mesma (BATTASTINI et al., 1998). Este comportamento se dá devido à dissociação de sua estrutura tetramérica em monômeros, que são por sua vez, inativos enzimaticamente (WANG & GUIDOTTI, 1998).

Apirases são enzimas com uma ampla distribuição, tendo sido bem estabelecidas em tecidos vegetais (KRISHNAN, 1949; VALENZUELA et al., 1989) e animais como insetos (RIBEIRO et al., 1984; RIBEIRO et al., 1989; SARKIS et al., 1996), aves (CARL & KIRLEY, 1997) e tecidos de mamíferos, como sinaptossomas de sistemas nervoso central e periférico (BATTASTINI et al., 1991; SARKIS & SALTÓ, 1991), aorta bovina (COTÉ et al., 1992), plasma humano (HOLMSEN e HOLMSEN, 1971), secreções seminais (ROSENBERG et al., 1988), vasos umbilicais humanos (YAGI et al., 1992), pulmão bovino (PICHER et al., 1993), plaquetas de ratos (FRASSETO et al., 1993), células neoplásicas humanas (DZHANDZHUGAZYAN et al., 1998), dentre outros.

A atividade apirásica possui diferentes papéis fisiológicos dependendo do tecido em que se encontra. O efeito fisiológico proposto para apirase em células imune é a proteção dos efeitos potencialmente líticos do ATP liberado pelas células alvo (FILIPPINI et al., 1990). Já nas células endoteliais, o principal efeito da apirase está relacionado com a hidrólise do ADP, uma vez que este é um conhecido agente indutor de agregação

plaquetária. Desta forma, a apirase desempenha um importante papel na hemostasia e tromboregulação (KACZMAREK et al., 1996). Recentemente foi demonstrado que ratos deficientes de CD39/ATP difosfoidrolase, apresentam problemas relacionados com hemostasia e trombogênese (ENJYOJI et al., 1999). Assim, formas solúveis de apirase são agentes potencialmente terapêuticos para a inibição de processos trombogênicos (GAYLE et al., 1998). Em sistema nervoso, a apirase possui importante papel no término da ação do neurotransmissor ATP através de sua hidrólise até o neuromodulador adenosina (EDWARDS & GIBB, 1993).

A participação da ATP difosfoidrolase também tem sido demonstrada em mecanismos que envolvem plasticidade sináptica, como mecanismos de formação da memória (BONAN et al., 1998). Nestes trabalhos, o decréscimo da atividade apirásica observada imediatamente após a sessão de treino na tarefa de esquiva inibitória, aumentaria a disponibilidade de ATP na fenda sináptica, estando este nucleotídeo envolvido na modulação da eficiência sináptica (BONAN et al., 1998).

Além de condições fisiológicas, o envolvimento de apirases também tem sido descrito em situações patológicas. Alterações significativas na atividade apirásica foram demonstradas em ratos submetidos a episódios isquêmicos (SCHETINGER et al., 1998). Resultados obtidos através de técnicas histoquímicas e análise de RNA mensageiro, demonstraram um aumento da atividade apirásica em áreas injuriadas de hipocampo (BRAUN et al., 1998). Em adição, a expressão da ecto-apirase/CD39 em melanomas diferenciados de humanos encontra-se aumentada, apresentando uma diminuição gradual com a progressão do tumor (DZHANDZHUGAZYAN et al., 1998).

Recentemente, foi demonstrado um aumento nas atividades da ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase de sinaptossoma de hipocampo e córtex de ratos, em diferentes períodos

após a indução de estado epiléptico através da administração de pilocarpina e ácido caínico (BONAN et al., 2000). Além disto, o gene para a CD39 de humanos (10q23.1 a 24) está co-localizado com o gene envolvido na epilepsia parcial humana (10q22 to 24) (OTTMAN et al., 1995). Estes resultados indicam o possível envolvimento de apirases em uma situação patológica que é a epilepsia.

I.7. FOSFODIESTERASE / 5'-NUCLEOTIDEO PIROFOSFATASE

A enzima 5'-nucleotideo pirofosfatase/ fosfodiesterase são membros da família E-NPP e incluem os membros NPP1 (PC-1), NPP2 (autotaxina) e NPP3 (PD-1 β) (ZIMMERMANN, 2001).

As 5'-nucleotideo fosfodiesterases (PDEase, EC 3.1.4.1) são enzimas microsossomais conhecidas por hidrolisar DNA, RNA, UDP-galactose, NAD⁺, ATP e ADP, liberando monofosfonucleotídeos-5'-fosfato da ligação 3'-OH terminal dos nucleotídeos (SAKURA et al., 1998). Através de análise cinética, foi demonstrado que o ADP e o AMP atuam como inibidores competitivos da atividade fosfodiesterásica (SAKURA et al., 1998). Além dos substratos fisiológicos, estas enzimas também podem hidrolisar o substrato artificial *p*-nitrofenil-5'-timidina-monofosfato (*p*-Nph-5'-TMP) liberando o produto *p*-nitrofenol (SAKURA et al., 1998).

As PDEases são amplamente distribuídas em órgãos humanos e fluidos corporais (HAUGEN & SKREDE, 1997).

Estudos com a PDEase de cordão umbilical humano revelaram um peso molecular de 128.000 daltons, enquanto que a PDEase de intestino bovino possui apenas 108.000 daltons (SAKURA et al., 1998).

A atividade PDEásica sérica é eficientemente usada como marcador de hepatomas (TSOU et al., 1973). Já em soro umbilical fetal foi demonstrada uma atividade PDEásica

aumentada (SAKURA & FUJII, 1988), que pode ser explicada pelo papel desta enzima na inibição da agregação plaquetária devido à hidrólise do ADP.

A origem da PDEase de soro fetal pode ser uma forma solúvel de PC-1 humana. A PC-1 humana foi identificada como uma glicoproteína de membrana com um peso molecular de 130.000 daltons e uma atividade de fosfodiesterase I alcalina, além de uma atividade nucleotídeo pirofosfática (BELLI & GODING, 1994). A clonagem e o sequenciamento da PC-1 de ratos revelou a presença de uma região amino terminal citoplasmática de 58 aminoácidos, uma região transmembrana de 21 aminoácidos e um grande domínio extracelular de 826 aminoácidos (VAN DRIEL & GODING, 1987).

Além de tecidos como cérebro, fígado e rins (TAKAHASHI et al., 1970), a PC-1 é altamente expressa em condrócitos de traquéia (HARAHAP & GODING, 1988). Uma pronunciada expressão de PC-1 em condrócitos pode ser atribuída a um importante efeito no processo de calcificação óssea e inibição da calcificação cartilaginosa. Isto se deve ao fato de que a atividade nucleotídeo trifosfato pirofosfólise da PC-1 produz PPI extracelular, cuja presença é requerida para a calcificação óssea, mas o excesso inibe a calcificação cartilaginosa. Desta forma, a PC-1 participa do mecanismo que controla o balanço entre calcificação e inibição desta em cartilagem articular (TERKELTAUB et al., 1994).

Trabalhos prévios demonstraram a purificação e a clonagem de uma glicoproteína secretada por células tumorais humanas que estimula a sua própria motilidade. Esta glicoproteína foi denominada autotaxina (ATX) e revelou homologia com a ecto-proteína PC-1 (MURATA et al., 1994).

I.8. 5'-NUCLEOTIDASE

A ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5), é uma enzima com peso molecular aparente de 62 a 74 kDa apresentando-se como um dímero com pontes dissulfeto entre as

cadeias (ZIMMERMANN, 1996). Em relação aos aspectos estruturais, a enzima encontra-se ancorada por glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Este ancoramento pode ser clivado pela ação de uma fosfolipase C específica para GPI dando origem à formas solúveis da enzima (ZIMMERMANN, 1992).

A 5'-nucleotidase é a principal enzima responsável pela formação de nucleosídeos extracelulares a partir de nucleotídeos monofosfatados. Apesar da 5'-nucleotidase possuir habilidade para hidrolizar nucleotídeos como GMP e UMP, o AMP geralmente é o nucleotídeo hidrolisado com maior eficiência, uma vez que os valores de Km para este nucleotídeo estão na faixa de micromolar (ZIMMERMANN, 1996).

A presença da 5'-nucleotidase foi demonstrada em diferentes tecidos, incluindo placenta de humanos (MISUMI et al., 1990), rim de camundongos (RESTA et al., 1993), fígado bovino (SUZUKI et al., 1993), órgão elétrico de *Torpedo marmorata* (GONDAL & ZIMMERMANN, 1987), fibroblastos de ratos (WIDNELL, et al., 1982), várias regiões de cérebro de ratos (HEYMANN et al., 1984) como mielina (CAMMER et al., 1980), dentre outras. Ainda, resultados recentes mostraram a existência de isoformas imunologicamente distintas da ecto-5'-nucleotidase em terminais nervosos de todas as regiões de hipocampo de mamíferos, com uma predominância na região CA3 (CUNHA et al., 2000).

A atividade da ecto-5'-nucleotidase tem sido associada com o controle da interação de linfócitos com as células endoteliais, sendo portanto considerada uma molécula de adesão (AIRAS et al., 1993). Esta enzima também está descrita com papel ativo no mecanismo de transdução de sinal no sistema imune humano (DIANZANI et al., 1993), além de servir como um marcador de maturação de ambos linfócitos, T e B (HEIBRONN & ZIMMERMANN, 1995; ZIMMERMANN, 2001).

Recentemente foi demonstrado um aumento da atividade da 5'-nucleotidase em diferentes tempos após epilepsia de lobo temporal em sinaptossomas de ratos tratados com

pilocarpina e cainato (BONAN et al., 2000). Adicionalmente, a presença de uma 5'-nucleotidase foi detectada em sinapses de fibras musgosas de girus dentado de ratos epiléticos (SHOEN et al., 1999). Estes resultados sugerem que a atividade da 5'-nucleotidase em situações patológicas como epilepsia, contribui para uma diminuição da atividade sináptica através da produção da estrutura neuromoduladora de ação inibitória adenosina.

II. OBJETIVOS

Considerando que:

- Muitos trabalhos tem demonstrado que adenosina e seus análogos suprimem crises convulsivas induzidas por diferentes agentes pró-convulsivantes em diferentes modelos animais.

- Em situações patológicas como epilepsia, os níveis de adenosina mostram-se aumentados.

- Uma das vias de produção desta substância neuromoduladora é a completa hidrólise extracelular do ATP envolvendo nucleotidasas que, ao mesmo tempo que produzem adenosina, hidrolisam o neurotransmissor excitatório ATP.

- Um recente trabalho publicado em nosso laboratório, demonstrou que as atividades da ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase estão aumentadas em dois distintos modelos de epilepsia em sinaptossoma de ratos.

- Estão descritas formas solúveis de nucleotidasas;

O presente trabalho tem como objetivos:

1. Estudar a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, agora em soro de ratos mortos em diferentes tempos após a indução de crises convulsivas agudas com o agente pró-convulsivante PTZ.

2. Estudar a hidrólise dos mesmos nucleotídeos citados acima, em ratos submetidos ao modelo crônico de epilepsia kindling, utilizando o mesmo agente pró-convulsivante PTZ.

3. Investigar o envolvimento da enzima fosfodiesterase nestes modelos; uma vez que esta enzima também hidrolisa ATP e ADP e está descrita em soro.

III. CAPÍTULO 1 –BRUNO, A.N., OSES, J.P., BONAN, C.D., WALZ, R., BATTASTINI, A.M.O. & AND SARKIS, J.J.F. Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol.

Artigo submetido à revista Neuroscience Research

**INCREASE OF NUCLEOTIDASE ACTIVITIES IN RAT BLOOD SERUM AFTER
A SINGLE CONVULSIVE INJECTION OF PENTYLENETETRAZOL**

Alessandra Nejar Bruno¹, Jean Pierre Oses¹, Carla Denise Bonan², Roger Walz³, Ana Maria Oliveira Battastini¹ and João José Freitas Sarkis^{1*}.

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

³ Centro de Cirurgia de Epilepsia, CIREP, Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

*Corresponding Author:

João José Freitas Sarkis.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ramiro Barcellos, 2600 - ANEXO, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil.

FAX: +55 51 3316 5540 , PHONE: + 55 51 316 5554

e-mail: jjsarkis@plug-in.com.br

Abstract

Adenosine has been shown to be a major regulator in convulsive disorders exerting its anticonvulsant effects on various seizure models. The ectonucleotidase pathway is an important metabolic source of extracellular adenosine. In this study, we evaluated ATP, ADP and AMP hydrolysis in rat serum at 5 min and 30 min, 1, 5, 12, 24 and 48 hours after a single convulsive intraperitoneal injection of pentylenetetrazol (PTZ, 60mg/kg). ATP, ADP and AMP hydrolysis by rat blood serum were significantly increased (40%-50%) until 24 hours after PTZ injection. There were no significant differences in the nucleotide hydrolysis when the *in vitro* effect of different concentrations of PTZ was analyzed. Changes in nucleotide hydrolysis observed after acute administration of PTZ could not be attributed to phosphodiesterase activity since PTZ-treated rats did not demonstrate significant differences in the hydrolysis of the substrate marker of this enzyme when compared to control rats. The enhancement of serum nucleotidase activities pathway induced by generalized seizures may play an important role in attenuating seizure activity.

Key words: adenosine, nucleotidases, epilepsy, seizures, ATP diphosphohydrolase, 5'-nucleotidase

1. Introduction

Adenosine is an endogenous neuromodulator that possess anticonvulsant and neuroprotective properties (Kostopoulos, 1988). Synaptic adenosine levels increase during periods of increased metabolic demand, such as those that exist during seizures (During and Spencer, 1992). Indeed, adenosine and its derivatives have been shown to protect from experimentally-induced seizures in vivo (Dragunow, 1988) and in vitro (Ault and Wang, 1986). Adenosine and its analogues depress neuronal activity in the central nervous system by decreasing membrane excitability and/or neurotransmitter release (Phillips and Wu, 1981). This depressant effect has been attributed to the activation of A₁ adenosine receptors (Dragunow, 1988). It has been previously demonstrated that adenosine and adenosine A₁ receptor agonists significantly protect against seizures induced by acute pentylenetetrazol administration, indicating an anticonvulsant action mediated by the A₁ adenosine receptor. (Malhotra and Gupta, 1997). Furthermore, an increase in hippocampal adenosine release has been demonstrated before and during seizures induced by the administration of proconvulsants, including pentylenetetrazol (Berman et al., 2000).

Pentylenetetrazol (PTZ) is a commonly-used proconvulsant, acting via the GABA_A receptor complex (Olson, 1981) and by altering the potassium permeability of the cell membrane via a voltage-dependent mechanism (Madeja et al., 1996). PTZ-induced generalized convulsions are associated with a significant increase in A₁ adenosine receptors (Pagonopoulou et al., 1993) and these changes precede or coincide with an increase in PTZ-seizure latency (Angelatou et al., 1990).

Biochemical studies have established that adenine nucleotides are thought to be an important potential source of extracellular adenosine (Dunwiddie et al., 1997; Cunha, 2001). Once released, these adenine nucleotides are metabolized and rapidly converted to adenosine through the action of ecto-enzymes

(Zimmermann, 1996; Bonan et al., 1998). It has been demonstrated that the neurotransmitter, ATP, in the central nervous system, is hydrolyzed to adenosine by the conjugated action of ectonucleotidases, which includes an ATP diphosphohydrolase and a 5'-nucleotidase (Battastini et al., 1991; Bonan et al., 1998). ATP diphosphohydrolases or apyrases (EC 3.6.1.5) are enzymes that act on both ATP and ADP, splitting off two and one phosphate groups, respectively. The AMP formed is then metabolized to adenosine by the action of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (Zimmermann, 1996).

The 5'-nucleotide phosphodiesterase (PDEase, NPPase, EC 3.1.4.1) is a microsomal enzyme that releases mononucleoside-5'-monophosphate from the 3'-OH terminal of the nucleotides. *p*-Nitrophenyl-5'-thymidine-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) has been used as an artificial substrate for 5'-nucleotide phosphodiesterase, generating *p*-nitrophenol. These enzymes are known to hydrolyze not only ATP and ADP but also UDP-galactose, NAD, DNA and RNA (Sakura et al., 1998).

Although it is well established that the breakdown of ATP is mediated by the membrane-bound ectonucleotidases, recent studies indicate that soluble nucleotidases, probably released from sympathetic nerves, were also involved in ATP breakdown to adenosine (Todorov et al., 1997; Yegutkin et al., 2000). The release of specific nucleotidases may represent a novel mechanism for terminating the actions of the neurotransmitter ATP. Considering that soluble nucleotidases can act together with ectonucleotidases to produce adenosine and that this last structure plays an important role in the modulation of seizures, we investigated the effect of acute seizures induced by pentylenetetrazol on the soluble enzymes that could be acting in ATP, ADP and AMP hydrolysis to adenosine in rat blood serum.

2. Material and Methods

2.1. *Pentylenetetrazol treatment*

Female Wistar rats, 60-90 days old and weighing 150-250 g, were used. The used methodology has been previously described (Walz et al., 1999). In summary, animals received a single convulsive injection of PTZ (60 mg/kg, i.p., dissolved in 0.9% saline). Control animals were injected with the same volume of saline. The animals were sacrificed by decapitation either 5 and 30 minutes, 1, 5, 12, 24 or 48 hours after the injection of PTZ

or saline. A generalized seizure occurs between up to 85 seconds after PTZ injection in all of the studied animals.

2.2. Isolation of blood serum fraction

Blood was drawn after the decapitation of female Wistar rats (approximately 60 days old). Blood samples were centrifuged in plastic tubes for 5 minutes at 5000 x g at 20°C before freezing serum at 0°C. Serum was used immediately in experiments.

2.3. Measurement of ATP and ADP hydrolysis

ATP and ADP hydrolysis was determined using a modification of the method described by Yegutkin, 1997. The reaction mixture containing ADP or ATP as a substrate, in 112.5 mM TRIS-HCl, pH 8.0, was incubated with 1.0 mg to 1.5 mg serum protein at 37°C in a final volume of 0.2 mL. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL 10% TCA. Incubation times and protein concentration were chosen to ensure the linearity of the reaction (results not shown) and absorbance was measured at 630 nm. Inorganic phosphate (Pi) released was determined as previously described by Chan et al (1986). Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis were performed by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. All samples were assayed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomoles of Pi released per minute per milligram of protein.

2.4. Measurement of AMP hydrolysis

The reaction mixture containing AMP as a substrate in 100 mM TRIS-HCl, pH 7.5, was incubated with 1.0 mg to 1.5 mg protein serum at 37°C in a final volume of 0.2 mL. Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis were performed by adding the serum after

the reaction was stopped with TCA. All samples were assayed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomoles of Pi released per minute per milligram of protein. All others procedures were the same as for ATP and ADP hydrolysis, as described above.

2.5. Measurement of *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis

p-nitrophenil-5'-thymidine-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) hydrolysis was determined essentially as described by Sakura *et al.*, 1996. The reaction mixture containing *p*-Nph-5'-TMP as a substrate in 100 mM TRIS-HCL, pH 8.9, was incubated with 1.0 mg to 1.5 mg serum protein at 37°C for 8 minutes in a final volume of 0.2 mL. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL NaOH 0.2 N. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the reaction (results not shown). The amount of *p*-nitrophenol was measured at 400 nm. Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis were performed by adding the serum after the reaction was stopped with NaOH. All samples were assayed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomoles (nmol) of *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein.

2.6. Lactate dehydrogenase (LDH) activity

The LDH activity was determined in the serum of PTZ-treated animals and control animals using a commercial kit (Kinetic Method Labtest Diagnóstica, MG-Brasil). The absorbance was measured at 340 nm.

2.7. Protein determination

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

2.8. Statistical analysis

The data obtained are expressed as means \pm S.D of at least four animals. The results were analyzed statistically by Student's t-test. A *p* value of less than 0.05 was considered to represent a significant difference.

3. Results

In order to evaluate the effect of acute seizures induced by PTZ on the ATPase and ADPase activities, ATP and ADP hydrolysis was measured in the blood serum of rats sacrificed at different times after the PTZ injection. There was a significant increase of 51% in ATP hydrolysis (Fig. 1A) and 50% in ADP hydrolysis (Fig. 1B) at 5 minutes after the PTZ-treatment. At 30 minutes after PTZ-treatment, ATP and ADP hydrolysis increased by 50% and 56%, respectively, in relation to controls (Fig 1A and 1B). Serum ATPase and ADPase activities of rats killed 1 hour after the PTZ injection, significantly increased (44% and 45%, respectively) in relation to control animals. In addition, 5 hours after the PTZ injection, the enzyme activity was increased by 54% for ATP (Fig. 1A) and by 56% for ADP (Fig. 1B) when compared to control animals. This increase reached maximum activation (69% and 70% for ATP and ADP hydrolysis, respectively) 12 hours after the treatment with PTZ, but the specific activity values of the enzyme decreased in relation to the other times tested. This decrease in enzyme activity was also observed 24 hours after PTZ injection, but the ATP and ADP hydrolysis remained significantly increased (55% and 54%, respectively) in relation to the control (Fig 1A and 1B). At 48 hours after PTZ-treatment, no significant difference was observed in ATP and ADP hydrolysis when compared to controls (Fig 1A and 1B). Considering that the observed changes in ATPase and ADPase activities could be attributed to the effect of the drug itself rather than to the acute seizures, experiments to evaluate the effect of the drug on the nucleotide hydrolysis were performed *in vitro* using increasing concentrations of PTZ (in the range of 0.05mM - 20mM). Results did not showed any statistically significant alterations in the ATP and ADP hydrolysis, *in vitro*, in the presence of PTZ,

suggesting strongly that the increase in the nucleotides hydrolysis was induced by seizures and not by the drug itself (Fig. 2). It is important to note the parallel effect on ATP and ADP hydrolysis.

The results regarding the 5'-nucleotidase showed a similar profile when compared to ATP and ADP hydrolysis. Significant increases in 5'-nucleotidase activity were observed, when compared to the respective control group, at 5 minutes (33%), 30 minutes (48%), 60 minutes (50%), 12 hours (45%) and 24 hours (44%) after the acute seizures induced by PTZ injection (Fig. 3). However, at 48 hours after PTZ-treatment, no significant difference was observed in AMP hydrolysis when compared to the control group (Fig. 3). Then the AMP hydrolysis in this model changes exactly as the ATP and ADP hydrolysis.

Considering that a phosphodiesterase enzyme is expressed in blood serum (Sakura et al, 1997) and also can act in ATP and ADP hydrolysis, we evaluated the activity of this enzyme in the serum of rats treated with PTZ or saline using *p*-Nph-5'-TMP, an artificial substrate (marker for the phosphodiesterase activity).

Fig. 4 demonstrates that there is a phosphodiesterase activity in the rat blood serum, but that this activity is not significantly changed in PTZ-treated rats when compared to control rats at any time tested.

In order to investigate the role of the PTZ treatment in cellular disruption we measured the activity of the cytosolic enzyme, lactate dehydrogenase (LDH), a marker of tissue damage, in rat blood serum. There were no significant differences in LDH activity in the serum of PTZ-treated rats when compared to control rats (data not shown). These results indicate that the increase in nucleotide hydrolysis can not be attributed to cellular breakdown.

4. Discussion

Previous studies have shown an increase in adenosine release and metabolism during pre-seizure and seizure activity induced by the administration of the proconvulsants, such as pentylenetetrazol (Berman et al., 2000). Adenosine and the adenosine A₁ receptor agonist demonstrate significant protection against acute PTZ-induced seizures (Malhotra and Gupta, 1997). Moreover, reduction of extracellular adenosine formation by an injection of an ecto-5'-nucleotidase inhibitor, produce generalized seizures (Zhang et al., 1992). In addition, single and repeated pentylenetetrazol-induced convulsions are associated with significant increases in A₁ adenosine receptors in different brain areas (Angelatou et al., 1990) and this upregulation of A₁ adenosine receptors was observed within 1 hour following seizures (Pagonopoulou and Angelatou, 1998), 24

hours after seizures (Pagonopoulou et al., 1993) and remained for at least 14 days after the PTZ-induced seizures (Angelatou et al., 1990). Additionally, stroke and transient ischemic attacks are associated with a rapid increase in circulating plasma adenosine concentration in man, detectable in the peripheral vein up to 15 days after the acute event (Pasini et al., 2000). Taken together, the protector effect of adenosine, the effect of A_1 adenosine receptor agonist and the convulsant action of an ecto-5'-nucleotidase inhibitor, further support the role of endogenous adenosine as a neuroprotective and anticonvulsant structure. Thus, it is important to consider the pathway involved in the extracellular adenosine production.

Recently, we demonstrated an increase in ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes of the hippocampus and cerebral cortex of rats at different periods after status epilepticus induced in two different animal models of epilepsy (Bonan et al., 2000). Therefore, we investigated the effect of acute seizures, induced by pentylene-tetrazol, on the enzymes that could be acting in ATP, ADP and AMP hydrolysis to adenosine in rat blood serum, at different times after the induction of seizures.

The present study demonstrates a significant increase in ATP, ADP (Fig. 1A and 1B) and AMP (Fig. 3) hydrolysis by serum of rats and these results suggest an effect promoted by the seizures, since that in vitro there were not significant changes on ATP and ADP hydrolysis in the presence of PTZ (Fig. 2). However, the phosphodiesterase activity (evaluated using a substrate marker for this enzyme), which could also be acting in ATP and ADP hydrolysis in rat blood serum, did not present any statistically significant increase when compared treated animals with control animals (Fig. 4). As we had a parallel increase in ATP and ADP hydrolysis and an increase in AMP hydrolysis but we did not have changes in the substrate marker for the phosphodiesterase, these results provide strong evidence for the involvement of an ATP diphosphohydrolase and a 5'-nucleotidase in adenosine production in rat blood serum and it is tentative to speculate about the importance of these enzymes in the modulation of seizures induced by the acute administration of pentylene-tetrazol.

Furthermore, it was demonstrated that experimental seizures raise cerebral levels of adenosine within seconds following the onset of seizures (Winn et al., 1979). In this study, we observed an increase in nucleotide hydrolysis within 5 minutes of the administration of PTZ. Moreover, soon after the treatment with PTZ, the numeric values of ATPase and ADPase activities were higher in relation to the other times tested, although the ATP and ADP hydrolysis remained significantly increased in relation to the control (Fig 1A and

1B). These increased values of enzyme activity soon after PTZ-injection, may be attributed to the effect of stress caused by injection and manipulation of animals, since soluble nucleotidases are released during shear stress (Yegutkin et al., 2000).

Since our results were obtained in rat blood serum, it is important consider that upon electrical stimulation, the sympathetic nerve releases not only ATP, but also soluble enzymes that can act in conjunction with membrane ectonucleotidases in the breakdown of ATP to adenosine (Todorov et al., 1997). Furthermore, CD39, the first human gene reported to encode a protein with ecto-ATP diphosphohydrolase activity (Maliszewski et al., 1994) is expressed in macrophages, suggesting that this protein is present in the circulation (Mulero et al., 1999).

In summary, the results reported here show that acute seizures induced by pentylenetetrazol elicit a significant increase in serum ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities, probably contributing to the increase in the levels of adenosine and consequently in the modulation of seizure activity and in neuroplasticity related events. Possible anticonvulsant effects of drugs acting on the serum and central nervous system nucleotidases are important points to be investigated in the future.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), Programas de Núcleos de Excelência (PRONEX-Brazil) and Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil).

References

- Ault, B. and Wang, C.M., 1986. Adenosine inhibits epileptiform activity arising in hippocampal area CA3. *Br. J. Pharmac.* 87. 695-703.
- Angelatou, F., Pagonopoulou, O. and Kostopoulos, G., 1990. Alterations of A1 adenosine receptors in different mouse brain areas after pentylenetetrazol- induced seizures , but not in epileptic mutant mouse “tottering”. *Brain Res.* 554. 251- 256.

- Angelatou, F., Pagonopoulou, O. and Kostopoulos, G., 1991. Changes in seizure latency correlate with alterations in A1 adenosine receptor binding during daily repeated pentylenetetrazol- induced convulsions in different mouse brain areas. *Neurosci.Lett.* 132. 203-206.
- Battastini, A.M.O., Rocha, J.B.T., Barcellos, C.K., Dias, R.D. and Sarkis, J.J.F., 1991. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats, *Neurochem. Res.* 16 1303-1310.
- Berman, R. F., Fredholm, B. B., Aden, U., Connor, W. T. O., 2000. Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Res.* 872. 44 - 53.
- Bonan, C.D., Dias, M.M., Oliveira, A.M.O., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F., 1998. Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidases activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. *Neurochem. Res.* 23. 979 - 984.
- Bonan, C. D., Walz, R., Pereira, G.S., Worm, P.V., Battastini, A.M.O. Cavalheiro, E. A., Izquierdo, I., Sarkis, J.J.F., 2000. Changes in synaptosomal ectonucleotidases activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 39. 229 - 238.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. 218 – 254.
- Chan, K., Delfer, T.D, Junger K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157. 375 - 80.
- Cunha, R.A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38. 107– 125.
- Dragunow, M., 1988. Purinergic mechanisms in epilepsy. *Prog. Neurobiol.*31. 85 - 108.
- Dunwiddie, T.W., Diao, L., Proctor, W.R., 1997. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. neurosci.* 17. 7673 - 7682.
- During, M.J and Spencer, D.D., 1992. Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol.* 32 (5). 618 – 624.

- Kostopoulos, G., 1988. Adenosine: a molecule for synaptic homeostasis? Evolution of current concepts on the physiological and pathological roles of adenosine. In M. Avoli, B Dykes, P. Gloor, and T. Reader (Eds), *Neurotransmitters and Cortical Function. From Molecules to Mind*, Plenum Press, USA, 415 - 435.
- Madeja, M., Musshoff, U., Lorra, C., Pongs, O., Speckmann, E.J., 1996. Mechanism of action of epileptogenic drug pentylenetetrazol on a cloned neuronal potassium channel, *Brain Res.* 722. 59 - 70.
- Malhotra, J. & Gupta, Y.K., 1997. Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole- induced seizures in rats. *Br. J. Pharmacol.* 120. 282 - 288.
- Maliszewski, C.D., Delespesse, G.J.T., Shoenborn, M.A., Armitage, R.J., Franslow, W.C., Nakakima, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Poidexter, K., Birks, C., Al'pert, A, Friend, D, Gimpel, S.D., Gayle, R.B., 1994. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* 149. 3574 - 3583.
- Mulero, J.J., Yeung, G., Nelken, S.T. and Ford, J.E., 1999. CD39-L4 is a secreted human Apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J. Biol. Chem.* 274. 20064 - 20067.
- Olson, R.T., 1981. The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. Site of action convulsant and anticonvulsant drugs. *Mol. Cell. Biochem.* 39. 261 - 279.
- Pagonopoulou, O.F., Angeletou, F. and Hostopoulos, G., 1993. Effect of Pentylenetetrazol- induced seizures on A1 adenosine receptor regional density in the mouse brain: A quantitative autoradiographic study. *Neuroscience.* 56.711 - 716.
- Pagonopoulou, O., Angelatou, F. 1998. Time development and regional distribution of [3H] Nitrobenzylthioinosine adenosine uptake sites binding in the mouse brain after acute pentylenetetrazole- induced seizures. *J. Neurosci. Res.* 53. 433 - 442.
- Pasini, F.L., Guideri, F., Picano, E., Parenti, G., Petensen, C., Varga, A. and Perri, T., 2000. Increase in plasma adenosine during brain ischemia in man: A study during transient ischemic attacks and stroke. *Brain Res. Bull.* 51. 327 - 330.

- Phillips, J.W. and Wu, P.H., 1981. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. in Neurobiol.* 16. 187 – 239.
- Sakura, H., Nagashima S., Nakashima, A., Maeda, M., 1998. Characterization of fetal serum 5'- nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thromb. Res.* 91. 83 - 89.
- Sarkis, J.J.F. and Salto, C., 1991. Characterization of synaptosomal ATP diphosphohidrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26. 871– 876.
- Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, T.D., Sneddon, P., Kennedy, C., Bjur, R.A. & Westfall, D.P. 1997. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387. 76- 79.
- Yegutkin, G., 1997. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochem* 62. 724 – 728.
- Yegutkin, G., Bodin, P. and Burnstock, G., 2000. Effect of shear stress on the soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 129. 921 - 926.
- Walz, R., Roesler R., Amaral, O.B, Rockenbach, I, Cavaleiro, E.A, Martins, V, Izquierdo, I., Brentani, R.R. Higher sensitivity to seizures in knockout PrPc mice. *Epilepsia* 1999; 40: 1679-1682.
- Winn, H. R., Welsii, J. E., Bryner, C., Rubio, R. and Berne, R. M., 1979. Brain adenosine production during the initial 60 seconds of bicuculline seizures in rats. *Acta neurol. scand.* 60. 536 - 537.
- Zhang, G., Franklin, P. H. and Murray, T. F., 1992. Manipulation of Endogenous Adenosine in rat Prepiriform Cortex Modulates Seizure Susceptibility. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 264. 1415 - 1424.
- Zimmermann, H., 1996. Biochemistry, localization and functional role of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49. 589 - 618.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1: Effects of seizures induced by acute administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in rat blood serum at different times after the induction of seizures. Bars represent means \pm S.D. of at least four animals. *PTZ-treated group significantly different from control group ($P < 0.05$, Student's t-test).

Fig. 2: Effect of increasing concentrations of PTZ (0.05mM – 20mM) on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in rat blood serum, *in vitro*. Bars represent means \pm S.D. of at least four experiments.

Fig. 3: Effects of seizures induced by acute administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) on 5'-nucleotidase activity from rat blood serum at different times after the induction of seizures. Bars represent means \pm S.D. of at least four animals. *AMP hydrolysis in treated-group significantly different from control group. ($P < 0.05$, Student's t-test).

Fig. 4: Effects of seizures induced by acute administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) on phosphodiesterase activity in rat blood serum at different times after the induction of seizures. Bars represent means \pm S.D. of at least four animals.

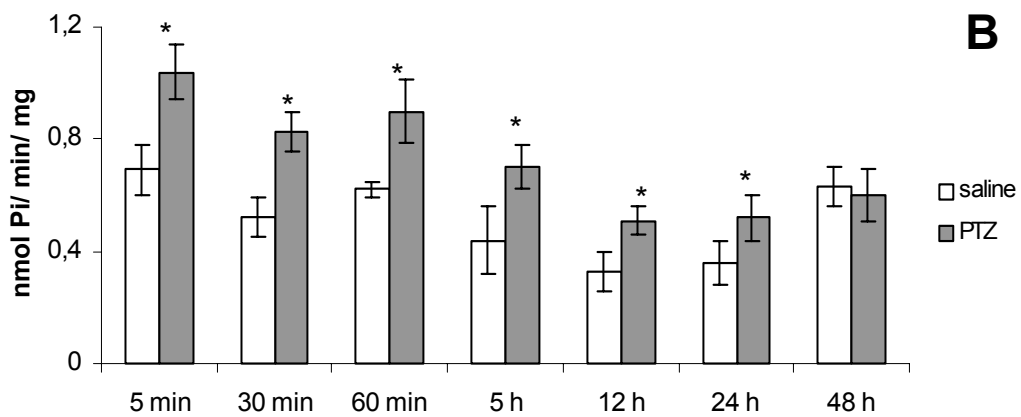
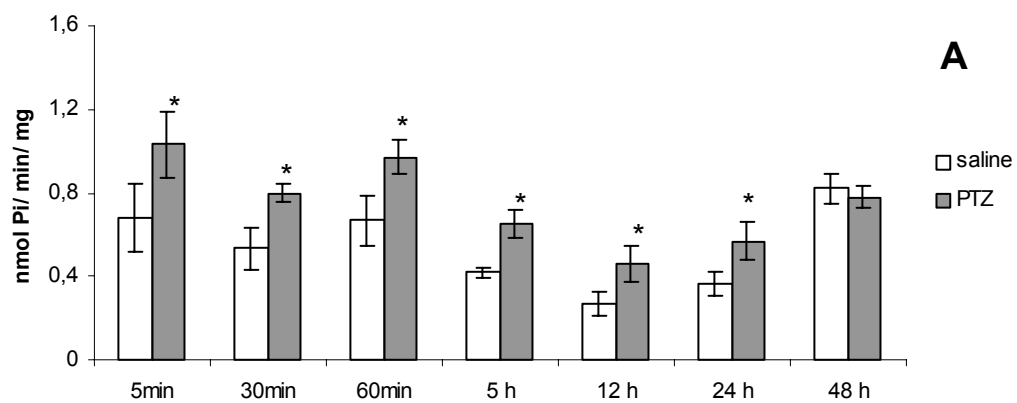


Figure 1 (Figura 1.1)

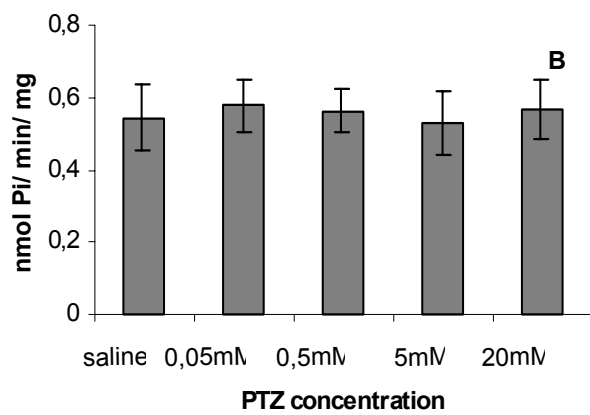
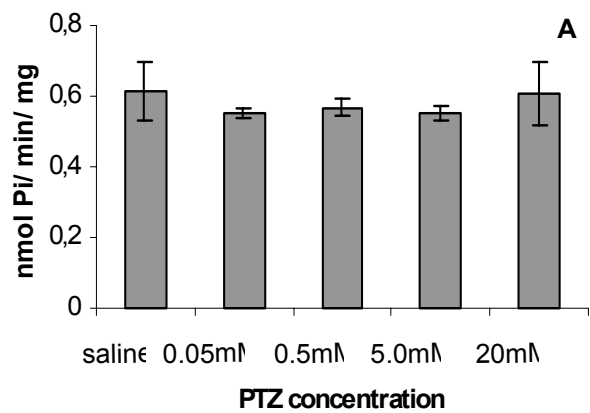


Figure 2 (Figura 1.2)

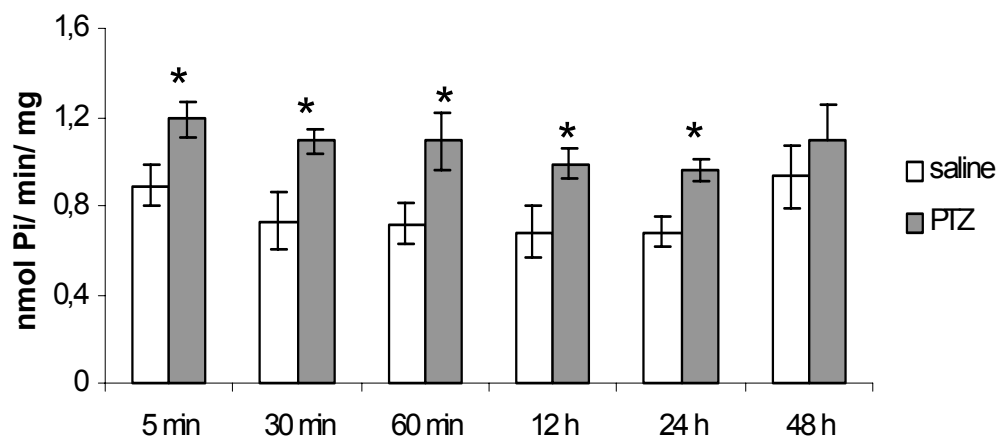


Figure 3 (Figura 1.3)

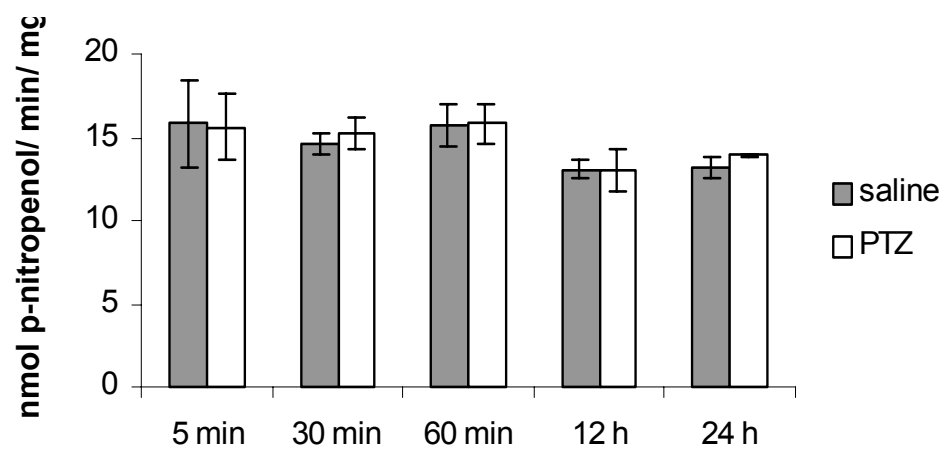


Figure 4 (Figura 1.4)

III. CAPÍTULO 2 – BRUNO, A.N., OSES, J.P., AMARAL, O., COITINHO, A.,
BONAN, C.D., WALZ, R., BATTASTINI, A.M.O. & AND SARKIS,
J.J.F. Changes in Nucleotide Hydrolysis Induced by Pentylentetrazol-
Kindling in Rat Blood Serum

Artigo a ser submetido na revista Epilepsy Research

**CHANGES IN NUCLEOTIDE HYDROLYSIS INDUCED BY PENTYLENETETRAZOL-KINDLING
IN RAT BLOOD SERUM**

Alessandra Nejar Bruno¹, Jean Pierre Oses¹, Olavo Amaral¹, Adriana Coitinho¹, Roger Walz³, Carla Denise Bonan², Ana Maria Oliveira Battastini¹ and João José Freitas Sarkis^{1,*}.

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

²Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

³ Centro de Cirurgia de Epilepsia, CIREP, Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

*Corresponding Author:

João José Freitas Sarkis,

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ramiro Barcellos, 2600 - ANEXO, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil.

FAX: +55 51 3316 5535 , PHONE: + 55 51 3316 5554

e-mail: jjsarkis@plug-in.com.br

Abstract

There is growing pharmacological evidence from several animal models of seizure disorders that adenosine possesses endogenous anticonvulsant activity. Apart from being released itself from cells, adenosine can be produced by the degradation of adenine nucleotides by ectoenzymes or soluble nucleotidases. These enzymes constitute an important mechanism in synaptic modulation, as they hydrolyze ATP, an excitatory neurotransmitter, to adenosine, a neuroprotective compound. We recently demonstrated an increase in ectoenzyme activity in rat brain synaptosomes after pentylenetetrazol kindling in rats resistant to kindling, suggesting a role for ectonucleotidases in the seizure control. The present work investigates the effect of seizures induced by pentylenetetrazol kindling on the enzymes that could be acting in ATP, ADP and AMP hydrolysis to adenosine in rat blood serum. Animals received injections of PTZ (30 mg/kg, i.p., dissolved in 0,9% saline) once every 48 hours, totaling 10 stimulations and the controls animals were injected with saline. The hydrolysis of ATP, ADP and AMP were significantly increased (42%, 40% and 45%, respectively), while phosphodiesterase activity was unchanged. These results suggest once more that an increase in the ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities and, possibly, in adenosine levels, could represent an important compensatory mechanism in the development of chronic epilepsy. Moreover, the fact that this increase can also be measured in serum could mean that these enzymes might be useful as plasma markers of seizures in epilepsy.

Key words: adenosine, epilepsy, kindling, ATP diphosphohydrolase, 5'-nucleotidase

Indroduction

Kindling is widely used as an experimental model of epilepsy and epileptogenesis. This phenomenon is characterized by progressive intensification of seizures activity after

repeated administration of subconvulsant doses of different CNS stimulants, including pentylenetetrazol (Mason and Cooper, 1972; Racine, 1972). Pentylenetetrazol (PTZ) is a commonly used proconvulsant, apparently acting via GABA_A receptor complex (Olson, 1981) as well as by altering potassium permeability of the cell membrane via a voltage-dependent mechanism (Madeja et al., 1996). Studies have shown that the mechanisms involved in PTZ kindling may include a decrease in central GABAergic function (Corda et al., 1992). The enhanced seizure susceptibility induced by kindling is due to long-lasting alterations in neuronal excitability, probably attributable to plastic changes in the synaptic efficacy (Cain, 1989).

ATP is currently recognized as an excitatory neurotransmitter in the central nervous system (Di Orio et al., 1998). Extracellular ATP is normally in low concentration, however, in pathological situations, ATP can be released in large quantities from platelets and endothelial and vascular tissues (Born and Kratzer, 1984; Bergfeld and Forrester, 1992). Despite its excitatory properties, ATP in the synaptic cleft can be hydrolyzed to adenosine, a neuroprotective and neuromodulatory agent, and the enzymes catalysing this conversion are thought to have a role in modulating and controlling excitatory synaptic transmission. (Todorov et al., 1997).

Adenosine, an endogenous purine nucleoside, is an important regulator of neuronal excitability in the central nervous system (Kostopoulos, 1988). Activation of presynaptic adenosine A₁ receptors reduces neurotransmitter release (Fredholm and Dunwiddie, 1988), depressing the neuronal activity in central nervous system (Phillips and Wu, 1981). Several studies have shown that the administration of adenosine and its derivatives protect from experimentally induced seizures *in vivo* (Dragunow, 1988; Malhotra and Gupta, 1997). Some studies indicate that the anticonvulsant response of adenosine is predominantly

mediated by changes in A1 receptors (Malhotra and Gupta, 1997), which are increased after PTZ-kindling (Mirnajafi-Zadeh et al., 2000).

Moreover, experimental seizures raise the cerebral levels of adenosine (Schrader et al., 1980; Berman et al., 2000), and many pathological situations are associated with a rapid increase in circulating plasma adenosine concentration in man (Pasini et al., 2000). Synaptic adenosine levels increase during periods of increased metabolic demand, such as those that exist during seizures (Brundege and Dunwiddie, 1997). Furthermore, an increase in hippocampal adenosine release before and during seizures has been demonstrated after administration of the proconvulsants, including pentylenetetrazol (Berman et al., 2000).

Adenosine is mainly produced from the hydrolysis of adenine nucleotides by an extracellular chain of ectonucleotidases (Dunwiddie et al., 1997; Zimmermann, 1996). This chain of enzymes includes ecto-ATPases (NTPDase2, CD39L1, EC 3.6.1.3), ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5), ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) and 5'-nucleotide phosphodiesterase (PDEase, PC-1, EC 3.1.4.1). We have demonstrated in central and peripheral nervous system, that ATP is hydrolyzed to adenosine by the conjugated action of an ATP diphosphohydrolase (NTPDase1, CD39, ecto-apyrase, EC 3.6.1.5.) and a 5'-nucleotidase (lymphocyte surface protein, CD73, EC 3.1.3.5.) (Sarkis and Saltó, 1991; Battastini et al., 1995).

ATP diphosphohydrolases are enzymes that hydrolyze all purine and pyrimidine nucleoside 5'-di and triphosphates. These enzymes hydrolyze ATP and ADP almost equally well, splitting off two and one phosphate groups of these nucleotides, respectively. Ecto-5'nucleotidase plays an important role in the formation of adenosine from extracellular AMP (Zimmermann, 1996; Cunha et al., 1992). The 5'-nucleotide phosphodiesterases or PDEases, are members of the PDNP family capable of hydrolyze ATP and ADP as well as UDP-galactose, NAD, DNA and RNA. (Sakura et al., 1998). *p*-Nitrophenil-5'-thymidine-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) has been used as an artificial substrate marker to 5'-nucleotide phosphodiesterase generating *p*-nitrophenol.

Additionally, soluble nucleotidases are also involved in the breakdown of ATP to adenosine (Todorov et al., 1997). The stimulation of vascular endothelial cells induces a concomitant release of endogenous ATP and soluble enzymes that degrade both ATP and AMP (Yegutkin et al., 2000).

There is evidence to suggest a participation of ectoenzymes in the modulatory processes occurring in chronic epilepsy. The activity of 5'-nucleotidase can vary substantially with lesions of nervous tissue (Zimmermann., 1996), and its presence was demonstrated in mossy fibers that sprout after seizures in epileptic rats (Shoen et al., 1999), which could act in the neuromodulation of excitatory activity by producing adenosine. Besides, the co-localization of the genes for human ATP diphosphohydrolase /CD39 (10q 23.1-24.1) and for the susceptibility to partial epilepsy (10q 22-24) suggests that a mutation of the ecto-apyrase gene might exert a significant role in the epilepsy (Maliszewski et al., 1994; Ottman et al., 1995)..

We have recently demonstrated that acute seizures induced by pentylenetetrazol elicit a significant increase in ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in rat blood serum lasting up to 48 hours after the seizure (manuscript submitted, 2001). These changes in activity are quickly measurable in serum even though their activity in rat brain synaptosomes was observed to be normal in previous studies (Bonan et al., 2000). This same study demonstrated, however, that a subgroup of seizure-resistant rats presented an increase in hippocampal and cortical ectonucleotidase activity after PTZ-kindling. Therefore, we decided to investigate if the same pattern of change holds true for plasmatic enzyme activities, by measuring the effect of PTZ-kindling on the enzymes that could be acting in ATP, ADP and AMP hydrolysis in rat blood serum.

Material and Methods

Pentylentetrazol (PTZ) kindling

Female Wistar rats (60 days old, weighing 150-250 g) were used. Animals received injections of PTZ (35 mg/kg, i.p., dissolved in 0.9% saline) once every 48 hours, totaling 10 stimulations. After each PTZ injections the animals were observed for 30 minutes and seizures were classified according to the stages proposed by Racine (Racine, 1972). stage 0, no response; 1, facial clonus; 2, head nodding; 3, forelimb clonus; 4, rearing with bilateral forelimb clonus; 5, rearing and falling with bilateral forelimb clonus. Meanwhile, control animals were injected with saline (10 injections as in the treated group). All the injections were performed during daytime, between 11 a.m. and 2 p.m. The animals were killed by decapitation 48 hours after the last injection, a time at which the increase in ectonucleotidase activity seen after acute seizures was previously found to have disappeared, with levels of the enzymes returning to normal. Therefore, effects seen 48 hours after kindling would likely be due to chronic changes in the brain induced by this process. Only animals showing tonic-clonic seizures were included in the study.

Isolation of blood serum fraction

Blood was drawn after the decapitation of female Wistar rats (approximately 60 days old). Blood samples were centrifuged in plastic tubes for 5 minutes at 5000 x g at 20°C before freezing serum at 0°C. Serum was used immediately in experiments.

Measurement of ATP and ADP hydrolysis

ATP and ADP hydrolysis was determined using a modification of the method described by Yegutkin, 1997. The reaction mixture containing ADP or ATP as a substrate, in 112.5 mM TRIS-HCl, pH 8.0, was incubated with 1.0 mg to 1.5 mg serum protein at 37°C in a final volume of 0.2 mL. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL 10% TCA. Incubation times and protein concentration were chosen to ensure the linearity of the reaction (results not shown) and absorbance was measured at 630 nm. Inorganic phosphate

(Pi) released was determined as previously described by Chan et al (1986). Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis were performed by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. All samples were assayed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomoles of Pi released per minute per milligram of protein.

Measurement of AMP hydrolysis

The reaction mixture containing AMP as a substrate in 100 mM TRIS-HCl, pH 7.5, was incubated with 1.0 mg to 1.5 mg protein serum at 37°C in a final volume of 0.2 mL. Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis were performed by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. All samples were assayed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomoles of Pi released per minute per milligram of protein. All others procedures were the same as for ATP and ADP hydrolysis, as described above.

Measurement of p-Nph-5'-TMP hydrolysis

p-nitrophenil-5'-thymidine-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) hydrolysis was determined essentially as described by Sakura *et al.*, 1996. The reaction mixture containing *p*-Nph-5'-TMP as a substrate in 100 mM TRIS-HCL, pH 8.9, was incubated with 1.0 mg to 1.5 mg serum protein at 37°C for 8 minutes in a final volume of 0.2 mL. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL NaOH 0.2 N. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the reaction (results not shown). The amount of *p*-nitrophenol was measured at 400 nm. Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis were performed by adding the serum after the reaction was stopped with NaOH.

All samples were assayed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomoles (nmol) of *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity

The LDH activity was determined in the serum of PTZ-treated animals and control animals using a commercial kit (Kinetic Method Labtest Diagnóstica, MG-Brasil). The absorbance was measured at 340 nm.

Protein determination

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

Statistical analysis

The data obtained are expressed as means \pm standard deviation of at least five animals. The results were analyzed statistically by Student's *t* test. A *p* value of less than 0.05 was considered to represent a significant difference.

Results

As expected, PTZ-kindling produced a progressive increase in the seizure susceptibility of the treated. 48 hours after the last injections. Enzyme assays demonstrated an increase of approximately 42% in ATP hydrolysis in kindled rats when compared to control rats (Fig.1). The results obtained with ADP hydrolysis showed a similar profile, with an increase of 40% in treated rats in relation to controls animals (Fig.1). We also observed an increase of 45% in AMP hydrolysis, indicating a probable increase in 5'-nucleotidase activity (Fig.1).

Considering that the enzyme phosphodiesterase is also expressed in blood serum (Sakura et al, 1997) and can also act in ATP and ADP hydrolysis, we also measured phosphodiesterase activity through our experimental model. Our results confirmed that there was a phosphodiesterase activity in rat blood serum, but no significant difference was observed in kindled rats when compared to control rats (Fig.2). Therefore, the increase in ATP and ADP hydrolysis can not to be related to a phosphodiesterase activity.

In order to analyze if kindling was causing significant cellular disruption which could theoretically cause an increase in nucleotidases present in serum, we measured the activity of the cytosolic enzyme lactate dehydrogenase (LDH), a marker for tissue damage, in rat blood serum. However, there were no significant changes in the LDH activity observed in PTZ-treated rats and control rats (data not shown), indicating that the increase in nucleotide hydrolysis are not likely to be due to cellular breakdown.

Discussion

Our results show that PTZ-kindling induces an increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis lasting for at least 48 hours in the rat brain. Since these changes were not found 48 hours after acute seizures induced by the same drug (submitted, 2001), it is reasonable to consider the changes we observed as being probably to the chronic changes in synaptic excitability induced by kindling.

These results are in agreement with the evidence that adenosine can play a role in modulation of brain activity in epilepsy, by reducing neurotransmitter release (Fredholm and Dunwiddie, 1988) and depressing the neuronal activity in central nervous system (Phillips and Wu, 1981). We have recently demonstrated an increase in ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex in the pilocarpine and kainic acid models of epilepsy in rats, both of which

are characterized by chronic spontaneous seizures (Bonan et al., 2000a). PTZ kindling seems to produce the same effect in selected animals, and high enzymatic activity could correlate with resistance to kindling, although no alteration was found after acute seizures (Bonan et al., 2000b).

When measured in serum, the enzymes ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase were shown to be increased as soon as 30 minutes after acute seizures induced by a convulsive dose of PTZ (submitted, 2001). However, the new data we are presenting show that the chronic administration of the drug, which is known to produce long-lasting changes due to neuroplasticity processes can induce changes in these enzymes which last longer than those happening after a single acute seizure. This is in agreement with the data showing that these same enzymes are more active in the brain in various models of chronic epilepsy.

The origin of the elevated plasmatic activity of the enzymes is uncertain. It has been demonstrated that soluble nucleotidases are released in the blood stream upon electrical stimulation (Kennedy et al., 1997) and under conditions of shear stress stimulation of vascular endothelial cells (Yegutkin et al., 2000). These cells release endogenous ATP (Yegutkin et al., 2000), as do platelets and vascular smooth muscle cells and pathological conditions (Gordon, 1986). Since this massive release of ATP could cause significant cellular damage (Edwards et al., 1992) and death (Harada et al., 2000), the concomitant release of enzymes appears to be an important protective mechanism.

Since seizures affect various systems and functions in the body, we cannot say for sure what is the origin of the observed increase in plasmatic enzymes. It is tempting to view these changes are due to altered processes in the rat brain, but hemodynamic changes, changes in body temperature and the shear muscular stress of a tonic-clonic seizure could

conceivably give rise to processes resulting in altered enzyme activity, especially acutely. On the other hand, the fact that the enzymes were found to be increased after 48 hours had passed from the last seizure, a point in time in which enzyme activity was shown to have returned to normal after a single acute seizure (submitted, 2001) makes it somewhat more likely that their origin is indeed in the chronic brain alterations produced by kindling.

The fact that the enzymatic changes initially observed in the brain also happen in the plasmatic activity of nucleotidases is not important only from a pathophysiological point of view. The diagnosis of seizures in clinical practice frequently presents as a problem, as most seizures are not witnessed by a physician and many neurologic and systemic conditions, such as migraine and syncope, can sometimes be confused with seizures. Moreover, some patients can present with psychogenic events known as “pseudoseizures” which can be virtually identical to real epileptic events. Therefore, potential plasmatic markers of both acute seizures and chronic epilepsy could be of great diagnostic importance in clinical practice. However, the search for consistent ones has been largely unsuccessful up to. Much more work has to be performed, of course, to say if the measurement of nucleotidases in plasma could eventually be useful in this kind of situation.

In summary, our results show an increase of the enzymatic activities measured in the serum of rats submitted to PTZ-kindling, complementing the data already showing shorter-lasting increases after acute seizures (submitted, 2001). These studies, along with those showing these same kind of changes in brain tissue (Bonan 2000*a*, 2000*b*), confirm the data suggesting a role for adenosine and nucleotidases in modulatory processes occurring in response to epilepsy. More studies also have to be done to verify if these changes hold true in other seizure models, as well as to determine the exact origin of the rise in enzyme activities both in acute seizures and in chronic epilepsy.

References

- Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Moreira, C.M., Bonan, C.D., Sarkis, J.J.F., Dias, R.D., 1995. Solubilização and characterization of a ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37, 209 - 219.
- Berman, R. F., Fredholm, B. B., Aden, U., Connor, W. T. O., 2000. Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Research.* 872: 44 - 53.
- Bergfeld, G. R and Forrester, T., 1992. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cariiovasc. Res.* 26:40-47.
- Bonan, C. D., Walz, R., Pereira, G.S., Worm, P.V., Battastini, A.M.O. Cavalheiro, E. A., Izquierdo, I., Sarkis, J.J.F., (2000*a*) Changes in synaptosomal ectonucleotidases activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 39: 229-238.
- Bonan, C. D., Amaral O.B., Rockenbach I.C.; Walz, R., Battastini A.M.O., Izquierdo, I. and Sarkis, J.J.F., (2000*b*) Altered ATP hydrolysis Induced by Pentyletetrazol Kindling in rat Brain Synaptosomes. *Neurochem. Res.* 27 (6) 775 - 779.
- Born, G.V and Kratzer, M.A., 1984 Source and concentration of extracelular adenosine triphospahte during haemostasis in rats, rabbits and man. *J. Physiol.* 354: 419 - 429.

- Brundege, J.M. and Dunwiddie, T.V., 1997. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Ad. Pharmacol.* 39: 353-91.
- Cain, D.P., 1989. Long-term potentiation and kindling: how similar are the mechanisms. *Trens. Neurosci.* 12: 6 – 10.
- Cordeiro, M.C., Orlandi, M., Lecca, D., Glordi, O., 1992 Decrease in GABA-ergic function induced by pentyletetrazol kindling in rats. Antagonism by MK-801. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 792 -800.
- Cunha, R.A., Sebastião, A. M. and Ribeiro, J.A., 1992. Ecto-5'-nucleotidase is associated with cholinergic nerve in the cerebral cortex of the rat. *J. Neurochem.* 59: 657-666.
- Dragunow, M., 1988. Purinergic mechanisms in epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 31: 85-108.
- Di Iorio, P., Ballerini, P., Caciagli, F., Cicarelli, R., 1998. Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacol. Res.* 37: 169-178.
- Dunwiddie, T.V., Diao, L., Proctor, W.R., 1997. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. neurosci.* 17: 7673-7682.

- Edwards, F.A., Gibb, A.J. and Colquhoun, D., 1992. ATP receptor –mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, 359: 144 – 147.
- Fredholm, B.B., and Dunwiddie, T.V., 1988. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends. Pharmacol. Sci.* 9: 130- 134.
- Gordon, J.L., 1986. Extracellular ATP: Effects, sources and fate. *J. Biochem.* 233: 309 – 319.
- Harada, H., Chan, C.M., Loesch, A., Unwin, R. and Burnstock, G., 2000. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 57: 949 - 958.
- Kennedy, C., Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S. and Sneddon, P., 1997. Release of soluble nucleotidases: a novel mechanism for neurotransmitter inactivation? *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 263 - 266.
- Kostopoulos, G., 1988. Adenosine: a molecule for synaptic homeostasis? Evolution of current concepts on the physiological and pathological roles of adenosine. In M. Avoli, B Dykes, P. Gloor, and T. Reader (Eds), *Neurotransmitters and Cortical Function. From Molecules to Mind*, Plenum Press, USA, 415-435.
- Malhotra, J. & Gupta, Y.K., 1997. Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole- induced seizures in rats. *Br. J. Pharmacol.* 120: 282 - 288.

Maliszewski, C.D., Delespesse, G.J.T., Shoenborn, M.A., Armitage, R.J., Franslow, W.C., Nakakima, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Poindexter, K., Birks, C., Alpert, A., Friend, D., Gimpel, S.D., Gayle, R.B., 1994. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* 149, 3574-3583.

Mason, C.R., and Cooper, R.M., 1972. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain damaged rats, with repeated small doses of pentylenetetrazol. *Epilepsia* 3: 663-674.

Meldrum, B. & Chapman, A. 1998. Epileptic seizures and epilepsy. IN: *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects* eds. G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Alberts, K. Fischer, M.D. Uhler, pp 755 - 768, 6^a edição. Lippincott-Raven Publishers.

Mendonça, A. and Ribeiro, J.A., 1997. Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sciences* 60: 241 -245.

Mirnajafi-Zadeh, J., Fathollahi, Y., Pourgholami, M.H., 2000. Intraperitoneal and intraamygdala *N6*-Cyclohexyladenosine suppress hippocampal kindled seizures in rats. *Brain Res.* 858: 48-54.

Ottman, R., Risch, N., Hauser, W.A., Paedley, T.A., Lee, J.H., Baker-Cummings C., Lustenberg, A., Nagle, K., Lee, S.K., Seheur, M.L., Neystat, M., Susser, M.,

- Wilhelmsen, K.C., 1995. Localization of a gene for a partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat. Genet.* 10, 56 - 60.
- Pasini, F.L., Guideri, F., Picano, E., Parenti, G., Petensen, C., Varga, A. and Perri, T., 2000. Increase in plasma adenosine during brain ischemia in man: A study during transient ischemic attacks and stroke. *Brain Res. Bull.* 51, 327-330.
- Phillips, J.W. and Wu, P.H., 1981. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16: 187 – 239.
- Racine, R., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: 2. motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 32: 281 -294.
- Rafiki, A., Ben-Ari, Y., Khrestchatisky, M. and Represa, A., 1998. A long-lasting enhanced expression in rat hippocampus of NMDAR1 splice variants in a kainate model of epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 10: 497 – 507.
- Sakura, H., Nagashima S., Nakashima, A., Maeda, M., 1998. Characterization of fetal serum 5'- nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thromb. Res.* 91: 83-9.
- Sarkis, J.J.F. and Salto, C., 1991. Characterization of synaptosomal ATP diphosphohidrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26. 871– 876.

Schoen S.W., Ebert U. and Loscher W. 1999. 5'-nucleotidase Activity of Mossy Fibers in the Dentate Gyrus of Normal and Epileptic Rats. *Neuroscience* 93 (2): 529 - 526.

Schrader, J., Wahl, M., Kuschinsky, W. and Kreutzberg, G.W., 1980. Increase of adenosine content in cerebral cortex of the cat during bicuculline-induced seizures. *Pflugers Arch.* 387, 245 - 251.

Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, T.D., Sneddon, P., Kennedy, C., Bjur, R.A. & Westfall, D.P., 1997. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387: 76-79.

Yegutkin, G., Bodin, P. and Burnstock, G. 2000. Effect of shear stress on the soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 129, 921-926.

Zimmermann, H., 1996. Biochemistry, localization and functional role of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49: 589-618.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1.0: Effects of PTZ-kindling on ATP, ADP and AMP hydrolysis from rat blood serum. Bars represent means \pm S.D. of at least five animals. *PTZ-treated group significantly different from control group ($P < 0.05$, Student's t-test).

Fig. 2.0: Effects of PTZ-kindling on phosphodiesterase activity from rat blood. Bars represent means \pm S.D. of at least four animals.

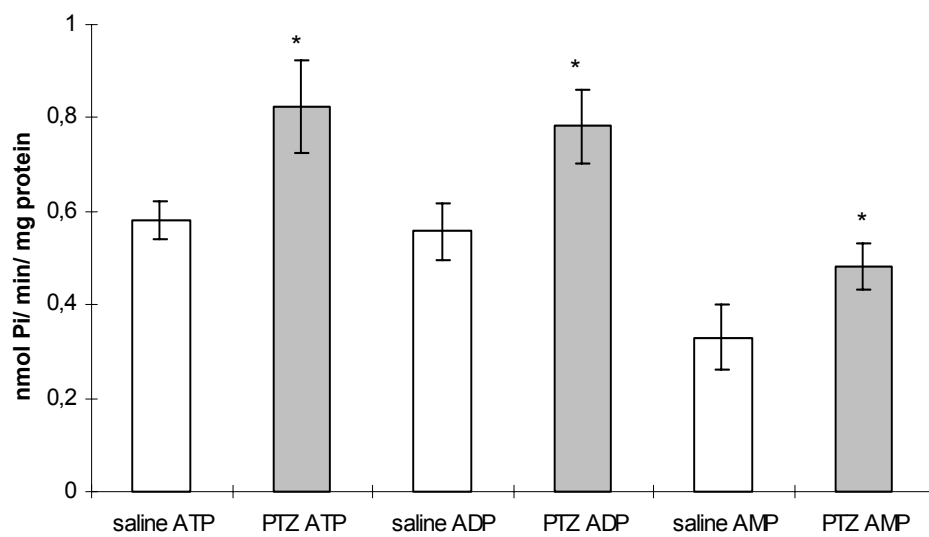


Figure 1

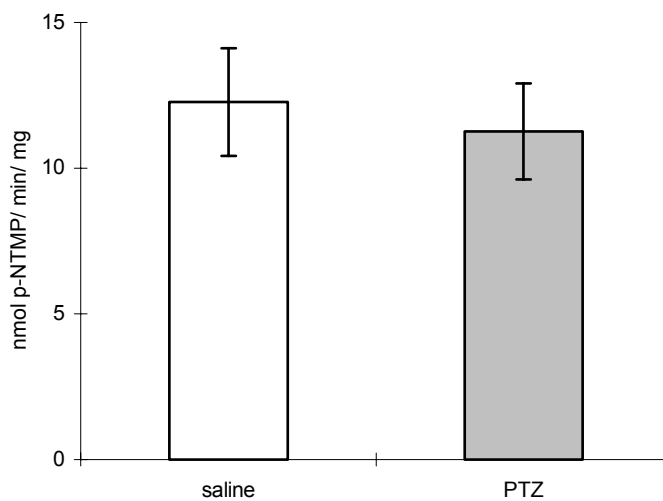


Figure 2

IV. DISCUSSÃO

A concentração de nucleotídeos presentes em um determinado meio biológico é o resultado do equilíbrio existente entre a liberação destes nucleotídeos e seu metabolismo através de nucleotidasas apropriadas. Nucleotídeos adenínicos são rapidamente hidrolisados e convertidos a adenosina no espaço extracelular (DUNWIDDIE et al., 1997). A hidrólise de nucleotídeos extracelulares pode se dar através de uma variedade de enzimas localizadas

na superfície celular, solúveis no meio intersticial ou em fluídos corpóreos (ZIMMERMANN, 2001). Recentemente foi demonstrado que nucleotidases solúveis são liberadas de nervos simpáticos estimulados com o objetivo de terminar a ação do neurotransmissor ATP através de sua completa hidrólise até adenosina (TODOROV et al., 1997). Têm sido proposto que a completa desfosforilação do ATP que culmina na formação de adenosina, envolve a ação seqüencial de uma ATP difosfoidrolase e uma 5'-nucleotidase (BATTASTINI et al., 1991; SARKIS & SALTÓ, 1991).

A interação da adenosina com os receptores purinérgicos A_1 resulta na inibição da liberação de neurotransmissores (DRAGUNOW, 1988; BRUNDEGE & DUNWIDIE, 1997), inibição da transmissão sináptica, supressão espontânea da excitação neuronal e redução do influxo de cálcio (DOLPHIN & ARCHIER, 1983). A capacidade de inibir a liberação de neurotransmissores leva à hipótese de que a adenosina tenha como função a manutenção do “tônus inibitório” na neurotransmissão excitatória (WILLIAMS, 1984), além de atuar como neuromodulador inibitório (DUNWIDDIE, 1980) e como uma substância anticonvulsivante (CHIN, 1989).

Epilepsia é uma patologia que envolve um aumento da neurotransmissão excitatória, diminuição da transmissão inibitória ou ambos eventos (MELDRUM, 1984). Estes eventos anormais na neurotransmissão estão relacionados com o influxo de cálcio (PUMAIN & HEINEMANN, 1985), que ocorre mediante ação de neurotransmissores excitatórios, como glutamato por exemplo (RAFIKI et al., 1998).

Os resultados obtidos neste trabalho, demonstram um aumento significativo nas hidrólises dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em soro de ratos submetidos a crises convulsivas agudas e crônicas, ambas induzidas pelo agente pró-convulsivante PTZ. De acordo com as considerações citadas acima, as alterações observadas nas nucleotidases envolvidas na hidrólise destes nucleotídeos, estão relacionadas com a produção

de adenosina. Muitos trabalhos demonstram um aumento nos níveis de adenosina após a indução de crises convulsivas através de agentes pró-convulsivantes como PTZ (WINN et al., 1979; BERMAN et al., 2000). Recentemente foi demonstrado em nosso laboratório um aumento nas atividades ATP difosfohidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossoma de ratos submetidos a dois modelos de epilepsia de lobo temporal (BONAN et al., 2000).

No presente trabalho, as alterações observadas na hidrólise de ATP e ADP podem ser atribuídas a uma ATP difosfohidrolase, uma vez que a hidrólise de ambos substratos foi ativada de maneira paralela. No modelo agudo, foi possível observar uma ativação da hidrólise de ATP e ADP de maneira quantitativamente similar em todos os tempos testados. Cabe lembrar, que estas alterações foram observadas até 24 horas após a aplicação da injeção de PTZ, tanto para ATP, como para ADP. 48 horas após a administração da droga, estas modificações não foram observadas em relação a ambos os substratos.

Quanto ao modelo crônico, a ativação da hidrólise de ATP e ADP também se deu de maneira quantitativamente paralela. Além disto, a co-localização do gene da ATP difosfohidrolase (10q 23.1-24.1) com o gene para susceptibilidade à epilepsia parcial humana (10q 22-24), reforçam o envolvimento desta enzima com desordens neurológicas como epilepsia (OTTMAN et al., 1995). Estudos imunohistoquímicos recentemente realizados em nosso laboratório demonstraram um aumento da marcação da ecto-apirase em diferentes regiões cerebrais de ratos após a indução de epilepsia através de pilocarpina e ácido cáinico (BUFFON, 2001). Estes resultados confirmam a ocorrência de alterações na ATP difosfohidrolase em epilepsia.

Adicionalmente, foi demonstrado que a estimulação elétrica de nervos simpáticos provoca a liberação de nucleotidases solúveis que estão envolvidas na quebra do ATP até adenosina (TODOROV et al., 1997). Durante situações diferentes da fisiológica, como a estimulação por “shear stress”, as células vasculares endoteliais também são capazes de liberar nucleotidases solúveis (Yegutkin et al., 2000). Estes resultados levaram os autores a aferir que estas células podem ser uma das maiores fontes *in vivo* de nucleotidases solúveis na corrente sanguínea. Além disto, a partir da clonagem e purificação da apirase solúvel de batata (HANDA & GUIDOTTI, 1996) foi possível estabelecer evidências de que CD39,

uma glicoproteína de membrana expressa principalmente em linfócitos ativadas (MALISZEWSKI et al., 1994), é uma apirase (WANG & GUIDOTTI, 1996). A expressão de uma ATP difosfohidrolase em células como linfócitos e macrófagos, indica a presença desta enzima na circulação (MULERO et al., 1999).

Entretanto, além de uma atividade apirásica capaz de hidrolisar ATP e ADP em soro de ratos, é importante considerar a presença da enzima 5'-nucleotide phosphodiesterase, já que esta é uma enzima capaz de hidrolisar diferentes substratos incluindo ATP e ADP e está descrita em soro (SAKURA ET AL., 1998). Considerando o possível envolvimento de uma 5'-nucleotide phosphodiesterase diante da indução de convulsões tanto crônicas como agudas induzidas ou PTZ, nós utilizamos o substrato artificial nitrophenil-5'-thymidine-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP), utilizado como substrato marcador para esta enzima. Pôde-se então observar a hidrólise do substrato utilizado, porém nenhuma alteração significativa em ratos que receberam injeções crônicas, ou agudas, foi observada em relação aos animais controle. Estes resultados confirmam os dados anteriormente relatados na literatura quanto à presença de uma fosfodiesterase em soro sanguíneo, entretanto exclui o envolvimento desta em crises convulsivas crônicas e agudas induzidas pelo agente pró-convulsivante PTZ.

Estudos demonstram que o ATP que atua como neurotransmissor deve ser rapidamente metabolizado até adenosina (RICHARDSON et al., 1987) e que nucleotidases tem importante efeito na remoção deste ATP, contribuindo assim, para a inativação da ação do neurotransmissor (SEBASTIÃO et al., 1999). Outros estudos demonstraram um aumento nos níveis de ATP após a indução de epilepsia com diferentes agentes convulsivantes em cérebro de ratos (WALTON et al., 1998). Em outras situações patológicas como hipoxia, isquemia, estresse e danos celulares em geral, o ATP é liberado em grandes quantidades de células endoteliais e plaquetas (GORDON, 1986). A estimulação de células endoteliais vasculares induz a concomitante liberação de ATP endógeno e enzimas solúveis que degradam nucleotídeos púricos como ATP (YEGUTKIN

et al., 2000). Adicionalmente, em zonas cerebrais relacionadas com epileptogênese como a região anterior do hipocampo, foi observada uma diminuição na atividade ecto-ATPásica sinaptossomal, enquanto que na região posterior do hipocampo, não relacionada com o processo de epileptogênese, houve um aumento na atividade ecto-ATPásica (NAGY et al., 1990). Em córtex cerebral de ratos, a indução do estado epilético prolongado também provocou uma diminuição da atividade ecto-ATPásica (NAGY et al., 1997). Estes estudos sugerem que a presença prolongada de ATP, devido a uma diminuição de sua hidrólise, pode aumentar a excitabilidade tecidual (NAGY et al., 1997). Este acúmulo de ATP pode ser prejudicial, uma vez que a interação de altas concentrações deste nucleotídeo com os receptores P_2X_7 está relacionado com situações patológicas que geram conseqüências danosas como morte celular (HARADA et al., 2000). O acúmulo de cálcio intracelular mediado pela ativação dos receptores P_2X , pode ter efeitos tão prejudiciais quanto aos efeitos induzidos pelo excesso de glutamato (EDWARDS et al., 1992). Desta forma, o aumento da hidrólise do ATP, constitui um importante mecanismo enzimático de controle da excitabilidade celular em situações como epilepsia, onde a transmissão excitatória encontra-se aumentada.

Nossos resultados também demonstraram um aumento na hidrólise do AMP, o que provavelmente indica a ativação da enzima 5'-nucleotidase nas situações testadas, e conseqüentemente o aumento nos níveis de adenosina. Este aumento da hidrólise do AMP após uma única injeção de PTZ, pode demonstrar um mecanismo rápido de produção de adenosina com o objetivo de suprimir as crises geradas pelo agente indutor pentilenotetrazol. Este aumento significativo foi demonstrado nos tempos de 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 5 horas e 12 horas, mantendo-se até 24 horas após a última injeção de PTZ. O período de 48 horas após a injeção, não permite mais a observação destes efeitos. A interrupção neste processo cujo produto final é a adenosina, pode representar o término da ação do agente próconvulsivante sobre os mecanismos celulares epileptogênicos do animal e, conseqüentemente, sobre as enzimas envolvidas na modulação deste processo.

O envolvimento da 5'-nucleotidase em epilepsia é condizente com outros trabalhos descritos na literatura. Em hipocampo de pacientes com epilepsia de lobo temporal, a

atividade da 5'-nucleotidase encontra-se significativamente aumentada quando comparada com a atividade obtida em hipocampo de humanos que não apresentavam a doença (LIE et al., 1999). Um aumento da atividade da 5'-nucleotidase em diferentes tempos após a indução de epilepsia de lobo temporal foi recentemente demonstrado em sinaptossomas de ratos tratados com pilocarpina e cainato (BONAN et al., 2000). Além disto, foi demonstrada a presença de uma 5'-nucleotidase em sinapses de fibras musgosas de giro denteado de ratos epiléticos (SHOEN et al., 1999). Estes trabalhos, juntamente com os resultados obtidos neste trabalho, confirmam a participação da 5'-nucleotidase em um processo desencadeado por crises convulsivas, cujo objetivo é a diminuição da atividade sináptica através da produção do neuromodulador inibitório adenosina (SHOEN et al., 1999).

Com o objetivo de excluir qualquer efeito produzido pela droga na hidrólise dos nucleotídeos, foram realizados experimentos *in vitro*, na qual diferentes concentrações de PTZ foram utilizadas na presença dos substratos testados. Nestes experimentos, não foi observada nenhuma alteração significativa na hidrólise dos nucleotídeos na presença de diferentes concentrações da droga, nem entre as amostras e os controles. Estes resultados sugerem que os efeitos observados na hidrólise dos nucleotídeos não podem ser atribuídos ao efeito da droga por si só, mas representam uma resposta modulatória diante das convulsões induzidas pela mesma.

Adenosina e seus derivados têm sido designados como importantes supressores de crises convulsivas em diferentes modelos de epilepsia (DRAGUNOW, 1988; BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997). As propriedades neuroprotetoras e anticonvulsivantes da adenosina estão associadas à inibição da atividade sináptica que pode se dar através da diminuição da excitabilidade de membrana, inibição da liberação de neurotransmissores ou ambos eventos (PHILLIPS & WU, 1981; BRUNDEGE AND DUNWIDDIE, 1997).

Este efeito depressor tem sido atribuído à ativação dos receptores inibitórios A_1 (DRAGUNOW, 1988). Estudos prévios demonstraram que o pré-tratamento com agonistas seletivos de receptor A_1 , apresentaram proteção significativa contra crises convulsivas agudas induzidas por PTZ, enquanto que a administração de antagonistas de receptor A_1 reverteram completamente este efeito (MALHOTRA & GUPTA, 1997). A densidade destes receptores aumenta de maneira significativa após a administração aguda e crônica de PTZ em diferentes regiões de cérebro de ratos (ANGELATOU et al., 1990). Este aumento na densidade dos receptores A_1 é acompanhada por um aumento no tempo de latência, ou seja, tempo entre a injeção de PTZ e o começo das crises, sugerindo que durante este período ocorre um aumento na habilidade da adenosina endógena em atenuar a hiperatividade celular (ANGELATOU et al., 1990). Trabalhos com autoradiografia quantitativa também revelaram que crises tônico-clônicas induzidas por PTZ causaram um aumento dos receptores A_1 de adenosina em estruturas mediadoras de crises convulsivas como o hipocampo (PAGONOPOULOU et al., 1993). Estudos subsequentes demonstraram que a afinidade dos receptores A_1 em cérebro de ratos submetidos ao modelo de kindling também é aumentada de maneira significativa (SIMONATO et al., 1994). Neste mesmo estudo, o agonista seletivo de receptor A_1 (CHA), reduziu significativamente o fluxo de um marcador da liberação de glutamato ($[^3H]$ D-aspartato). Estes resultados demonstram, que o aumento da afinidade dos receptores A_1 em cérebro de ratos, é funcionalmente relevante, pelo menos em termos de inibição da liberação de glutamato (SIMONATO et al., 1994). Em estudos prévios, este aumento dos receptores de adenosina foi observada dentro de uma hora após a administração aguda de PTZ (PAGONOPOULOU & ANGELATOU, 1998), 24 horas após a indução das crises (PAGONOPOULOU et al., 1993), e até 14 dias após a indução de repetidas injeções da droga (ANGELATOU et al., 1990). Em adição a estes resultados, a adenosina também é aumentada após a indução de crises com diferentes agentes próconvulsivantes como o PTZ (BERMAN et al., 2000). Em humanos, situações diferentes da fisiológica estão associados a um rápido aumento dos níveis de adenosina plasmática circulante, detectável em sangue periférico até 15 dias após a manifestação do evento agudo (PASINI et al., 2000).

A ativação da hidrólise de ATP, ADP e AMP observada em nossos resultados a partir de 30 minutos após a indução de crises agudas com PTZ em soro de ratos, demonstra uma rápida modulação enzimática com o objetivo de produzir o neuromodulador

adenosina, bem como hidrolisar o neurotransmissor excitatório ATP, efeito este que se mantém até 24 horas após a administração da droga.

Os resultados obtidos a partir do tratamento crônico com a mesma droga, demonstraram a presença desta mesma modulação enzimática em circunstâncias que envolvem o fenômeno de plasticidade. É importante considerar que as mudanças observadas foram provavelmente devido a modificações crônicas na excitabilidade sináptica induzida por kindling e não devido ao efeito agudo da droga, já que os ratos submetidos ao tratamento crônico foram mortos 48 horas após a última injeção de PTZ, tempo onde não foi observada nenhuma diferença significativa na hidrólise dos nucleotídeos testados após a administração aguda da droga.

Estes resultados também reforçam a participação de nucleotidasas solúveis em situações patológicas como epilepsia. Além disto, o diagnóstico da doença geralmente possui problemas na prática clínica, uma vez que alguns indivíduos apresentam episódios denominados “pseudocrises”, que são praticamente idênticos aos eventos apresentados em epilepsia crônica. Assim, o fato de que as modificações observadas inicialmente em cérebro, também podem ser observadas a nível plasmático, reforça a importância das atividades nucleotídicas não somente sob o ponto de vista fisiopatológico, mas sob o ponto de vista clínico.

V. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos e apresentados no presente estudo nos permite concluir que:

- Crises agudas induzidas por uma única administração do agente pró-convulsivante pentilenotetrazol causaram em aumento na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em soro de ratos adultos. Estas modificações na hidrólise destes nucleotídeos foram observadas 30 minutos, 60 minutos, 1 hora, 12 horas e 24 horas após a administração da droga. Este efeito não foi mais observado 48 horas após a indução das crises agudas.

A hidrólise do substrato marcador da atividade 5'-fosfodiesterase (*p*-Nph-5'-TMP) não foi modificada após a indução de crises agudas por PTZ em soro de ratos. Estes resultados indicam que uma fosfodiesterase não está envolvida na hidrólise de ATP e ADP nesta condição, o que nos permite sugerir o envolvimento de uma atividade ATP-difosfohidrolase na hidrólise destes nucleotídeos após a indução das crises.

A ativação da hidrólise de AMP após as crises agudas, sugere fortemente a participação de uma 5'-nucleotidase em resposta às crises agudas.

O efeito químico do PTZ na hidrólise dos nucleotídeos foi excluído a partir de experimentos realizados *in vitro*, onde nenhuma concentração da droga provocou alterações na hidrólise dos mesmos.

- O tratamento crônico com PTZ através do modelo de epilepsia, denominado kindling, também demonstrou ativação na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP. Da mesma maneira que o tratamento agudo, a atividade fosfodiesterásica não foi modificada após o tratamento crônico com a mesma droga. Estes resultados sugerem o envolvimento de uma ATP-difosfohidrolase em conjunto com uma 5'-nucleotidase na hidrólise de ATP até a produção do neuromodulador adenosina no modelo crônico de kindling em soro de ratos adultos.

- O presente trabalho relaciona nucleotidases presentes em soro sanguíneo, com situações patológicas agudas que requerem o rápido aumento de adenosina, e com situações patológicas crônicas que envolvem o fenômeno de plasticidade sináptica.

V.I. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRAS, L., SALMINI, M. & JALKANEN, S. Lymphocyte-vascular adhesion protein-2 is a novel 70-kD molecule involved in lymphocyte adhesion to vascular endothelium. *J. Immunol.* 151: 4228 – 4238, 1993.

ANGELATOU, F., PAGONOPOULOU, O. & KOSTOPOULOS, G. Alterations of A1 adenosine receptors in different mouse brain areas after pentylentetrazol- induced seizures , but not in epileptic mutant mouse “tottering”. *Brain Res.* 554: 251 - 256, 1990.

AULT, B. AND WANG, C.M. Adenosine inhibits epileptiform activity arising in hippocampal area CA3. *Br. J. Pharmac.* 87: 695 – 703, 1986.

- AVANZINI, G., MOSHÉ, S.L., SCHWARTZKROIN, P.A. & ENGEL J. JR. Animal models of localization-related epilepsy. IN: *Epilepsy: A comprehensive Textbook*, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 427 - 442, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- BATTASTNI A.M.O., ROCHA J.B.T., BARCELLOS C.K., DIAS R.D. & SARKIS J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16: 1303 - 1310, 1991.
- BATTASTNI A.M.O., N., EMANUELLI, T., KOESTER, L., WINK, M.R., BONAN, C.D., DIAS, R.D. & SARKIS, J.J.F. Studies on the ancorage of ATP – Diphosphohydrolase in synaptic plasma membranes from rat brain. *Int. Cell. Biol.* 30: 669 – 678, 1998.
- BELLI, S.I. & GODING, J.W. Biochemical characterization of human PC-1, an enzyme possessing alkaline phosphodiesterase I and nucleotide pyrophosphatase activities. *Eur. J. Biochem.* 226: 433 – 43, 1994.
- BERMAN, R. F., FREDHOLM, B. B., ADEN, U., CONNOR, W. T. O. Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Research* 872: 44 – 53, 2000.
- BONAN, C.D., DIAS, M.M., BATTASTNI A.M.O., DIAS, R.D. & SARKIS, J.J.F. Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidaseactivities hippocampal sinaptosomes of adults rats. *Neurochem. Res.* 23: 979 – 984, 1998.
- BONAN, C. D., WALZ, R., PEREIRA, G.S., WORM, P.V., BATTASTINI, A.M.O. CAVALHEIRO, E. A., IZQUIERDO, I., SARKIS, J.J.F. Changes in synaptosomal ectonucleotidases activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 39: 229 - 238, 2000.
- BRAUN, N., ZHU, Y., KRIEGLSTEIN, J., CULMSEE, C. & ZIMMERMANN, H. Upregulation of the enzyme chain hydrolizing extracellular ATP after transient forebrain ischaemia in the rat. *J. Neurosci.* 18 (13): 4891 – 4900, 1998.
- BRUNDEGE JM. & DUNWIDDIE TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Advanced Pharmacology* 39: 353 -359, 1997.
- BUFFON, A. Localização imunohistoquímica da ecto-apirase após indução de epilepsia por pilocarpina e ácido caínico em cérebro de ratos adultos. Tese de mestrado do curso de P's-Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica. UFRGS, 2001.
- BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24: 509 - 581, 1972.
- BURNSTOCK, G. & KENNEDY, C. It there a two types P2-puriceptors? *General Pharmacology* 16: 433 – 440, 1985.
- CAMMER W., SiROTA S.R., ZIMMERMANN r. T.R.V. & NORTON

- W.T. 5'Nucleotidase in rat brain myelin. *J. Neurochem.* 35: 367 - 373, 1980.
- CARL, S.L. & KIRLEY, T.L. Immunolocalization of the ecto-ATPase and ecto-apyrase in chicken gizzard and stomach. *J. Biol. Chem.* 272: 23645 – 23652, 1997.
- CHESI, A.J.R. & STONE, T.W. Alkylxanthine adenosine antagonists and epileptiform activity in rat hippocampal slices in vitro. *Exp. Brain. Res.* 113: 303 – 310, 1997.
- CHEVASSUS, N.A.L., NIQUET, J., BEM ARI, Y. & REPRESA, A. Cellular plasticity. IN: *Epilepsy: A comprehensive Textbook*, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 387 – 395, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- CHIN, J.H. Adenosine receptors in brain: neuromodulations and role in epilepsy. *Ann. Neurol.* 26: 695 – 698, 1989.
- CORDA, M.C., ORLANDI, M., LECCA, D. & GLORDI, O. Decrease in GABAergic function inhibitors. *Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 792 – 800, 1992.
- COTÉ Y.C., FILEP. J.G., BATASTTINI., GAUVREAU J., SIROIS P., BEAUDOIN A .R. Characterization of ATP-diphosphohidrolase activities in the intima and media of the bovine aorta: evidence for a regulatory role in platelet activation in vitro. *Biochem. Biophys. Acta.* 1139: 133 – 142, 1992.
- CUNHA, R. & RIBEIRO, J.A. Adenosine A₂ receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. *Neurosc. Lett.* 289: 127 – 130, 2000.
- CUNHA, R., BRENDEL, P., ZIMMERMANN, H. & RIBEIRO, J.A. Immunologically Distinct Terminals of Different Areas of the Rat Hipocamppus. *J. Neurochem.* 74: 334 – 338, 2000.
- DIANZANI, U., REDOGLIA, V., BRAGARDO, M., ATTISANO, C., BIANCHI, A., DI FRANCO, RAMENGUHI, U., WOLFF, H., THOMPSON, L.F. & PILERI. A. Co-stimulatory signal delivered by CD76 molecule to human CD45RA CD45RO (naïve) CD8 T lymphocytes. *J. Immunol.* 151: 3961 – 3970, 1993.
- DICHTER, M.A. The neurobiology of epilepsy. IN: *Epilepsy: A comprehensive Textbook*, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 233 – 235, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- DOLPHIN, A.C. & ARCHER, E.R. An adenosine agonist inhibits and a cyclic AMP analogue enhances the release of glutamate, but not GABA from slices of rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 43: 49, 1983.
- DRAGUNOW, M. Purinergic mechanisms in epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 31: 85 – 108, 1988.

- DRURY, A.N. & SZENT-GYORGI, A. The physiological activity of adenosine compounds with special reference to their actions upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 68: 213 – 237, 1929.
- DUNWIDDIE, T.V. Endogenously released adenosine regulates excitability in the vitro hippocampus. *Epilepsia* 21: 541 – 548, 1980.
- DUNWIDDIE, T.W., DIAO, L., PROCTOR, W.R. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. neurosci* 17:7673 – 7682, 1997.
- DZHANDZHUGAZYAN, K.N., KIRKIN, A.F., STARTEN, P.T. & ZEUTHEN, J. ECTO-ATP diphosphohydrolase /CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Letters* 430: 227 – 230, 1998.
- EDWARDS, F.A., GIBB, A.J. & COLQUHOUN, D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, 359: 144 – 147, 1992.
- EDWARDS, F.A. & GIBB, A.J. ATP- a fast neurotransmitter. *FEBS Letters* 28: 86 – 89, 1993.
- ENGEL, J & PEDLEY, T.A What is Epilepsy. IN: Epilepsy: A comprehensive Textbook, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 1 – 9, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- ENJOYOJI, k., SÉVIGNY, J., LIN, Y., FRENETTE, P., CHRISTIE, P.D., SCHULTE AM ESCH, J., IMAI, M., EDELBERGER, J.M., RAYBURN, H. & LECH, M. Target disruption of CD39/ ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature Med.* 5: 1010 – 1017, 1999.
- EVANS, R.J., DREKACH, V. & SURPRENANT, A. ATP mediated fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*, 357: 503 – 505, 1992.
- EVANS, R.J., LEWIS, C., BUELL, G., VALERA, S., NORTH, R.A. & SURPRENANT, A. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2X purinoceptors). *Molecular Pharmacology* 48: 178 – 183, 1995.
- FILIPPINI, A, TAFFS, R.E., AGUI, T., SITKOVSKY, M.V. Ecto-ATPase activity in cytotoxic T-lymphocytes. Protection from the cytotoxic effects of extracellular ATP. *J. Biol. Chem.* 265: 334 – 340, 1990.
- FRASSETO S.S., DIAS R.D. & SARKIS J.J.F. Characterization of an ATP-diphosphohydrolase activity in rat blood platelets. *Mol. Cell. Biochem.*, 129: 47 – 55, 1993.
- GAYLE, R.B., MALISZEWSKI, C.R., GIMPEL, S.D., SCHOEBORN, M.A., CASPARY, R.G., RICHARDS, C., BRASEL, K., PRICE, V., DROSOPOULOS, J.H.F., ISLAN, N., ALYNOCHEVA, T.N., BROEKMAN, M.J. & MARCUS, A.J. Inhibition of platelet functions of recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J. Clin. Invest.* 101: 1851 – 1859, 1998.

- GODDARD, G.V., MCINTYRE, D.C. & LEECH, C.K. A permanent change in brain resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* 45: 295 – 330, 1969.
- GONDAL, E.J.M. & ZIMMERMANN, H. Purification, characterization and cellular localization of 5'-nucleotidase from Torpedo electric organ. *Biochem. J.* 245: 805 – 810, 1987.
- GORDON, J.L. Extracellular ATP: Effects, sources and fate. *J. Biochem* 233: 309 – 319, 1986.
- HALONEN, T., PITKANEN, A, PARTANEN, J., HYTTINEN, J.M. & RIEKKINEN, P.J. Amino acids levels in cerebrospinal fluid of rats after administration of pentylenetetrazol. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101:21 – 25, 1992.
- HANDA, M. & GUIDOTTI, G. Purification and cloning of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218, 916 – 923, 1996.
- HARADA, H., CHAN, C.M., LOESCH, A., UNWIN, R. & BURNSTOCK, G. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney International* 57: 949 – 958, 2000.
- HARAHAP, A.R. & GODING, J.W. Distribution of the murine plasma antigen PC-1 in nonlymphoid cells. *J. Immunol.* 141: 2317 – 2320, 1988.
- HAUGEN, H.F. & SKREDE, S. Nucleotide pyrophosphatase and phosphodiesterase. I. Organ distribution and activity in body fluids. *Cli. Chem.* 23: 1531 – 1537, 1997.
- HEINE, P., BRAUM, N. & ZIMMERMANN, H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Euro. J. Biochem.* 262: 102 – 107.
- HEIBRONN, A. & ZIMMERMANN, H. 5'-nucleotidase activates and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation of PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1172 – 1179, 1995.
- HEYMANN D.; REDDINGTON M. & KREUTZBERG G. W. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43: 971 - 978, 1984.
- HOLMSEN I. & HOLMSEN H. Partial purification and characterization of an ATP diphosphohydrolase from human plasma. *Thromb. Diathes. Haemorrhag.*, 26: 177 – 191. 1971.
- HOLTON F.A. & HOLTON P. The capillary dilator substance in dry powders of spinal cord roots: a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol. (London)*, 126: 124 - 140, 1954.

- HOLTON, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol.* (London) 145: 494 - 504, 1959.
- INOUE, K., NAKAZAWA, K., FUGIMORI, K., WATANO, W. & TAKANAKA, A. Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked glutamate release in culture rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 134: 215 - 218, 1992.
- INOUE, K., KOIZUMI, S. & NAKAZAWA, K. Glutamate-evoked release of adenosine 5'-triphosphate causing an increase in extracellular calcium in hippocampal neurons. *Neuroreport* 6: 437 - 449, 1995.
- INOUE, K. The functions of ATP receptor in the hippocampus. *Pharmacol. Res.* 38:323 - 331, 1998.
- JAMES, O., NAMARA, M.C. & WADA, J.A. Kindling Model. IN: *Epilepsy: A comprehensive Textbook*, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 419 - 425, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- KACZMAREK, E., KOZIAK, K., SÉVIGNY, J., SIERGEL, 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.
- KEGEL, B., BRAUN, N., HEINE, P., MALISZEWSKI, C.R & ZIMMERMANN, H. An ecto-ATPase and an ecto-apyrase are expressed in rat brain. *Neuropharmacol.* 36: 1189 - 1200, 1997.
- KENNEDY, C. ATP as cotransmitter in a perivascular sympathetic nerves. *J. Auton. Pharmacol.* 16: 337 - 340, 1996.
- KIRLEY, T.L. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J. Biol. Chem.* 272: 1076 - 1081, 1997.
- KITAKAZE, M., HORI, M., SATO, S., TAKASHIMA, S., INOUE, M., KITABAKATI, A. & KAMADA, T. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. *irc. Res.* 69: 1402 - 1408, 1991.
- KRISHNAN, P. S. Studies on apyrases. Purification of potato apyrase by fractional precipitation with ammonium sulfate. *Arch Biochem.* 20: 272, 1949.
- LIE, A.A., BLUNCKE, I., BECK, H., WIESTLER, O.D., ELGER, C.E. & SHOEN, S.W. 5'-nucleotidase activity indicates sites of synaptic plasticity and reactive synaptogenesis in the human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58(5): 451 - 458, 1999.

- LONDOS, C., COOPER, D.M.F. & WOLFF, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. u.s.a.* 77: 2552 – 3554, 1980.
- LLOYD, H.G.E., LINDSTRON, K. & FREDHOLM, B.B. Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or ebergly depletion. *Neurochem. Int.* 23: 173 – 185, 1993.
- MADEJA, M., Musshoff, U., Lorra, C., Pongs, O., Speckmann, E.J. Mechanism of action of epileptogenic drug pentylenetetrazol on a cloned neuronal potassium channel, *Brain Res.* 722: 59-70, 1996.
- MAGGIRWAR,S.B., DHANRAJ, D.N., SOMANI, S.M. & RANKUMAR, V. Adenosine acts an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 201: 508 – 515, 1994.
- MALHOTRA, J. & GUPTA, Y.K. Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole- induced seizures in rats. *British J. Pharmacol.* 120: 282 – 288, 1997.
- MALISZEWSKI, C.R., DELESPESE, G.J. & SCHOEBORN, M.A. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and strutural characterization. *J. Immunol.* 153: 3574 – 3583, 1994.
- MASON, C.R. & COOPER, R.M. A permanent change in convulsive threshold normal and brain damage rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. *Epilepsia* 13: 663 - 674, 1972.
- Mc NAMARA, J.O., BONHAUS, D.W., SHIN, C., CRAIN, B.J., GELLMAN, R.J. % GIANCCHINO, J.L. The kindling model of epilepsy: a critical review. *CRC Critical Rev. Clin. Neurobiol* 1: 341 – 391, 1985.
- Mc NAMARA, J.O. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J. Neurisci.* 14: 3413 – 3425, 1994.
- MELDRUM, B. Amino acids neurotransmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia* 22: 140 – 149, 1984.
- MELDRUM, B. & CHAPMAN, A. Epileptic seizures and epilepsy. IN: Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects ads. G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Alberts, K. Fischer, M.D. Uhler, pp 755 - 768, 6^a edição. Lippincott-Raven Publishers, 1998.
- MEYERHOF, O. The origem of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.* 157: 105 – 119, 1945.

- MISUMI, Y., OGATA, S., OHKUBO, K., HIROSE, S. & IKEHARA, Y. Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur. J. Biochem.* 191: 563 – 569, 1990.
- MULERO, J.J., YEUNG, G., NELKEN, S.T. AND FORD, J.E. CD39-L4 is a secreted human Apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J. Biol. Chem.* 274: 20064 - 20067, 1999.
- MURATA, J., LEE, H.Y., CLAIR, T., KRUTSCH, H.C., ARESTAD, A., SOBEL, M.E., LIOTTA, L.A. & STRACK, M.L. cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.* 269: 30479 – 30484, 1994.
- NAGY, A.K., HOUSER, R.C. & DELGADO -ESCUETA, A.V. Synaptosomal ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of humans with focal epilepsy. *Brain Res.* 529: 192 – 201, 1990.
- NAGY, A.K., WALTON, N.Y. & TREINAM, D.M. Reduced cortical ecto-ATPase activity in rat brains during prolonged epilepticus induced by sequential administration by lithium and pilocarpine. *Mol. Chem. Neurophatol.* 31: 135 – 147, 1997.
- OLSON, R.W. The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. Site of action convulsant and anticonvulsant drugs, *Mol. Cell. Biochem*, 39 (1981) 261-279.
- OTTMAN, M., RISCH, N., HAUSER, W.A., PEDLDEY, T.A., LEE, J.H., BARKERCUMMINGS, C., LUSTENBERG, A., NAGLE, K.J., LEE, S.K., SEHEUR, M.L., NEYSTAT, M., SUSSER, M & WILHELMSSEN, K.C. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nature Genet.* 10: 56 – 60, 1995.
- PAGONOPOULOU, O.F., ANGELETOU, F. & HOSTOPOULOS, G. Effect of Pentylentetrazol-induced seizures on A1 adenosine receptor regional density in the mouse brain: A autoradiographic study. *Neurosci.* 56: 711 – 716, 1993.
- PAGONOPOULOU, O., ANGELATOU, F. Time development and regional distribution of [3H]Nitrobenzylthioinosine adenosine uptake sites binding in the mouse brain after acute pentylenetetrazole- induced seizures. *J.Neurosci. Res.* 53: 433 - 442, 1998.
- PASINI, F.L., GUIDERI, F., PICANO, E., PARENTI, G., PETENSEN, C., VARGA, A. AND PERRI, T. Increase in plasma adenosine during brain ischemia in man: A study during transient ischemic attacks and stroke. *Brain Research Bulletin.* 51: 327 - 330, 2000.
- PATEL, B.T. & TUDBALL, N. Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase and adenosine deaminase immunoreactivities in rat brain. *Brain Res.* 370: 250 - 264, 1986.
- PHILLIS, J.W. & WU, P.H. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16: 187 – 239, 1981.

- PICHER M.; COTÉ Y.P.; BÉLIVEAU R.; POTIER M.; BEAUDOIN A .R. Demonstration of a novel type of ATP-diphosphohidrolase in the bovine lung. *J. Biol. Chem.*, 268: 4699 – 4703, 1993.
- PLESNER, L. Ecto-ATPases: indentities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158: 141 – 214, 1995.
- POTTER, P. & WHITE, T.D. Release of adenosien and adenosine –5'triphosphate from synaptossomes from different regions of rat brain. *Neuroscience* 5: 1351 – 1356, 1980.
- PALMINI, A. & COSTA, J.C. Introdução a epileptologia clínica e classificação das epilepsias e crises epiléticas. IN: Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos, eds. Da Costa, J.C.; Palmi, A, Yacubian, E.M.T., Cavalheiro, E.A, pp 149- 161, São Paulo, 1998.
- PEDATA, F., LATINI, S., PUGLIESE, A.N. & PEPEU, G. Investigations into the adenosine outflow from hippocampal slices evoked by ischemia-like conditions. *J. Neurochem.* 61: 284 – 289, 1993.
- PUMAIN, R. & HEINEMANN, U. Stimulus and amino acid-induced calcium and potassium changes in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 53: 1- 16, 1985.
- RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. *Eletroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32: 281 – 294, 1972.
- RAFIKI, A., BEN ARI, Y., KHERSTCHATISKY, M. & REPRESA, Long-lasting enhanced expression in the rat hippocampus of NMDAR1 splide variants in a kainate model of epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 10: 497 – 507, 1998.
- RALEVIC, V. & BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413 – 492, 1998.
- REPERT, S.M., WEAVER, D.E., STEHLE, J.H. & RIVKEES, S.A. Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol. Endocrinol.* 5: 1037 – 1048, 1991.
- RESTA, R., HOOKER, S.W., HANSEN, K.R., LAURENT, A.B. PARK, J.L., BLACKBURN, M.R., KNUDSEN, T.B. & THOMPSON, L.F. Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73) – cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* 133: 171 – 177, 1993.
- RIBEIRO, J.M.C., SARKIS J.J.F.; ROSSIGNOL P.A.; SPIELMAN A. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79: 81 – 86, 1984.

- RIBEIRO, J.M.C. & SEBASTIÃO, A.M. Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A3) adenosine receptor. *Prog. Neurobiol.* 26: 179 – 209, 1986.
- RIBEIRO, J.M.C., MODI G.B., TRESH R.B. Salivary apyrase activity of some old world *phelebotomine sandflie*. *Insect. Biochem.* 19: 409 – 412, 1989.
- RICHARDSON PJ, BROWN SJ, BAILYES EM & LUZIO JP. Ectoenzymes control adenosine modulation of immunisolated cholinergic synapses. *Nature* 327: 232 – 234, 1987.
- ROCHAM, L., BRIONES, M., ACKERMAN, R.F., ANTON, B., MAIDMENT, N.T., EVANS, C.J. & ENGEL, J. Pentylenetetrazol-induced by kindling: early involvement of excitatory and inhybitory systems. *Epilepsy Research*, 26: 105 – 113, 1996.
- ROSENBERG M.D., BUEGEL J., STROBEL R.S. Purification and characterization of nucleotide diphosphohidrolase from oviductual and seminal secretions. *J. Cell. Biol.* 107: 178, 1988.
- RUDOLPHI, K.A., SCHUBERT, P., PARKINSON, F.E & FREDHOLM, B.B. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischemia. *TITS* 13: 439 – 445, 1992.
- SAKURA, H & FUJII, T. Placental phosphodiesterase as a factor that inhibits ADP-induced platelet aggregation. In: Tomoda, Y, editor, Placental and endometrial proteins. Utrecht-Tokyo: VSP: p. 433 – 437, 1988.
- SAKURA, H., NAGASHIMA S., NAKASHIMA, A., MAEDA, M. Characterization of fetal serum 5'- nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thromb. Res.* 91: 83-9, 1998.
- SARKIS, J.J.F. & SALTÓ, C. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolyase from the electric organ of *Torpedo Marmorata*. *Brain. Res. Bull.* 26: 871 – 876, 1991.
- SARKIS, J.J.F.; GUIMARÃES J.A & RIBEIRO J.M.C. Salivary apyrase of *Rodnius prolixus*: Kinetics and purification. *J. Biochem.* 233: 885 – 891, 1996.
- SCHETINGER, M.C.R., BONAN, C.D., SCHIERHOLT, R.C., WEBBER, A., ARTENI, N., EMANUELLI, T., DIAS, R.D., SARKIS, J.J.F. & NETTO, C.A. Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischaemia: a possible link between preconditioning and adenosine production. *J. Stroke Cerebrovas. Dis.* 7(5): 281 – 286, 1998.
- SCHWARTZKROIN, P.A. & PRINCE, D.A. Changes in excitatory and inhibitory synaptic potentials leading to epileptogenic activity. *Brain Res.* 183: 61 – 76, 1980.
- SEBASTIÃO, A.M. & RIBEIRO, J.M.C. Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog. Neurobiol* 48: 167 – 189, 1996.

- SEBASTIÃO, AM., CUNHA, R.A., CASCALHEIRA, F. RIBEIRO, J.A. Adenine nucleotides as inhibitors of synaptic transmission: Role of localized ectonucleotidases. *Prog. Brain Res.* 120: 183 – 192, 1999.
- SCHOEN S.W., EBERT U. & LOSCHER W.. 5'-nucleotidase Activity of Mossy Fibers in the Dentate Gyrus of Normal and Epileptic Rats. *Neurosci* 93: 529 – 526, 1999.
- SHORVON, SD. Epidemiology, classification, natural history and genetic of the epilepsy. IN: *Epilepsy: a lancet review*, ed. J.C.Costa, pp 3 – 13, The lancet, London, 1990.
- SILINSKI E.M., GERZANICH V. & VANNER S.M. ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *Br J Pharmacol* 106: 762 - 763, 1992.
- SIMONATO, M., VARANI, K., MUZZOLINI, A., BIANCHI, L. B. & BOREA, A. P. Adenosine A1 receptors in the rat brain in kindling model of epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 265: 121- 124, 1994.
- SHINOZUKA, K., BJUR, R.A. & WESTFALL, D.P. Characterization of presynaptic purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 338: 221 – 227, 1988.
- SMITH, T.M. & KIRLEY, L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-ATPase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-ATPases. *Biochem. Biophys. Acta* 1386: 65 – 78, 1998.
- SMITH, T.M. & KIRLEY, L. Glycosylation is essential to functional expression of a human brain ecto-ATPase. *Biochemistry* 38: 1509 – 1516, 1999.
- SUTULA, T., HE, X.X., CAVAZOS, J. & SCOTT, G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 239: 1147 – 1150, 1988.
- SUZUKI, K., FURUKAWA, TAMURA, H., ERIJI, N., SUEMATSU, H., TAGUCHI, R., NAKAMURA, S., SUZUKI, Y & IKEZAWA, H. Purification and cDNA cloning of bovine liver 5'-nucleotidase, a GPI- anchored protein, and its expression in COS cells. *J.Biochem. (Tokyo)* 113: 607 – 613, 1993.
- TAKAHASHI, T., OLD, L.J. & BROYSE, E.A. Surface alloantigens of plasma cells. *J. Exp. Med.* 131: 1325 – 1341, 1970.
- TERKELTAUB, R., ROSEMBACH, M., FONG, F., GODING, J.W. A causal nucleotide pyrophosphohydrolase overactivity and increased intracellular inorganic pyrophosphate (PPi) generation is demonstrated by transfection of cultured fibroblasts and osteoblasts with PC-1 (plasma Cell Membrane Glycoprotein -1). Relevance to CPPD deposition disease. *Arthritis Rheum* 37: 934 – 941, 1994.
- TSOU, K.C., LEDIS, S. & McCOY, M.G. 5'-Nucleotide phosphodiesterase isoenzyme pattern in the serum of human hepatoma. *Cancer Res.* 33: 2215 – 2217, 1973.

- TODOROV, L.D., MIHAYLOVA-TODOROVA, S., WESTFALL, T.D., SNEDDON, P., KENNEDY, C., BJUR, R.A. & WESTFALL, D.P. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387: 76 – 79, 1997.
- VALENZUELA, M.A., LOPES, J., DEPIX, M., MANCILLA, M., KETTLUN, A.M., CATALÁN, L., CHIONG, M., GARRIDO, J. & TRAVERSO-CORI, A. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp. Biochem. Physiol.* 93: 911 – 919, 1989.
- VAN DRIEL, I.R. & GODING, J.W. Plasma cell membrane glycoprotein PC-1: primary structure deduced from cDNA clones. *J. Biol. Chem.* 262: 4882 – 4887, 1987.
- VIZI, E.S., LIANG, S.D., SPERLAGH, L.B., KITTEL, A. & JURANYI, Z. Studies on the release and extracellular metabolism of endogenous ATP in rat superior cervical ganglion: Support for neurotransmitter role of ATP. *Neuroscience* 79: 893 – 903, 1997.
- WALTON, N.Y., NAGY, A.K. & TREIMAN, D.M. Altered residual ATP content in rat brain cortex subcellular fractions following status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. *J. Mol. Neurosci.* 11: 233 – 242, 1998.
- WANG, T.F. & GUIDOTTI, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 790: 318 – 322, 1998.
- WANG, T.F. & GUIDOTTI, G. The transmembrane domains of ecto-apyrase (CD39) in the affect enzymatic activity and quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 273: 24814 – 24821, 1998.
- WASTERLAIN, C.G., BRONSTEIN, J.M., MORIN, A.M., DWYER, B.E. & SANKAR, R. Translocation and autophosphorylation of brain calmodulin kinase II in status epilepticus. IN: *Molecular neurobiology and Epilepsy*, eds. J. Engel, Jr, Wasterlain, C.G., Cavalheiro, E., Heinemann, U. & Avanzini, G., pp 220 – 231, Amsterdam: Elsevier, 1992.
- WIDNELL, C.C., SCHNEIDER, B., PIERRE, B., BAUDHUIN, P. & TROUET, A. Evidence for a continual exchange of 5'-nucleotidase between in the cell surface and cytoplasmic membranes in cultured rat fibroblasts. *Cell.* 28: 61 – 70, 1982.
- WILLIAMS, M. Adenosine – a selective neuromodulator in the mammalian SNC. *Trends in Neuroscience* 7: 164 – 168, 1984.
- WILLIAMS, M. Purine nucleosides and nucleotides as central nervous system modulators. *Ann. New York Acad. Sci.* 603: 93 – 107, 1990.
- WINN, H. R., WELSH, J. E., BRYNER, C., RUBIO, R. AND BERNE, R. M. Brain adenosine production during the initial 60 seconds of bicuculline seizures in rats. *Acta neurol. scand.* 60: 536-537, 1979.

- WINK, M.R., LENZ, G., RODNIGHT, R., SARKIS, J.J.F. & BATTASTINI, A.M.O. Identification of brain ecto-ATPase as a phosphoprotein. *Mol. Cell. Biochem.* 213: 11 – 16, 2000.
- YAGI K., KATO N., SHIMBO M., SHIMBA L.S., MIURA Y. Purification and characterization of adenosine diphosphatase from human umbilical vessels. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 2143 – 2146, 1992.
- YOUNG, D. & DRAGUNOW, M. Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience* 58: 245 – 261, 1994.
- ZIMMERMANN, H. 5' - Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal* 285: 345-365, 1992.
- ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49, 587 – 618, 1996.
- ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and Note on Nomenclature. *Drug Development Research* 52: 44 – 56, 2001.