

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**Efeitos da ovariectomia e da reposição hormonal sobre a hidrólise de
nucleotídeos da adenina em soro e plaquetas de ratas**

DANIELA POCHMANN

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 (UFRGS) como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre

2004

UFRGS
Inst. de Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca

AGRADECIMENTOS

Ao Sarkis, pela oportunidade, pela orientação e pelo carinho.

À Ana, pelo interesse, disposição e atenção sempre que necessários.

À Carla, por toda ajuda e atenção. Pelo exemplo de dedicação.

Ao Jean, meu amigo, por ter me apresentado ao Sarkis. Pelo exemplo de dedicação ao trabalho e à pesquisa. Por estar sempre disposto a ajudar. Pelo exemplo de caráter e autenticidade.

À Ale Bruno, por estar sempre pronta a ajudar. Pelas trocas de idéias e trabalhos em conjunto. Por estar sempre presente, tanto nos momentos difíceis do trabalho quanto da vida. Pela amizade, otimismo e alegria. Pelo exemplo de pesquisadora e dedicação ao trabalho.

À Ana Elisa, pela ajuda nas cirurgias e experimentos. Pela amizade, pelo carinho e pelo exemplo de força que não se deixa abater.

À Bárbara, por ser minha “professorinha” quando comecei no laboratório e pelos trabalhos que fizemos juntas.

Aos colegas do laboratório de enzimologia Vanessinha, Déia, Japinha, Eliz, Émerson, Giana, Rô, Leandre, Felipe, Luci, Spiller, Rafa, Joseli, Cris, Ana Paula, Sandra, Vanessa, pela alegria e companheirismo de todos os dias.

À Denise, pela grande força com o material do laboratório, por ser uma pessoa tão esforçada e disposta a ajudar.

À professora Carla Dalmaz por ter cedido as cápsulas para reposição hormonal e à sua bolsista Martinha, por tê-los confeccionado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à Cléia e ao Valeri.

Ao Júnior, pelo amor, por toda a torcida, pelo interesse, companheirismo e pela paciência.

À minha irmã, pela troca de idéias e carinho.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos.

À toda minha família pelo apoio e torcida.

À CAPES por ter financiado a minha bolsa de mestrado e à PROPESQ, pela bolsa de iniciação científica.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HORMÔNIOS ESTERÓIDES SEXUAIS E SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	1
1.2 SISTEMA CARDIOVASCULAR E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA.....	4
1.3 NUCLEOTIDASES.....	8
1.4 NUCLEOTIDASES E HORMÔNIOS SEXUAIS.....	13
2. OBJETIVOS	14
3. ARTIGOS	
3.1 CAPÍTULO 1 – Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum.....	15
3.2 CAPÍTULO 2 – Ecto-hydrolysis of adenine nucleotides in rat blood platelets are altered by ovariectomy	39
4. DISCUSSÃO	58
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

RESUMO

Os hormônios esteróides sexuais são amplamente conhecidos pelo seu envolvimento em numerosas respostas fisiológicas. Após a menopausa, quando diminuem os níveis de estrogênio circulantes, as mulheres apresentam um risco aumentado de doenças cardíacas. Evidências têm sugerido que no sistema cardiovascular, o estrogênio exerce um papel protetor reduzindo o risco de desenvolvimento de aterosclerose e complicações cardiovasculares, através da modulação da função vascular e da inibição da agregação plaquetária. Os processos de hemostasia e formação de trombos também podem ser afetados pelos nucleotídeos da adenina e pelo nucleosídeo adenosina. Extracelularmente, o nucleotídeo ADP é reconhecido como maior agonista plaquetário, enquanto o nucleosídeo adenosina é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. Conseqüentemente, a regulação das enzimas que controlam os níveis destes nucleotídeos e de adenosina na circulação torna-se essencial na modulação dos processos de agregação plaquetária, vasodilatação e fluxo coronariano. Resultados recentes demonstram que as atividades de algumas enzimas podem ser moduladas por variações dos níveis de estrogênio, assim, no presente estudo resolvemos investigar os efeitos da ausência dos hormônios ovarianos (ovariectomia) e da terapia de reposição de estradiol sobre a atividade das enzimas que degradam ATP, ADP e AMP em soro e plaquetas de ratas. A privação hormonal inibiu significativamente a hidrólise de ATP, ADP e AMP em plaquetas; no soro a hidrólise dos três nucleotídeos foi significativamente aumentada, enquanto que a hidrólise do substrato artificial marcador da enzima fosfodiesterase não foi alterada neste tratamento. Contrariamente, a reposição de estradiol diminuiu significativamente a hidrólise dos três nucleotídeos e do substrato artificial no soro em comparação aos respectivos controles; nas plaquetas, o tratamento não reverteu a inibição causada pela ausência hormonal. Além disso, testamos os hormônios 17β -estradiol, sulfato de diidroepiandrosterona e pregnenolona *in vitro* no soro dos animais para verificar uma possível ação direta destes hormônios sobre as enzimas testadas, porém não foram observadas alterações na hidrólise dos nucleotídeos. Nossos resultados sugerem um forte envolvimento do sistema hormonal com as enzimas que controlam os níveis de nucleotídeos na circulação. Os resultados em plaquetas indicam que a privação hormonal afeta a hidrólise de ATP, ADP e AMP e conseqüentemente os níveis destes nucleotídeos na circulação. Sendo o ADP um potente ativador da agregação plaquetária e a adenosina formada através da sua hidrólise até AMP, um potente inibidor, o resultado encontrado em plaquetas pode contribuir para uma melhor compreensão das complicações cardiovasculares descritas na menopausa. Por outro

lado, o aumento da hidrólise dos nucleotídeos encontrado no soro pode estar representando um mecanismo compensatório para a manutenção dos nucleotídeos extracelulares, na tentativa de controlar os eventos desencadeados pela privação hormonal no sangue total.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Prognóstico da topografia das ectonucleotidasas de membrana.....	9
---	----------

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina 5'-difosfato

AMP – adenosina 5'-monofosfato

AMPC – adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico

ATP – adenosina 5'-trifosfato

DHEAS – sulfato de diidroepiandrosterona

NTPDase – ecto-nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase

OVX – ovariectomía

1. INTRODUÇÃO

1.1 HORMÔNIOS ESTERÓIDES SEXUAIS E SISTEMA CARDIOVASCULAR

Os hormônios sexuais, responsáveis pelo dimorfismo sexual e reprodução, desenvolvem também importantes papéis em tecidos e órgãos que não estão diretamente envolvidos com a procriação. Estudos recentes têm demonstrado que a ausência de efeitos dos estrogênios durante a menopausa sobre tecidos não-reprodutivos como esqueleto, sistema cardiovascular e cérebro são o maior fator de risco para o desenvolvimento de osteoporose, doença coronariana, infarto, e talvez doenças neurodegenerativas como Alzheimer (MANOLAGAS & KOUSTENI, 2001).

Os efeitos dos hormônios sexuais sobre os tecidos e órgãos podem ser tanto genômicos quanto não-genômicos (WHITING et al, 2000; KELLY & LEVIN, 2001; VALVERDE & PARKER, 2002). Os efeitos genômicos são os mecanismos clássicos de ação dos hormônios esteróides que envolvem a sua ligação a receptores intracelulares, iniciando a transcrição gênica e a síntese de proteínas (BEATO et al., 1995; PARKER & WHITE, 1996). Os efeitos não-genômicos correspondem a novos mecanismos de ação dos esteróides, os quais levam a alterações rápidas nos sinais intracelulares, diferentemente dos efeitos genômicos que levam até algumas horas para se tornarem efetivos na célula. Pesquisas recentes sobre os mecanismos de ação não-genômicos postulam os efeitos dos esteróides em três diferentes níveis celulares: membrana, citosol e núcleo. Os sítios alvos na membrana incluiriam receptores esteróides similares aos receptores nucleares, receptores esteróides não-clássicos e canais iônicos ativados por voltagem e ligante. Em relação aos alvos citosólicos, acredita-se que sejam os receptores “translocadores” clássicos, sendo a resposta citosólica associada com a ativação de quinases. A ativação de ambos os alvos de membrana e citosol poderia levar, por último, a uma mudança na expressão gênica. No terceiro nível de ação estariam os alvos

nucleares, que afetariam a modulação direta da expressão gênica (VALVERDE & PARKER, 2002).

Independente do mecanismo de ação, os hormônios sexuais exercem numerosos efeitos sobre o sistema cardiovascular, alterando processos como o metabolismo de lipoproteínas, atividade antioxidante, permeabilidade celular, expressão de citocinas e moléculas de adesão, proliferação e migração de células da musculatura vascular, adesão e agregação plaquetária (MANOLAGAS & KOUSTENI, 2001). Além disso, evidências a partir de estudos em humanos e animais, têm sugerido fortemente que os estrogênios também causam vasodilatação (MENDELSON & KARAS, 1999). Atualmente, diversos estudos clínicos e laboratoriais suportam a idéia de que as mulheres estão mais propensas a desenvolver complicações cardiovasculares quando os níveis de estrogênios diminuem na menopausa, demonstrando que os efeitos dos estrogênios sobre o sistema cardiovascular são protetores. (COLDITZ et al., 1987; BARRET-CONNOR & BUSH, 1991; BAR et al., 1993; BARRET-CONNOR & GRADY, 1998; WHITE, 2002; TOSTES et al., 2003).

Numerosos trabalhos têm evidenciado o papel benéfico dos hormônios sexuais, principalmente dos estrogênios, sobre o sistema cardiovascular. Estudos recentes em cobaias demonstraram que o tratamento com estrogênios acentua a vasodilatação dependente e independente do endotélio em artérias femorais, coronarianas e cerebrais, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (WHITE, 2002). Outra pesquisa demonstrou que o ciclo menstrual e a terapia de reposição hormonal podem modular o fluxo coronariano (HIRATA et al., 2001). Além disso, baseado em estudos demonstrando o importante papel das plaquetas na patogênese da doença aterosclerótica (ROSS & GLOMSET, 1976; FUSTER ET AL., 1992; ROSS, 1999), alguns autores têm sugerido que o estrogênio pode reduzir o risco de doença cardiovascular em mulheres após a menopausa através da inibição da ativação plaquetária (BAR et al., 2000).

Evidências adicionais mostram que após a menopausa, mulheres fazendo terapia de reposição hormonal apresentam significativa diminuição da agregação plaquetária (BAR et al., 1993).

Apesar dos efeitos presumivelmente protetores dos estrogênios sobre o sistema circulatório, existem numerosos estudos que falham em demonstrar os efeitos benéficos da terapia de reposição hormonal sobre o risco de complicações cardiovasculares, sugerindo inclusive uma associação entre o aumento de eventos trombóticos e a terapia de reposição (HULLEY et al., 1998; THIJIS et al., 2002). Além disso, existem fortes evidências sugerindo que o uso prolongado de estrogênios aumenta o risco de câncer de mama e endometrial (ZUMOFF, 1993; COLDITZ, 1996; WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS, 2002).

As razões para esta ausência de efeitos benéficos ainda não são claras e diferem nos estudos com mulheres e nos modelos animais de doenças cardiovasculares. Os tratamentos escolhidos, as combinações de estrogênios com progesteronas ou estrogênios sozinhos, a rota de administração e duração do tratamento são alguns dos fatores que podem estar envolvidos nestas discrepâncias (TOSTES et al., 2003). A presença de polimorfismos em genes relacionados a eventos trombóticos (fator V Leiden, fator VII, fibrinogênio e protrombina) também tem sido implicados como uma possível razão para o risco aumentado de doenças cardiovasculares e complicações trombóticas em algumas mulheres, disfarçando os reais benefícios da terapia de reposição hormonal (SUBBIAH, 2002; TOSTES et al., 2003). Assim, investigações mais detalhadas são necessárias para confirmar os efeitos dos hormônios sexuais sobre o sistema cardiovascular.

Grande parte dos estudos relacionados às variações do estado hormonal são realizados em cobaias. Devido ao rápido ciclo estral encontrado em ratas, em média quatro dias, estes animais tornaram-se um modelo ideal para investigações das mudanças que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (SPORNITZ et al., 1999; MARCONDES et al., 2001). O ciclo

reprodutivo em ratas é caracterizado por quatro fases que podem ser determinadas através dos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (LONG & EVANS, 1922; HOAR & HICKMAN, 1975). A caracterização de cada fase é baseada na proporção entre três diferentes tipos celulares: células epiteliais, células corniformes e leucócitos. Geralmente, durante um estudo, uma fase do ciclo é escolhida para a realização de toda a investigação, isso serve como uma maneira de minimizar possíveis efeitos relativos às variações do ciclo e verificar somente os efeitos relativos ao tratamento aplicado.

O modelo de privação dos hormônios gonadais, ou seja, a ovariectomia é um modelo cirúrgico muito utilizado para estudo de possíveis efeitos decorrentes da falta de hormônios esteróides em animais. A cirurgia é feita sob anestesia e são retirados ambos os ovários através de incisões dorsais ou abdominais (LUINE et al.; 1998; FUGGER et al., 2000; FRYE & RHODES, 2002).

Quanto às terapias de reposição hormonal, existem numerosos modelos de reposição com estrogênio sozinho ou combinado com progesterona. Um dos métodos de reposição com estrogênio, em ratas foi descrito por GAMARO et al. (2003). Neste modelo, as ratas são anestesiadas e cápsulas de silicone de 15 mm contendo hormônio ou óleo de milho são implantadas subcutaneamente no dorso do animal. Estudos mostram que estas cápsulas podem gerar concentrações séricas de estradiol entre 17 e 32 pg/mL e que estas medidas permanecem constantes entre 10 e 30 dias após o implante (BROWN et al., 1990).

1.2 SISTEMA CARDIOVASCULAR E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Purinas extracelulares, como adenosina, ADP e ATP, são importantes moléculas sinalizadoras que desempenham diversas funções sobre processos biológicos (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). No sistema nervoso central, os nucleotídeos purínicos têm sido envolvidos em muitos processos fisiológicos, incluindo transmissão sináptica,

neuromodulação, neurogênese, apoptose e aprendizado (ZIMMERMANN, 1994; FREDHOLM et al., 1993; WEAVER, 1996; ABBRACCHIO et al., 1995; BONAN et al., 2000). No sistema cardiovascular as purinas atuam em processos de dilatação e contração da musculatura lisa vascular, agregação plaquetária, proliferação celular, resposta imune, inflamação e dor (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003).

Os efeitos extracelulares das purinas são exercidos através da interação com receptores localizados na superfície da membrana celular. Existem dois grupos de receptores de purinas: receptores P1, seletivos para adenosina, e P2, seletivos para ATP, UTP, ADP e UDP. Os receptores P1 são ainda divididos em quatro subtipos de acordo com propriedades moleculares, bioquímicas e farmacológicas: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, todos acoplados a proteínas-G. Baseado em diferenças na estrutura molecular e mecanismos de transdução de sinal, os receptores P2 são subdivididos em duas famílias: a família P2X ligada a um canal ionotrópico, envolvida na transmissão excitatória rápida, e a família P2Y metabotrópica, ligada a uma proteína-G (ABBRACCHIO & BURNSTOCK, 1994; FREDHOLM et al., 1994). A família P2X está subdividida em oito membros (P2X₁₋₈) e a família P2Y, em sete (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ e P2Y₁₃) (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003).

Todas as células do sistema cardiovascular expressam um ou mais subtipos de receptores de purinas (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003). Dependendo da célula e do receptor, as purinas podem desempenhar numerosos efeitos extracelulares que estão principalmente relacionados a cardioproteção. A primeira sugestão de que as purinas teriam um efeito cardioprotetor surgiu com a demonstração de que o nucleosídeo adenosina seria um mediador de vasodilatação durante hipóxia para aumentar o fluxo sanguíneo e, assim, manter o suprimento de oxigênio ao coração (BERNE, 1963). Atualmente, os efeitos da adenosina e, também, dos nucleotídeos da adenina sobre o sistema cardiovascular são amplamente reconhecidos.

Extracelularmente, o nucleotídeo ATP é uma estrutura capaz de atuar com efeitos opostos dependendo da concentração, da célula e do receptor. O ATP liberado como um co-neurotransmissor pelos nervos simpáticos, atua sobre os receptores P2X localizado nas células da musculatura vascular lisa produzindo vasoconstrição. Por outro lado, o ATP liberado pelas células endoteliais devido a hipóxia ou outras injúrias, atua nos receptores P2Y das células endoteliais para liberar óxido nítrico e produzir vasodilatação. O ATP pode ainda ser liberado para a circulação a partir de plaquetas e eritrócitos rompidos. Além disso, o ATP pode regular a reatividade plaquetária, inibindo a agregação em concentrações micromolares atuando competitivamente nos receptores P2Y₁₂ plaquetários com o ADP e estimulando, em concentrações mais baixas (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997; RALEVIC & BURNSTOCK, 2003). Entre outros efeitos relacionados ao ATP sobre o sistema cardiovascular estão: controle da proliferação celular em células endoteliais e musculares lisas, arritmia, hipertrofia cardíaca e apoptose (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003).

Na circulação, o nucleotídeo ADP está fortemente relacionado com a regulação da ativação e recrutamento das plaquetas para a formação do “botão” plaquetário, sendo a principal molécula promotora da agregação plaquetária através da interação com os receptores P2Y₁₂ (GACHET, 2001). Portanto, o ADP é uma molécula essencial para a manutenção da hemostasia e o controle dos seus níveis extracelulares através da sua degradação por nucleotidases solúveis ou de membrana plasmática, torna-se importante para a regulação de processos trombóticos. Além disso, antagonistas dos receptores P2Y₁₂ plaquetários têm sido indicados como agentes anti-trombóticos em doenças cardiovasculares (STOREY, 2001). Entre outros mecanismos, o ADP também pode atuar nos receptores P2Y₁ das células endoteliais e de músculo liso, causando dilatação (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003).

No sistema cardiovascular, o nucleosídeo adenosina, produzido principalmente pela degradação dos nucleotídeos da adenina através das enzimas nucleotidases, desempenha um

importante papel protetor, particularmente em doenças cardiovasculares. A adenosina inibe uma variedade de funções celulares incluindo agregação plaquetária através da estimulação da adenilato ciclase pelos receptores A_{2A} plaquetários (CRISTALLI et al., 1994); proliferação celular endotelial mediada pelos receptores A_{2A} e A_{2B} (BURNSTOCK, 2002); aderência dos neutrófilos ao endotélio vascular e injúria às células endoteliais (CRONSTEIN, 1996). A adenosina é ainda um potente vasodilatador através dos receptores A_2 presentes no endotélio vascular (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003).

Os múltiplos efeitos da adenosina são importantes protetores em processos como isquemia, protegendo o tecido durante a reperfusão; hipertensão, diminuindo a pressão arterial através da vasodilatação; arteriosclerose, através da vasodilatação, proliferação celular e aumento na expressão de fatores de crescimento endoteliais; taquicardia, causando bradicardia através dos receptores A_1 sinoatriais; hipóxia, aumentando o suprimento de oxigênio no local através da vasodilatação; e inflamação, através da inibição dos processos desenvolvidos pelos neutrófilos. Além disso, a adenosina ainda diminui a dor, o que pode ser mediado por receptores A_1 inibitórios expressos em nervos sensoriais (MUBAGWA et al., 1996; RALEVIC & BURNSTOCK, 2003).

Todas estas evidências sugerem a contribuição das purinas em processos envolvidos na função cardiovascular normal. Assim, distúrbios na sinalização purinérgica podem estar envolvidos em algumas doenças cardiovasculares, sendo objeto de novos estudos como possíveis alvos de estratégias terapêuticas para estas doenças (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003). Além disso, o controle dos níveis das purinas circulantes através da atividade de enzimas nucleotidases é a principal forma de manutenção da sinalização purinérgica normal, tornando-se importante na modulação dos processos fisiológicos mediados por estas moléculas.

1.3 NUCLEOTIDASES

Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular ou podem ser solúveis nos meios intra e extracelular.

Os nucleosídeos tri- e difosfatados podem ser hidrolisados por enzimas da família das E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), da família das E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase) e, também, por fosfatases alcalinas. Os nucleosídeos monofosfatados estão sujeitos a hidrólise pela 5'-nucleotidase, mas também pelas fosfatases alcalinas e por alguns membros da família das E-NPPs (ZIMMERMANN, 2001).

Em geral, as NTPDases tem seu sítio ativo voltado para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas intracelulares como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático. Todavia, existem também formas solúveis. A atividade das NTPDases tem sido especulada por estarem envolvidas em processos como neurotransmissão, função cardíaca, agregação plaquetária, adesão celular, contração e relaxamento muscular, tônus vascular, secreção de hormônios, resposta imune e crescimento celular (ZIMMERMANN, 1996).

Até o momento, seis membros da família das NTPDases têm sido identificados (Fig. 1). NTPDase1, NTPDase2 e NTPDase3 são proteínas transmembrana, ancoradas a membrana plasmática pelos terminais N-terminal e C-terminal e com o sítio ativo voltado para o espaço extracelular. Estas enzimas hidrolisam tanto os nucleotídeos das purinas como das pirimidinas, suas atividades catalíticas máximas estão adaptadas ao ambiente extracelular e requerem a presença de cátions divalentes como Ca^{2+} ou Mg^{2+} e pH próximo da neutralidade.

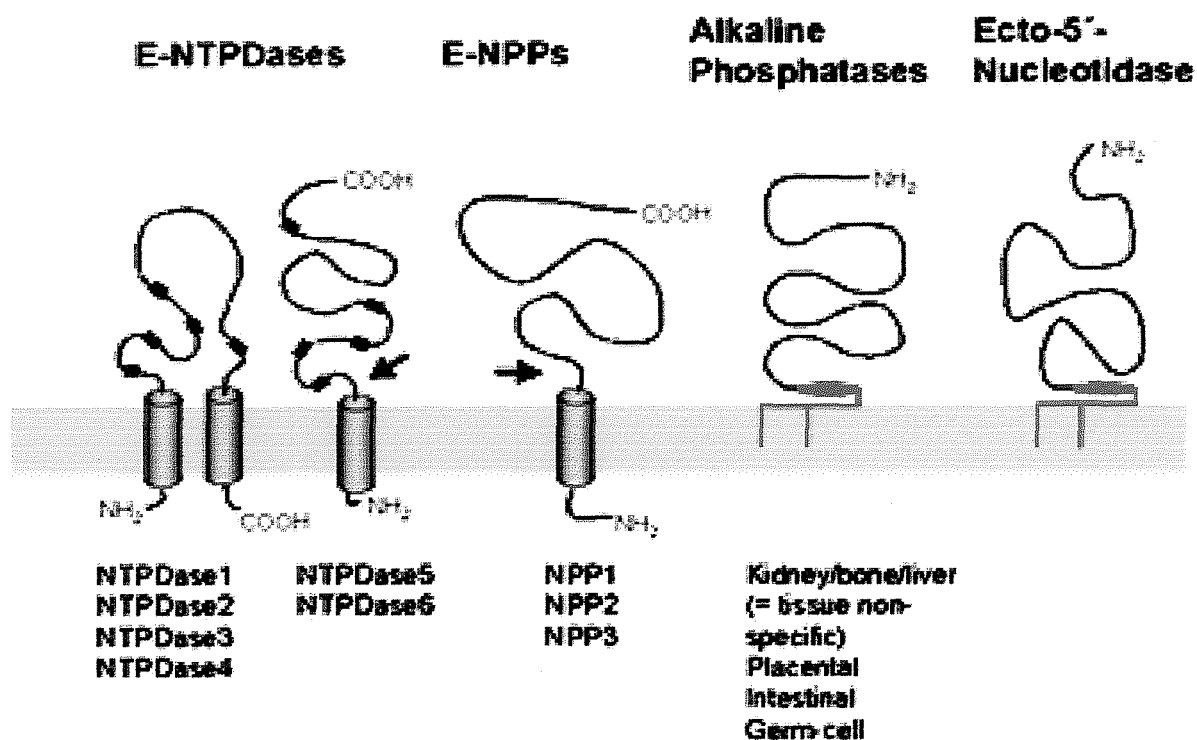


FIGURA 1: Desenho esquemático demonstrando a estrutura espacial e topografia de membrana das E-NTPDases, E-NPPases, fosfatases alcalinas e E-5'-nucleotidases. As setas indicam o ponto de clivagem para a formação das proteínas solúveis. Os pontos escuros representam as cinco regiões conservadas das apirases (ACR). Adaptado da "homepage" do Prof. Dr. Herbert Zimmermann. www.biozentrum.de/prof/zimmermann.

A especificidade pelo substrato é a principal diferença entre estas três enzimas. Assim, a NTPDase1, também conhecida como CD39, ecto-apirase ou ecto-ATP difosfohidrolase, hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, sendo a proporção de hidrólise de 1:1 e sua atividade resulta na inativação de todos os receptores P2X (ativados exclusivamente por ATP) e P2Y (ativados por ATP, ADP, UTP e UDP), gerando nucleosídeos monofosfatados (KACZMAREK et al., 1996; WANG & GUIDOTTI, 1996; ZIMMERMANN, 2001). A NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) tem uma alta preferência pelo ATP, cerca de 30:1, agindo como um produtor extracelular de ADP. A NTPDase3 (CD39L3) tem propriedades funcionais intermediárias, hidrolisando o ATP com cerca de três vezes mais eficiência do que o ADP

(SMITH & KIRLEY, 1998). Até o presente momento, as diferenças funcionais na especificidade pelo substrato e suas conseqüências específicas nas células ou tecidos não estão completamente entendidas. Porém, sabe-se que as três enzimas podem produzir diferentes impactos na sinalização purinérgica (ZIMMERMANN, 2001).

A NTPDase4 compartilha sua estrutura geral com as NTPDases1-3. Todavia as duas formas relatadas de humanos revelam uma localização celular completamente diferente. Elas têm sido localizadas no complexo de Golgi (UDPase, NTPDase4 β) e em vacúolos lisossômicos e autofágicos (NTPDase4 α).

A NTPDase5 e a NTPDase6 apresentam propriedades diferentes das outras NTPDases. Elas estão ancoradas na membrana celular somente pela porção N-terminal, não havendo ancoragem no domínio C-terminal (Fig.1). A NTPDase5 de humanos apresenta alta preferência por nucleosídeos difosfatados, principalmente GDP e UDP. Estudos com murinos sugerem que esta enzima está localizada no retículo endoplasmático, e estudos com células COS-7 humanas sugerem que esta seria uma forma secretada e, portanto solúvel. A NTPDase6 também seria uma enzima secretada solúvel, porém a origem desta enzima seria no complexo de Golgi. Acredita-se que estas enzimas, por possuírem apenas um terminal ligado à membrana, seriam facilmente liberadas para o meio extracelular. Ambas enzimas são fortemente ativadas por Ca^{2+} ou Mg^{2+} e hidrolisam nucleosídeos difosfatados com uma alta preferência. Além disso, sugere-se que as NTPDases5 e 6 participem das reações de reglicosilação envolvidas nos processos de dobramento de glicoproteínas e em processos de glicosilação no complexo de Golgi (ZIMMERMANN, 2001).

Apesar das diferenças catalíticas e de distribuição destas enzimas, todas as NTPDases apresentam cinco domínios com seqüências altamente conservadas, denominados “regiões conservadas da apirase” (Fig.1), que possivelmente participam da formação do sítio catalítico destas enzimas (HANDA & GUIDOTTI, 1996).

Os membros da família E-NPP (Fig. 1) têm uma ampla distribuição nos tecidos. As enzimas fosfodiesterases (PDEases) fazem parte desta família que é capaz de hidrolisar AMPc, ATP (produzindo AMP e PPi), ADP, NAD⁺, UDP-galactose, DNA e RNA. Além disso, a enzima 5'-nucleotídeo fosfodiesterase (EC 3.1.4.1) é capaz de hidrolisar o substrato artificial *p*-nitrofenil-5'-timidina-monofosfato (*p*-Nph-5'-TMP), gerando *p*-nitrofenol; assim este substrato serve como um marcador para a atividade desta enzima. As E-NPPs apresentam um único domínio transmembrana na porção N-terminal. A relevância fisiológica das várias enzimas desta família e dos seus substratos nos vários tecidos e células necessita ser melhor definida. Todavia, evidências têm sugerido que estas enzimas podem modular a sinalização mediada pelos receptores P2 (ZIMMERMANN, 2001). A enzima 5'-nucleotídeo fosfodiesterase foi caracterizada em soro fetal humano e tem sido utilizada como um marcador para doenças do fígado (SAKURA et al., 1998).

Amplamente distribuída em bactérias, células de plantas e tecidos vertebrados, a enzima 5'-nucleotidase ou CD73 (Fig. 1) está classificada em quatro grupos de acordo com a localização celular e as propriedades bioquímicas: uma ecto-5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática, uma forma solúvel derivada da ecto-5'-nucleotidase, e duas formas citoplasmáticas. A atividade catalítica da 5'-nucleotidase controla os níveis intracelulares e extracelulares de AMP e outros nucleosídeos monofosfatados (KAWASHIMA, 2000).

O papel das nucleotidases na fisiologia celular está se expandindo. Uma vez que estas enzimas modulam os efeitos biológicos dos nucleotídeos liberados, elas são importantes para a homeostasia, trombo-regulação e também são elementos-chave em outros aspectos da sinalização purinérgica.

Numerosos estudos têm evidenciado a importância das nucleotidases no sistema circulatório. Além de limitar a ação dos nucleotídeos nos seus receptores, estas enzimas podem evocar efeitos opostos através da ação dos produtos formados. A NTPDase1,

conforme tem sido demonstrado é a ecto-nucleotidase mais abundante na superfície luminal dos vasos sanguíneos (KACZMAREK et al., 1996; ENJYOJI et al., 1999). Por converter o ADP liberado de plaquetas ativadas, alguns estudos propõem que a NTPDase1 seja a principal molécula responsável pela inibição da agregação plaquetária no sistema circulatório, apresentando um papel chave na regulação da formação de trombos e na manutenção do fluxo sanguíneo (KACZMAREK et al., 1996; MARCUS et al., 1997; PINSKY et al., 2002; MARCUS et al., 2002). Recentemente, um estudo demonstrou os efeitos opostos e as implicações na regulação da formação de trombos de duas NTPDases, uma é a NTPDase1 localizada na superfície das células endoteliais, com a habilidade de inibir a agregação plaquetária, e a outra é a NTPDase2, expressa nas células de suporte da vasculatura e que, por hidrolisar preferencialmente ATP, liberando ADP, facilita a agregação plaquetária (SÉVIGNY et al., 2002). Este estudo demonstra um duplo papel das NTPDases na circulação sugerindo regulação espacial da sinalização mediada pelos nucleotídeos.

As NTPDases podem ainda produzir outros efeitos através da atividade conjunta com 5'-nucleotidases, hidrolisando os nucleosídeos fosfatados até os respectivos nucleosídeos. A associação destas enzimas se constitui em uma via altamente sofisticada, com o objetivo de controlar os níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos, capazes de modular uma série de processos fundamentais a nível celular em muitos tecidos e órgãos, principalmente no sistema circulatório. Assim, estas enzimas têm se tornado alvo de numerosas estratégias terapêuticas para doenças cardiovasculares.

Diversos trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório têm mostrado a importância da atividade da 5'-nucleotidase e das enzimas da família das NTPDases, caracterizando estas enzimas de diferentes origens biológicas (BATTASTINI et al., 1991; SARKIS & SALTO, 1991; FRASSETTO et al., 1993; PILLA et al., 1996; BATTASTINI et al., 1995; OSES & CARDOSO et al., 2004) além de demonstrar alterações nas atividades enzimáticas em

diversas situações fisiológicas e patológicas (BONAN et al., 1998; BONAN et al., 2000a; BONAN et al., 2000b; BONAN et al., 2001c; BRUNO et al., 2002; BRUNO et al., 2003).

1.4 NUCLEOTIDASES E HORMÔNIOS SEXUAIS

Diversos estudos têm demonstrado o efeito dos hormônios esteróides sexuais sobre a atividade de enzimas e sobre receptores de nucleotídeos. Em 1995, ZYLINSKA e colaboradores demonstraram que esteróides neuroativos (17 β -estradiol, sulfato de pregnenolona e sulfato de diidroepiandrosterona – DHEAS) são capazes de modular a atividade *in vivo* de uma Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase de membranas sinaptossomais de córtex e cerebelo de ratas. Um outro trabalho de ZYLINSKA & LEGUTKO (1998) demonstrou que esteróides neuroativos podem modular *in vitro* a atividade da mesma Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase em cultura de neurônios de ratos. O mesmo grupo demonstrou que 17 β -estradiol, sulfato de pregnenolona, DHEAS e testosterona podem modificar diretamente a atividade de uma Ca²⁺-ATPase purificada de membrana sinaptossomal de córtex de ratos (ZYLINSKA et al., 1999). NEDELJKOVIC e colaboradores (2000) mostraram o efeito da privação hormonal sobre a atividade e expressão de uma ecto-ATPase em distintas regiões cerebrais de ratas adultas. Além disso, 17 β -estradiol inibe não-genomicamente receptores P2X₇ de humanos expressos em células renais de macacos (CARIO-TOUMANIANTZ et al., 1998) e DHEAS age como um bloqueador de canal, suprimindo a atividade funcional de receptores P2 (LIU et al., 2001). SELLES e colaboradores (2001) demonstraram que os hormônios 17 β -estradiol e progesterona estimulam a atividade da enzima óxido-nítrico sintase em aorta de ratas adultas, inibindo a agregação plaquetária.

Estes resultados mostram evidências de que os hormônios sexuais podem afetar a atividade de algumas enzimas envolvidas com a hidrólise de nucleotídeos e receptores, representando novos mecanismos de regulação para estas estruturas.

2. OBJETIVOS

Considerando que um grande número de situações patológicas podem modular a atividade das enzimas que controlam os níveis de nucleotídeos da adenina na circulação, alterando diferentes sistemas biológicos e também que estudos têm demonstrado ação dos hormônios sexuais sobre a atividade de algumas enzimas de membrana, nossos objetivos foram verificar o efeito da privação dos hormônios gonadais induzida cirurgicamente, através da remoção dos ovários (ovariectomia) e da terapia de reposição hormonal com estradiol sobre a atividade das nucleotidasas de soro e ectonucleotidasas de plaquetas de ratas adultas. Além disso, nós examinamos os efeitos *in vitro* da administração de 17β -estradiol, DHEAS e pregnenolona sobre a atividade das nucleotidasas de soro das ratas como uma maneira de avaliar uma possível ação direta destes hormônios sobre as enzimas testadas.

3. ARTIGOS

3.1 CAPÍTULO 1

Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide
hydrolysis in rat blood serum

Submetido à revista *Thrombosis Research*

Dr. Jeffrey Stephen Ginsberg

Editor-in-Chief

Regular Article

**Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine
nucleotide hydrolysis in rat blood serum**

Daniela Pochmann, Bárbara Rücker, Ana M. O. Battastini and João J. F. Sarkis*

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

Word count: 3,448 words.

*Corresponding Author:

Dr. 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, Brazil.

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

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

Abstract

The low prevalence of coronary heart disease in premenopausal women and its increase after menopause are well established. Many studies have suggested that steroid hormones can inhibit platelet aggregation, reducing the cardiovascular risk. In addition a number of studies have shown an effect of estrogen on vascular function. The process of haemostasis and thrombus formation can be also affected by adenine nucleotides and adenosine. Consequently, the regulation of enzymes that hydrolyze these nucleotides in the bloodstream is essential in the modulation of the processes of platelet aggregation, vasodilatation and coronary flow. Thus, in the present study, we examined the effect of ovariectomy (OVX), estradiol replacement therapy and the *in vitro* administration of 17 β -estradiol, DHEAS and pregnenolone on the activity of the enzymes that degrade ATP, ADP and AMP in the blood serum of female rats. OVX significantly increased the hydrolysis of ATP, ADP and AMP, whilst phosphodiesterase activity was unchanged. Estradiol replacement therapy significantly decreased the hydrolysis of the adenine nucleotides and of the substrate marker of phosphodiesterase. *In vitro*, the addition of steroid hormones did not have any effect on the nucleotide hydrolysis by rat serum. These results suggest the presence of a strong relation between these enzymes and the hormonal system. In addition, the alterations observed are important, since these enzymes control the nucleotides/nucleosides ratio in the circulation and, thus, the events related to haemostasis.

Key Words: ATP diphosphohydrolase; 5'-nucleotidase; steroid hormones; cardiovascular disease; adenine nucleotides

Abbreviations: OVX, ovarian steroid hormone deprivation; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; DHEAS, dehydroisoandrosterone 3-sulfate; PREG, pregnenolone.

The importance of adenine nucleotides ATP, ADP and AMP, and their nucleoside derivative, adenosine, as structures with opposite effects is well established. Extracellular ATP is a structure capable of acting as a vasodilator or vasoconstrictor depending on its concentration and the receptor. It has been observed that micromolar concentrations of ATP inhibit platelet aggregation by both competitive and non-competitive mechanisms; however, low concentrations are stimulatory [1]. ADP is a nucleotide known to induce changes in platelet shape and aggregation via interaction of P2Y₁₂ receptors. Several authors have described the important role of these nucleotides in the process of haemostasis and thrombus formation [2-5]. The nucleoside, adenosine, produced by nucleotide degradation inhibits platelet aggregation and is also capable of acting as vasodilator in general and neuromodulator in the central nervous system.

Under normal physiological conditions, the concentration of adenine nucleotides in the blood is maintained at very low values [3]. However, the levels of extracellular ATP and ADP in the body may be increased in various inflammatory and shock conditions, primarily as a consequence of nucleotide release from disrupted platelets and also by endothelial and blood vessel cells [6-8]. Once released, these nucleotides could be metabolized rapidly to adenosine, in order to maintain homeostasis. Ecto-nucleotidases located on the plasma membranes of platelets [9, 10] and endothelial cells, together with soluble nucleotidases in the circulation, are the major effector system for rapid inactivation of circulating adenine nucleotides [3, 11].

ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) is the general designation for enzymes that hydrolyze ATP, ADP and other triphospho- and diphosphonucleosides to their equivalent monophosphonucleosides and inorganic phosphate [12]. The physiological role proposed for this enzyme, together with 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), in the circulation is the modulation of the nucleotides/nucleosides ratio. Furthermore, apyrase may inhibit platelet aggregation, promoting the ADP hydrolysis, and also control the vascular tone in combination with 5'-

nucleotidase that hydrolyzes AMP to adenosine, which is a vasodilator in the circulation. The soluble form of ATP diphosphohydrolase was recently described by our group in the serum of adult rats [13].

5'-nucleotide phosphodiesterase (EC 3.1.4.1, PDEase, NPPase) is a microsomal enzyme that releases mononucleoside-5'-phosphate from the 3'-OH terminal of the nucleotides. *p*-Nitrophenyl-5'-thymidine-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) has been used as an artificial substrate marker to 5'-nucleotide phosphodiesterase, generating *p*-nitrophenol. This enzyme is known to hydrolyze not only ATP (producing AMP and PPi) and ADP but also UDP-galactose, NAD, DNA and RNA. Thus this enzyme is, in some respects, different to the apyrase.

The regulation of these enzymes is important for the control of coronary vascular tone, microthrombus formation and coronary flow and, therefore, essential in ischaemia, cardiovascular disease and hypoxic episodes. A previous study suggested that steroid hormones can modulate the expression and activity of an ecto-ATPase in distinct brain regions of rats [14]. Furthermore, these hormones also appear to exert *in vivo* and *in vitro* effects in platelet aggregation and ATP release from platelets activated in postmenopausal women [15, 16]. Estrogen treatment enhances endothelium-dependent relaxation in femoral, coronary and cerebral arteries, but other studies have also demonstrated endothelium-independent vasodilatory responses to estrogen both *in vivo* and *in vitro* [17]. Recent research has demonstrated that menstrual cycle and estrogen replacement therapy can modulate the coronary flow [18]. It is clear that postmenopausal women demonstrate an increased risk of coronary heart disease. Therefore, the ovary hormones may participate in the control of cardiovascular and atherosclerotic disease. At present, only limited data exist regarding the effect of ovary hormones on haemostasis. Thus, the main objective of the present study was to evaluate the effects of variations in female endocrine status on the enzymes that control the

adenine nucleotides/adenosine levels in the bloodstream. For this reason, we examined the effects of gonadal steroid hormone deprivation, induced by removal of ovaries (ovariectomy), the estradiol replacement therapy and the *in vitro* administration of 17β -estradiol, dehydroisoandrosterone 3-sulfate and pregnenolone on the activity of enzymes that degrade the nucleotides ATP, ADP and AMP in the blood serum of female rats.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Nucleotides, *p*-nitrophenyl-5'-thymidine-monophosphate, 17β -estradiol, β -estradiol 3-benzoate, dehydroisoandrosterone 3-sulfate, pregnenolone and Trizma Base chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Xylazine was obtained from Coopers Brasil Ltda. and Ketamine was obtained from Agribands do Brasil Ltda. Medical grade tubing was obtained from Medicone, Multiplast, Porto Alegre, RS, Brazil. All other reagents were of analytical grade.

2.2. Animals

Adult female Wistar rats, weighing 180-250 g (approximately 70 days old), were used. Animals were housed in cages with food and water available *ad libitum* and were maintained under a 12-h light/dark cycle (light on at 07:00 h a.m.) at a room temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$. The estrous cycle was evaluated by optical microscope examination of vaginal smears, and the animals in the diestrus state were chosen for all experiments.

Procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations published by the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC).

2.3. Animal surgical procedures

For all surgical procedures, animals were anesthetized with ketamine and xylazine.

2.3.1. Hormone deprivation studies

Animals were randomly divided into three groups: a control group, a group submitted to ovariectomy (OVX) by the removal of the glands through one abdominal incision under anesthesia and a third group including sham-operated animals. Three weeks after the surgery, the animals were killed by decapitation.

2.3.2. Hormonal replacement studies

The animals were divided into a control group and a group submitted to ovariectomy. Two weeks after the surgery, a subset of the OVX animals (the OVX-ER group) were submitted to estradiol replacement. Briefly, 15 mm medical grade tubing (1.02 mm i.d. × 2.16 mm o.d.) was filled with 10 µl of 5% (w/v) β-estradiol 3-benzoate in corn oil and sealed with silicone. Capsules were soaked in sterile saline overnight and implanted subcutaneously between the scapulae under anesthesia. The rest of OVX group (OVX-oil) received sham capsules containing just oil. Three weeks after the implantation of capsules, the animals were decapitated.

2.4. Isolation of blood serum fraction

Blood samples were drawn after the decapitation, as described by Yegutkin [19], and were soon centrifuged in plastic tubes for 5 minutes at 5000 g at 20°C. Samples of serum were stored at 4°C throughout the experiments.

2.5. Measurement of ATP, ADP and AMP hydrolysis

ATP, ADP and AMP hydrolysis were determined using a modification of the method described by Yegutkin [19]. The reaction mixture containing ATP or ADP as substrate at a

final concentration of 3.0 mM, 112.5 mM TRIS-HCl, pH 8.0, was incubated with approximately 1.0 mg of serum protein at 37°C for 40 min in a final volume of 0.2 mL. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL 10% trichloroacetic acid (TCA). The samples were chilled on ice and the amount of inorganic phosphate (Pi) liberated was measured by the method of Chan et al. [20]. Incubation times and protein concentration were chosen to ensure the linearity of the reaction (results not shown). Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis were performed by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. All samples were centrifuged at 5000 g for 5 minutes to eliminate precipitated protein and the supernatant was used for the colorimetric assay. All samples were assayed in duplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomoles of P_i released per minute per milligram of protein. For AMP hydrolysis, the reaction mixture containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5. All other procedures were the same as those for the ATP and ADP hydrolysis.

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

p-nitrophenyl-5'-thymidine-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) hydrolysis was determined essentially as described by Sakura et al. [21]. The reaction mixture containing *p*-Nph-5'-TMP, as a substrate at a final concentration of 0.5 mM in 100 mM TRIS-HCL, pH 8.9, was incubated with approximately 1.0 mg of serum protein at 37°C for 5 minutes in a final volume of 0.2 mL. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL 0.2 N NaOH. 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 using an extinction coefficient of 18.8×10^{-3} /M/cm. 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 duplicate. Enzyme activities were expressed as nanomoles (nmol) of *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein.

2.7. *In vitro* assays

For *in vitro* assays, 17 β -estradiol, dehydroisoandrosterone 3-sulfate (DHEAS) and pregnenolone (PREG), at the concentrations of 1.0, 2.5, 5.0, 50, 100 and 250 μ M, were added to the reaction mixture. The 17 β -estradiol was prepared in water and stored at -20°C for less than one month. DHEAS was prepared in water before each experiment. The pregnenolone was prepared in 80% ethanol and control samples received an equivalent amount of ethanol alone.

2.8. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford [22], using bovine serum albumin as standard.

2.9. Statistical analysis

The data obtained are expressed as means \pm S.D. of at least three experiments. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA). A p value of less than 0.05 was considered to represent a significant difference.

3. Results

3.1. *Effect of hormone deprivation on nucleotidase activities*

The sham-operated group was only submitted to abdominal incision but not to removal of the ovaries. These animals were compared to the control in order to verify the effects of the surgery on the nucleotide hydrolysis.

The effects of ovarian hormone deprivation on ATP and ADP hydrolysis by serum of rats are shown in Fig. 1. When compared to controls, the sham-operated did not show

significant difference in ATP and ADP hydrolysis. On other hand, the animals submitted to OVX treatment presented significantly increased ATPase activity of the nucleotidase in 100% and 85%, when compared to control (0.907 ± 0.2 nmol P_i / min/ mg; n=14) and sham-operated animals (0.983 ± 0.24 nmol P_i / min/ mg; n=14), respectively (Fig. 1). The ADPase activity of the nucleotidase was significantly increased in OVX treatment in relation to control animals (0.884 ± 0.149 nmol P_i / min/ mg; n=14) in 86.6% and in relation to sham-operated (0.89 ± 0.21 nmol P_i /min/mg; n=14) in 85.2% (Fig. 1).

The results regarding 5'-nucleotidase, the other enzyme in the complete nucleotide hydrolysis chain, showed a similar profile of activation when compared to ATP and ADP hydrolysis. A significant increase in the 5'-nucleotidase activity was observed in the OVX of 53.87% compared to the control group (1.16 ± 0.18 nmol P_i / min/ mg; n=14) and of 44.12% in relation to the sham-operated (1.24 ± 0.19 nmol P_i / min/ mg; n=14) group. These results can be observed in Fig. 1.

Considering that a phosphodiesterase enzyme is also expressed in the blood serum Sakura et al. [21] and can also act in nucleotide hydrolysis, we evaluated the activity of this enzyme in the serum of rats using *p*-Nph-5'-TMP, an artificial substrate (marker for the phosphodiesterase activity). Fig. 2 demonstrates that there is a phosphodiesterase activity in the rat blood serum (mean \pm S.D., n=4), but that this activity is not significantly changed when compared between groups.

The importance of the difference between ATP, ADP and AMP hydrolysis, when compared with the hydrolysis of the substrate marker for the enzyme phosphodiesterase, will be addressed in the discussion.

3.2. Effect of estradiol replacement therapy on nucleotidase activities

The activities of ATP diphosphohydrolase, 5'-nucleotidase and phosphodiesterase, in serum from rats, were examined after *in vivo* treatment with estradiol.

Enzyme assays demonstrated a significant decrease of approximately 33.4% in ATP hydrolysis in OVX-ER rats when compared to control rats (1.21 ± 0.33 nmol P_i / min/ mg; n=8) and of 52% when compared to OVX-oil rats (1.68 ± 0.37 nmol P_i / min/ mg; n=8), Fig. 3. The results obtained for ADP hydrolysis showed a similar profile, with a decrease in OVX-ER rats of 40% and 57%, when compared to control animals (1.22 ± 0.37 nmol P_i / min/ mg; n=7) and OVX-oil (1.72 ± 0.31 nmol P_i / min/ mg; n=7), respectively (Fig. 3). We also observed a significant decrease in AMP hydrolysis in OVX-ER rats of 36%, compared to the control (1.54 ± 0.27 nmol P_i / min/ mg; n=8) and 51% when compared to the OVX-oil rats (2.00 ± 0.28 nmol P_i / min/ mg; n=8), Fig. 3.

The phosphodiesterase activity of OVX-ER group demonstrated a significant decrease in *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis of 18% when compared to control group (2.796 ± 0.31 nmol *p*-nitrophenol/ min/ mg; n=7) and 22.6% when compared to the OVX-oil group (2.97 ± 0.1 nmol *p*-nitrophenol/ min/ mg; n=7), Fig. 4.

The OVX-oil rats, when compared to the control rats, showed a similar profile of activities of control and OVX groups in experiments of hormone deprivation for all three nucleotides and for artificial substrate marker for the phosphodiesterase activity (above).

3.3. *In vitro* effect of 17 β -estradiol, dehydroisoandrosterone 3-sulfate and pregnenolone on nucleotide hydrolysis

The activity of ATP diphosphohydrolase, 5'-nucleotidase and phosphodiesterase were assayed with different concentrations of the hormones (1.0, 2.5, 5.0, 50, 100 and 250 μ M). 17 β -estradiol and dehydroisoandrosterone 3-sulfate did not have any significant effect on the

enzyme activities (results not shown). The hormone, pregnenolone, was prepared in 80% ethanol and compared with samples that received an equivalent amount of ethanol only. This result showed that the changes found in the nucleotide hydrolysis, with regard to pregnenolone, are related to the presence of alcohol (results not shown). Thus, the hormones studied *in vitro* did not have any effect on the nucleotide hydrolysis.

4. Discussion

In the present study, we investigate possible changes in ATPase-ADPase, 5'-nucleotidase and phosphodiesterase activities in rat blood serum following chronic steroid hormone deprivation, induced by the removal of ovaries and also estradiol replacement therapy. At the same time, we evaluate the effect *in vitro* of some hormones on nucleotide hydrolysis by rat blood serum.

We found a significant increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis (Fig. 1) in the serum of rats submitted to ovariectomy treatment. However, the treated animals (OVX) did not present changes in the hydrolysis of the substrate marker for the phosphodiesterase when compared with control and sham-operated animals (Fig. 2). On the other hand, estradiol replacement therapy (ERT) demonstrated a significant decrease in the hydrolysis of all nucleotides tested and of the substrate marker (Fig. 3 and 4).

The importance of ATP and ADP hydrolysis in the regulation of bloodstream homeostasis has been proposed by several authors [2, 3, 23-25]. In situations, such as cardiac ischaemia and hypoxia, the breakdown of circulating ATP and ADP to adenosine exerts a protective action to assure a sufficient supply of blood to vital regions of the body such as cardiac and cerebral tissues, producing prolonged vasodilatation [24]. The ADP released from aggregated or spontaneously disrupted platelets and/or hemolysed red blood cells when

hydrolyzed to AMP and adenosine may play an important role in the prevention of microthrombus formation.

The parallel increase in ATP-ADP hydrolysis and an increase in AMP hydrolysis, but not in phosphodiesterase activity, in ovariectomy treatment provide strong evidence for the possible involvement of an ATP diphosphohydrolase (for ATP and ADP hydrolysis) and a 5'-nucleotidase in the balance of nucleotides concentration in the bloodstream after removal of ovaries. Consequently, these blood serum enzymes may contribute to a decrease in platelet aggregation and increase adenosine levels, since this structure is a potent vasodilator.

In a recent paper from our group [13] we described the co-existence of a phosphodiesterase and an ATP diphosphohydrolase in rat blood serum. The presence of two enzymes (ATP diphosphohydrolase and phosphodiesterase) with the same activity in the organism may represent a double system for the maintenance of homeostasis. However, in the present study, we observed changes only in the ATP-ADP hydrolysis activities and no changes in the phosphodiesterase activity. Thus, it is possible that only one of these nucleotide-hydrolyzing activities is involved in the maintenance of the nucleotide levels in the circulation with respect to hormonal deprivation.

The effect of steroid hormone deprivation has been previously described. The expression of ecto-ATPase has been shown to be increased in the distinct brain regions of female rats submitted to ovariectomy treatment [14]. However, the effects of deprivation of ovary hormone on the ATP, ADP and AMP hydrolysis in female rats blood serum has never been demonstrated.

Additionally, we found a significant effect of estradiol replacement therapy upon the activities of the enzymes tested. In this model, the OVX-oil group showed a significant increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis and no difference in phosphodiesterase activity when compared to the control. This result was similar to that found for the OVX group in the

hormonal deprivation model. On the other hand, the OVX-ER group (which received a capsule with β -estradiol) showed a significant decrease in enzymatic activities when compared to the control and OVX-oil groups, further suggesting a relation between the hormonal system and the enzymes which hydrolyze adenine nucleotides in rat blood serum. It is interesting to note that the phosphodiesterase enzyme was also altered in this situation, showing that ERT may be affecting two systems in the maintenance of nucleotide levels. To our knowledge, no data exist in the literature regarding alterations in the activities of soluble nucleotidase enzymes in hormonal replacement models.

Steroid hormones have been known to be involved in various physiological responses. Recent research has demonstrated that estrogen exerts effects on the cardiovascular system. It has been reported that estrogen may have a cardioprotective effect on women [27-29]. Based on studies demonstrating the important role of platelets in the pathogenesis of atherosclerotic disease [30-32], some authors have suggested that estrogen may reduce the cardiovascular risk in postmenopausal women through inhibition of illicit platelet activation [33]. Additional evidence was found that postmenopausal women taking estrogen replacement therapy showed significantly lower platelet aggregation and adenosine triphosphate (ATP) release in response to ADP [15]. Taking the results obtained in this work, the alterations observed on the activities of enzymes tested in serum could be related to a compensation of the extracellular nucleotides levels in situations of increased platelet activity and cardiovascular risk, such as postmenopausal, plays an important role in the control of adequate haemostasis.

The prevailing classical hypotheses for the mechanism of steroid hormone regulation postulate their genomic actions. Recent experimental evidence indicates that some steroid hormones, apart from well-documented genomic actions, could produce non-genomic effects, and are potent modulators of the plasma membrane proteins [26]. Thus, we propose to investigate if the alterations found herein could be due to direct actions of steroid hormones

on the enzymes tested. This work showed that, when tested *in vitro*, the hormones 17β -estradiol, DHEAS and pregnenolone do not have any effect on the ATP, ADP and AMP hydrolysis and on the phosphodiesterase activity in the concentrations tested. Therefore, the precise mechanisms, by which steroid hormones can be affecting the enzymes tested in the serum, still will need be elucidated.

In conclusion, our results show changes in the enzymatic activities measured in the serum of rats submitted to ovariectomy or ERT. These results suggest an important relationship between ATP diphosphohydrolase, 5'-nucleotidase and phosphodiesterase enzymes and the hormonal system. Moreover, the effects observed on enzymes tested can represent a compensatory mechanism in order to keep a balance in extracellular nucleotides related to events such as vasodilatation, platelet aggregation and blood flow in situations of variation in hormonal status.

Acknowledgements

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

References

1. Soslau G and Youngprapakorn D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1355: 131-140.
2. Pieber M, Valenzuela MA, Kettlun AM, Mancilla M, Aranda E, Collados L, Traverso-Cori A. ATPase-ADPase activities of rat placental tissue. *Comp Biochem Physiol* 1991; 100B: 281-285.
3. Coade SB, Pearson JD. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circulation Research* 1989; 65: 531-537.
4. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature (London)* 1962; 194: 927-929.
5. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 168: 178-195.
6. Hantgan RR. A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change. *Blood* 1984; 64: 896-906.
7. Bodin P and Burnstock G. ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *J Cardiovas Pharmacol* 1996; 27(6): 872-875.
8. Dubyak GR. Purinergic signaling at immunological synapses. *J Autonon Nerv Syst* 2000; 81(1-3): 64-68.
9. Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JF. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1993; 129: 47-55.

10. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JF. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996; 7: 225-230.
11. Meghji P, Pearson JD, Slakey LL. Kinetics of extracellular ATP hydrolysis by microvascular endothelial cells from rat heart. *Biochem J* 1995; 308: 725-731.
12. Meyerhof O: The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J Biol Chem* 1945; 157: 105-109.
13. Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rucker B, Fürstenau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AMO and Sarkis JF. Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sciences*, In Press.
14. Nedeljkovic N, Djordjevic V, Horva A, Nikezic G, Kanazir DT. Effect of steroid hormone deprivation on the expression of ecto-ATPase in distinct brain regions of female rats. *Physiol Res* 2000; 49: 419-426.
15. Bar J, Tepper R, Fuchs M, Pardo J, Ovadia J. The effect of replacement therapy on platelet aggregation and ATP release in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 261-264.
16. Bar J, Lahav J, Hod M, Ben-Rafael Z, Weinberger I, Brosens J. Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release *in vitro* by 17 β -estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemos* 2000; 84: 695-700.
17. White RE. Estrogen and vascular function. *Gen Pharmacol* 2002; 38: 1-8.
18. Hirata K, Shimada K, Watanabe H, Muro T, Yoshiyama M, Takeuchi K, Hozumi T, Yoshikawa J. Modulation of coronary flow velocity reserve by gender, menstrual cycle and hormone replacement therapy. *J Amer Coll Card* 2001; 38: 1879-1884.

19. Yegutkin GG. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochem* 1997; 62: 724-28.
20. Chan K, Delfert D, Junger K.D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157: 375-380.
21. 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* 1998; 91: 83 – 89.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
23. Pearson JD, Carleton JS, Gordon JL. Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth muscle cells in culture. *Biochem J* 1980; 190: 421-429.
24. De Vente J, Velema J, Zaagsma J. Properties and subcellular localization of adenosine diphosphatase in rat heart. *Arch Biochem Biophys* 1984; 233: 180-187.
25. Fleetwood G, Coade SB, Gordon JL, Pearson JD. Kinetics of adenine nucleotide catabolism in coronary circulation of rats. *Am J Physiol* 1989; 256: H1565-H1572.
26. Zylińska L, Gromadzińska E, Lachowicz L. Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1437: 257-264.
27. Barret-Connor E and Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health* 1998; 19: 55-72.
28. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1987; 316: 1105-1110.

29. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. *N Engl J Med* 1991; 325: 756-762.
30. Ross R, Glomset J A. The pathogenesis of atherosclerosis: Part 1. *N Eng J Med* 1976; 295: 369-377.
31. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 310-318.
32. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
33. Elwood PC, Sweetnam PM. Aspirin and secondary mortality after myocardial infarction. *Lancet* ii. 1979; 1313-1315.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1: Effects of ovariectomy on ATP, ADP and AMP hydrolysis in female rat blood serum. Bars represent means \pm S.D. of fourteen animals. OVX treatment group significantly increased the ATP, ADP and AMP hydrolysis when compared to control and sham-operated animals. Significance level determined by one-way ANOVA (* $p < 0.02$).

Fig. 2: Effect of ovariectomy on *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis by the phosphodiesterase in blood serum of rats. Bars represent mean \pm S.D. of four animals. There were no significant differences between the groups ($p < 0.05$).

Fig. 3: Effects of estradiol replacement therapy (ERT) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in female rat blood serum. OVX-ER treatment group significantly decreased the ATP, ADP and AMP hydrolysis when compared to control (*) and OVX-oil animals (#). OVX-oil rats showed significant increases in the hydrolysis of the three nucleotide, when compared to control animals (*). Bars represent means \pm S.D. of at least seven animals. Significance level determined by one-way ANOVA (* $p < 0.03$ and # $p < 0.001$).

Fig. 4: Effect of ERT on *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis by the phosphodiesterase in blood serum of rats. Bars represent mean \pm S.D. of at least five animals. Significance level determined by one-way ANOVA (* $p < 0.02$).

Figure 1:

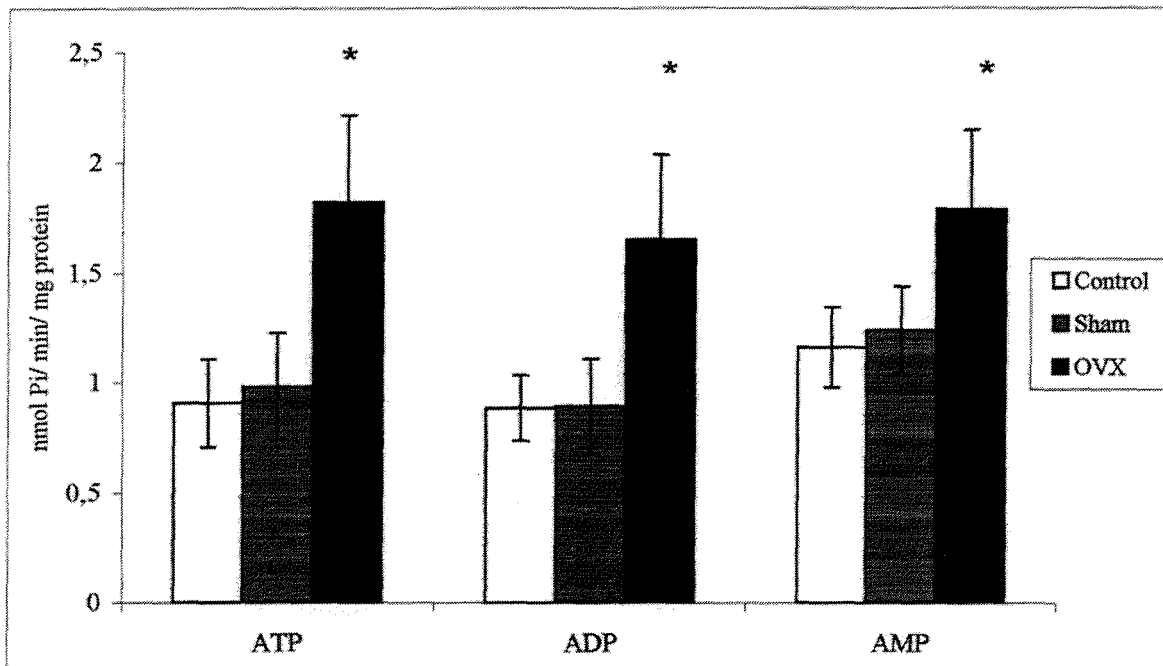


Figure 2:

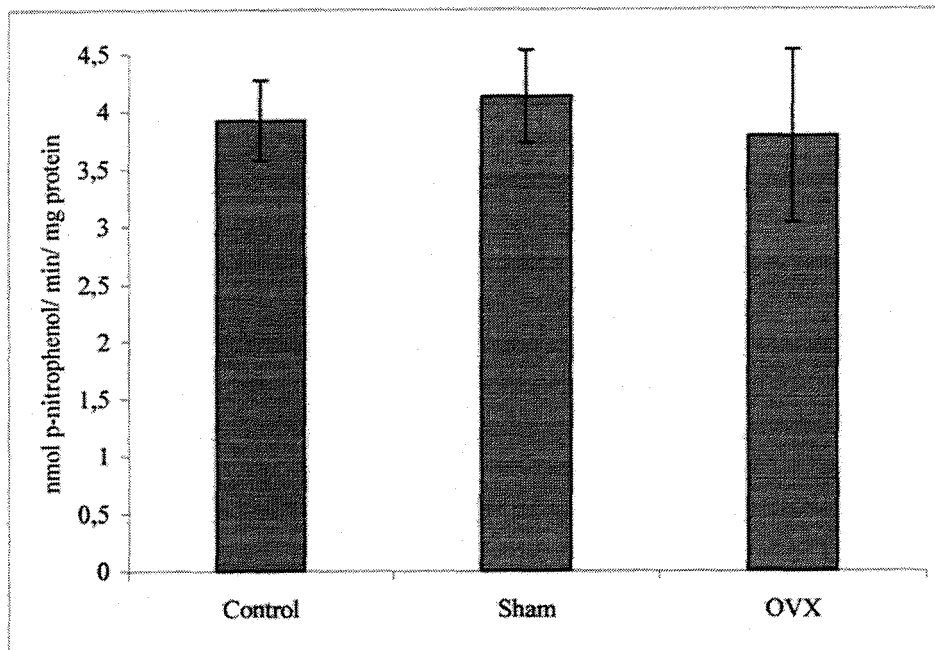


Figure 3:

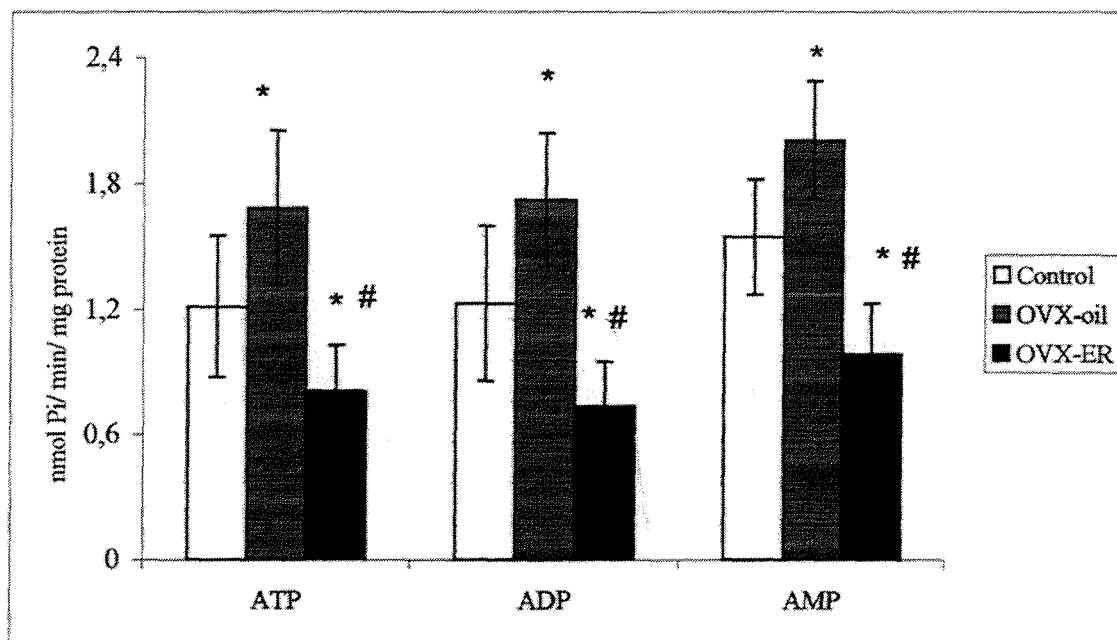
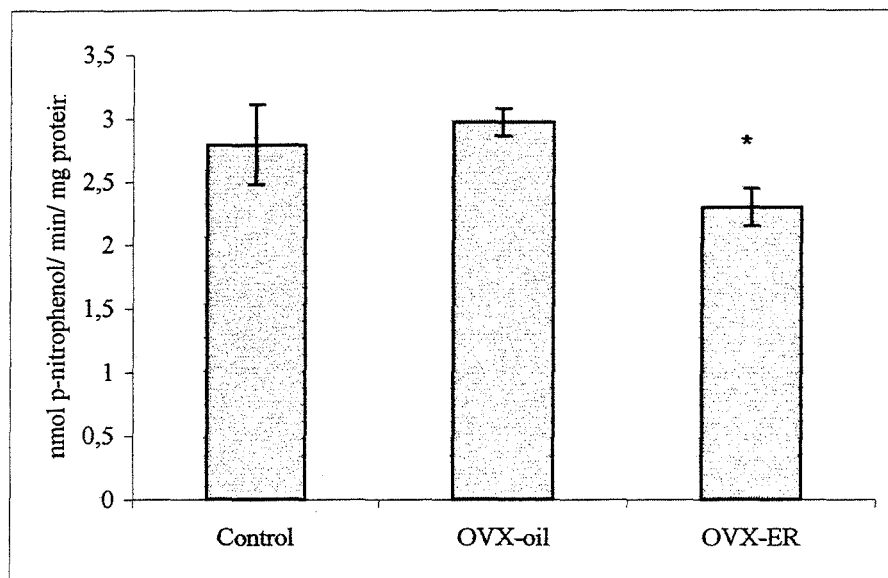


Figure 4:



3.2 CAPÍTULO 2

Ecto-hydrolysis of adenine nucleotides in rat blood platelets are altered by
ovariectomy

Submetido à revista *Endocrine*

Title page**Ecto-hydrolysis of adenine nucleotides in rat blood platelets are altered by
ovariectomy**

Daniela Pochmann, Ana Elisa Böhmer, Alessandra Nejar Bruno, Ana M. O. Battastini and
João J. F. Sarkis*

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

***Corresponding Author:**

Dr. 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, Brazil.
FAX: +55 51 3316 5540, PHONE: + 55 51 3316 5554
e-mail: jjsarkis@plug-in.com.br

Abstract

Evidences suggested that estrogen is associated with reducing of cardiovascular disease risk throughout inhibition of platelet aggregation and action on vascular function. The process of haemostasis can be also affected by adenine nucleotides and adenosine. Consequently, the regulation of enzymes that hydrolyze these nucleotides in the bloodstream is essential in the modulation of the processes of platelet aggregation, vasodilatation and coronary flow. Ecto-ATP diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase from platelets are enzymes related to the nucleotide hydrolysis. In the present study, we examined the effect of ovariectomy (OVX) and estradiol replacement therapy (ERT) on the activity of the enzymes that degrade adenine nucleotides in platelets of female rats. OVX group significantly decrease the hydrolysis of ATP, ADP and AMP of 42%, 52% and 29.3%, respectively when compared to control group. Besides, ERT did not revert the inhibition of the nucleotide hydrolysis observed in OVX rats. Our findings indicate that the hormonal deprivation affects the ATP, ADP and AMP hydrolysis by platelets and consequently the level of these nucleotides and adenosine in the circulation. Since, ADP is the most important platelet agonist and recruiting agent present in the microenvironment of the thrombus, the inhibition founded can contributes to a better comprehension of the cardiovascular complications described in alterations of sexual hormonal status.

Key Words: ecto-ATP diphosphohydrolase; ecto-5'-nucleotidase; steroid hormones; cardiovascular disease; adenine nucleotides

Introduction

Sexual hormones have been known to be involved in various physiological responses. The effects of estrogen on the female reproductive system are well known but other important actions, such as on haemostasis, needs to be clarified. Recent studies are concerned in estrogen actions on the circulatory system, particularly on the vasculature and platelet activity. This interest is related mainly to evidences that the estrogen reduces the risk of development of cardiovascular complications, playing a protective role on cardiovascular system (1-7). Estrogen treatment enhances endothelium-dependent relaxation in femoral, coronary and cerebral arteries, but other studies have also demonstrated endothelium-independent vasodilatory responses to estrogen both *in vivo* and *in vitro* (3). Recent research has demonstrated that menstrual cycle and estrogen replacement therapy can modulate the coronary flow (8). Based on studies demonstrating the important role of platelets in the pathogenesis of atherosclerotic disease (9-11), some authors have suggested that estrogen may reduce the cardiovascular risk in postmenopausal women through inhibition of illicit platelet activation (12). Additional evidence was found that postmenopausal women taking estrogen replacement therapy showed significantly lower platelet aggregation and adenosine triphosphate (ATP) release in response to stimulation by ADP (4). It is clear that postmenopausal women demonstrate an increased risk of coronary heart disease. Therefore, the ovary hormones may participate in the control of cardiovascular and atherosclerotic disease.

The maintenance of the normal vascular function also has been related with the purinergic system (13). The adenine nucleotides ATP, ADP and AMP, and their common nucleoside derivative adenosine are involved in many of the haemostatic mechanisms that became prominent at sites of vascular injury (14). ATP is a structure capable of acting as a vasodilator or vasoconstrictor depending on its concentration and the binding receptor. On the

other hand, ADP is a potent platelet-recruiting factor inducing platelet aggregation via interaction of platelet P2Y₁₂ receptors (15). Accordingly, antagonists of P2Y₁₂ receptor have been indicated as an antithrombotic agent (16). The nucleoside, adenosine, produced by adenine nucleotides degradation inhibits platelet aggregation and is also capable of acting as vasodilator in general and neuromodulator in the central nervous system.

Control of circulating nucleotide and nucleoside levels is important in the maintenance of physiological nucleotide-mediated signaling processes (17-19). Extracellular nucleotides can be regulated by the action of the ecto- and soluble nucleotidases, including the enzymes of E-NTPDase family (19). Ecto-ATP diphosphohydrolase (ecto-apyrase, EC 3.6.1.5) is a member of NTPDase family that hydrolyzes ATP, ADP and other triphospho- and diphosphonucleosides to their equivalent monophosphonucleosides and inorganic phosphate (19, 20). Over the last few years our group has been demonstrate apyrase activities in synaptosomes from the central (21) and peripheral nervous system (22), rat (23) and human platelets (24), rat brain synaptic plasma membranes (25) and rat blood serum (26). In vertebrates, the physiological role proposed for this enzyme is regulation of the relative concentration of extracellular nucleotides. Furthermore, apyrase may inhibit platelet aggregation when proaggregatory ADP is hydrolyzed, playing a role in thromboregulatory and haemostatic processes (27, 28).

Ecto-5'-nucleotidase (CD 73; EC 3.1.3.5) also participates in adenine nucleotides metabolism. The AMP, produced by ATP and/or ADP degradation, to adenosine also contributes to the maintenance of the vascular system homeostasis, once that adenosine is a structure able to promote a potent vasodilatation (29) and inhibition of platelet aggregation (30).

Considering that a number of pathological situations may modulate the activities of these enzymes (31,32), alter different biological systems and processes, and also that studies

have demonstrate the modulation *in vivo* and *in vitro* of some enzymes by sexual hormones (33,34), the present study intends investigate the influence of variations in female endocrine status on the adenine nucleotide hydrolysis by rat platelets. For this reason, we examined the effects of gonadal steroid hormone deprivation, induced by removal of ovaries (ovariectomy) and the estradiol replacement therapy on the activity of enzymes that degrade the nucleotides ATP, ADP and AMP on the surface of platelets of female rats.

Results

The sham-operated group was only submitted to abdominal incision but not to removal of the ovaries. These animals were compared to the control in order to verify the effects of the surgery on the nucleotide hydrolysis.

The effects of ovarian hormone deprivation on ATP and ADP hydrolysis in platelets are shown in Fig. 1. When compared to controls, the sham-operated did not show significant difference in ATP and ADP hydrolysis. On other hand, the animals submitted to OVX treatment presented significantly decreased ATPase activity of the nucleotidase in 47.2% and 47%, when compared to control (8.488 ± 0.705 nmol P_i / min/ mg; mean \pm S.D., n=8) and sham-operated animals (8.465 ± 1.318 nmol P_i / min/ mg; mean \pm S.D., n=7), respectively (Fig. 1). Similarly to results obtained to ATP, the ADPase activity of the nucleotidase was significantly decreased in OVX treatment in relation to control animals (3.827 ± 0.261 nmol P_i / min/ mg; mean \pm S.D., n=8) in 52.1% and in relation to sham-operated (3.798 ± 0.555 nmol P_i /min/mg; mean \pm S.D., n=8) in 51.7% (Fig. 1). Then, these results show a marked inhibition of the ecto-ATP diphosphohydrolase from rat platelets (23).

The results regarding ecto-5'-nucleotidase, the other enzyme of platelets involved in the complete nucleotide hydrolysis chain able to hydrolyze ATP to adenosine in the circulation, showed a similar profile of inhibition when compared to ATP and ADP

hydrolysis. A significant decrease in the ecto-5'-nucleotidase activity 29.8% was observed in the OVX group when compared to the control group (2.188 ± 0.3 nmol P_i / min/ mg; mean \pm S.D., n=9) and of 29.7% in relation to the sham-operated group (2.184 ± 0.316 nmol P_i / min/ mg; mean \pm S.D., n=7). These results can be observed in Fig. 2.

The activities of ecto-ATP diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase, in platelets from rats, were also examined after *in vivo* treatment with estradiol.

The ATP, ADP and AMP hydrolysis in OVX-ER group was not altered in comparison to OVX-oil group, Fig. 1 and 2. When compared to control group, the ATP, ADP and AMP hydrolysis founded in OVX-ER group was decreased in 49.3%, 47.2% and 29.8%, respectively. These results demonstrate that hormonal replacement therapy with estradiol don't revert the inhibition in the nucleotides hydrolysis caused by ovariectomy. OVX-oil and OVX-ER groups, when compared to the control rats, showed a similar profile of activities of OVX group.

Discussion

A great number of epidemiological data support the idea of an antiatherogenic effect of estrogen, prompting recommendations for their widespread use in postmenopausal replacement therapy (1-7). However, the mechanism of action of female gonadal steroids on the endothelium and platelets remains to be clearly elucidated. Vascular disorders can also be associated to an unbalance in the adenine nucleotides levels (14); however, the sexual hormones effects on the adenine nucleotides metabolism in platelets, still not had been studied.

The enzymes ecto-ATP diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase are located in the external face of membrane of a number of cells from vascular system and represent one of the most important mechanisms for control of extracellular ATP, ADP and AMP levels in the

bloodstream (19). Thus, in the present study, we investigated possible changes in ATP, ADP and AMP ecto-hydrolysis by rat platelets following chronic steroid hormone deprivation, induced by the removal of ovaries and also in estradiol replacement therapy.

We have demonstrated a significant decrease in ATP, ADP and AMP hydrolysis (Fig. 1) in the platelets of rats submitted to ovariectomy treatment. Many studies have established the role of platelets in atherosclerosis and cardiovascular disease (9-11); moreover, researches have demonstrated association between increase of platelet activation and the lack of estrogen after menopause (4-6, 12). It is clear that estrogen reduces atherosclerosis by reducing low-density lipoproteins and inflammatory processes in the vasculature, and may also act as an antioxidant and vasodilator (3); however, our results seems to be revealing another important mechanism which the hormone can act in the bloodstream.

The nucleotides ATP, ADP, AMP and the nucleoside adenosine are also involved in modulation of platelet reactivity and coronary vascular tone (15,16). Therefore, the regulation of the enzymes that control the levels of these adenine nucleotides and adenosine is important for the control of the haemostatic processes (13, 36-40). Thus, the inhibition found for ATP and ADP hydrolysis in platelets after hormonal deprivation could enhance the ATP-induced vasoconstriction (41) and platelet the aggregation mediated by ADP, the most potent platelet agonist (42). In addition, the inhibition of AMP hydrolysis may contribute to a decrease in adenosine levels, a structure that have a number of cardiovascular protective effects such as vasodilatation and inhibition of platelet aggregation (14). Then, the effects of hormonal deprivation on the platelet ecto-ATP diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities could contribute to the comprehension of some menopause adverse events.

The effect of sexual hormone deprivation on enzyme activities has been previously described. In a recent study, the expression of ecto-ATPase has been show to be increased in distinct brain regions of female rats submitted to ovariectomy treatment (39). However, the

effect of ovary hormone deprivation on the ATP, ADP and AMP hydrolysis has never been demonstrated in platelets of female rats.

Additionally, the estradiol replacement therapy (ERT) adopted did not revert the inhibition demonstrate for hormonal deprivation in the hydrolysis of all nucleotides tested (Fig. 2). In this model, the OVX-oil group (which received sham capsules) and the OVX-ER group (which received a capsule with β -estradiol) showed a significant decrease in ATP, ADP and AMP hydrolysis when compared to control. This result was similar to that found for the OVX group in the hormonal deprivation model (Fig. 1).

Although many studies indicate that estrogen exerts beneficial effects on the circulatory system (1-7), the hormonal replacement therapy needs to be more studied in the sense to clarify their effects. There are several studies suggesting a reduced risk of cardiovascular events in women taking hormonal replacement therapy (5,7); in contrast others published results reveal an increase of the thrombosis risk (43). In the present study, the treatment chosen did not shown any effect on the adenine nucleotides hydrolysis in platelets from rats; however other treatments with hormonal combinations, needs to be tested in order to verify your effects on the enzymes that control the adenine nucleotides ratio in the extracellular medium, since that menopause women take different proportions of estrogens and combinations of estrogen and progesterone.

In conclusion, our findings suggest an important relationship between ecto-ATP diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase enzymes and the hormonal system. Moreover, only the deficit of gonadal steroid hormones affects the enzymes that hydrolyze the adenine nucleotides. In addition, these results can indicate a novel mechanism for sexual hormones action, establish a relation between the purinergic system and disturbs of hormonal status; which could be important for a better understanding of the thrombotic effects of sexual

hormones and the increase of the risk of cardiovascular diseases during the postmenopausal period.

Materials and Methods

Chemicals

Nucleotides, β -estradiol 3-benzoate and Trizma Base chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Xylazine was obtained from Coopers Brasil Ltda. and Ketamine was obtained from Agribands do Brasil Ltda. Medical grade tubing was obtained from Medicone, Multiplast, Porto Alegre, RS, Brazil. All other reagents were of analytical grade.

Animals

Adult female Wistar rats, weighing 180-250 g (approximately 70 days old), were used. Animals were housed in cages with food and water available *ad libitum* and were maintained under a 12-h light/dark cycle (light on at 07:00 h a.m.) at a room temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$. The estrous cycle was evaluated by optical microscope examination of vaginal smears, and the animals in the diestrus state were chosen for all experiments.

Procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations published by the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC).

Animal surgical procedures

For all surgical procedures, animals were anesthetized with ketamine and xylazine.

Hormone deprivation studies

Animals were randomly divided into three groups: a control group, a group submitted to ovariectomy (OVX) by the removal of the glands through one abdominal incision under anesthesia and a third group including sham-operated animals. Three weeks after the surgery, the animals were killed by decapitation.

Hormonal replacement studies

The animals were divided into a control group and a group submitted to ovariectomy. Two weeks after the surgery, a subset of the OVX animals (the OVX-ER group) were submitted to estradiol replacement. Briefly, 15 mm medical grade tubing (1.02 mm i.d. × 2.16 mm o.d.) was filled with 10 µl of 5% (w/v) β-estradiol 3-benzoate in corn oil and sealed with silicone. Capsules were soaked in sterile saline overnight and implanted subcutaneously between the scapulae under anesthesia (43). Previous studies show that these capsules generate serum levels of estradiol between 17 and 32 pg/mL, and measurements at 10 and 30 days post-implantation have shown no significant change in circulating levels over these times (44, 45). The rest of ovariectomized rats received sham capsules containing just oil and was called OVX-oil. Three weeks after the implantation, the animals of the three groups were decapitated.

Platelet isolation

Platelets were isolated exactly as described previously by Hantgan, 1984 (46). Intact platelets were separated from plasma by means of gel filtration on a 1.5 X 7.0 cm Sepharose 2B column (Tangen et al., 1971). The column was equilibrated with a buffer consisting of 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 5.5 mM dextrose, 0.2 mM EGTA and 0.05g% azide, pH 6.8 (Ca²⁺-free Tyrode's Buffer). Platelets were eluted with the same buffer at room temperature; 0.5 mL fractions were collected and the tubes containing the maximum platelet count (determined visually) were used for subsequent experiments.

Enzyme assays

The reaction medium used to assay ATP and ADP hydrolysis in platelet preparation contained 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM CaCl₂ and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 µL. For the AMP hydrolysis measurement, the

reaction medium used was the same that the described above, except that 5.0 mM CaCl₂ was replaced by 5.0 mM MgCl₂.

About 20 µg of platelet preparation was added to the reaction medium and preincubated for 10 minutes at 37°C. Enzyme reaction was started by the addition of ATP, ADP or AMP to a final concentration of 0.5 mM and incubated for 60 minutes. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the reaction. The reaction was stopped by the addition of 10% trichloroacetic acid (TCA) and the amount of Pi liberated was measured by the method of Chan *et al.*, 1986 (47). Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct the nonenzymatic hydrolysis. All samples were assayed in triplicate. Enzyme activities were expressed as nanomoles of P_i released per minute per milligram of protein.

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (48), using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

The data obtained are expressed as means ± S.D of at least six experiments. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Duncan's post-hoc. A p value of less than 0.05 was considered to represent a significant difference.

Acknowledgements

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

References

1. Barret-Connor, E. and Bush, T.L. (1991). *J. Am. Med. Assoc.* **265**, 1861-1867.
2. Tostes, R.C. et al. (2003). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36(9)**, 1143-1158.
3. White, R.E. (2002). *Gen. Pharmacol.* **38**, 1-8.
4. Bar, J., Tepper, R., Fuchs, M., Pardo, J., Ovadia, J. (1993). *Obstet. Gynecol.* **81**, 261-264.
5. Barret-Connor, E. and Grady, D. (1998). *Annu. Rev. Public. Health.* **19**, 55-72.
6. Colditz, G.A., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rosner, B., Speizer, F.E., Hennekens, C.H. (1987). *N. Engl. J. Med.* **316**, 1105-1110.
7. Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., et al. (1991). *N. Engl. J. Med.* **325**, 756-762.
8. Hirata, K., Shimada, K., Watanabe, H., Muro, T., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Hozumi, T., Yoshikawa, J. (2001). *J. Amer. Coll. Card.* **38**, 1879-1884.
9. Ross, R., Glomset, J. A. (1976). *N. Eng. J. Med.* **295**, 369-377.
10. Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., Chesebro, J.H. (1992). *N. Engl. J. Med.* **326**, 310-318.
11. Ross, R. (1999). *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126.
12. Bar, J., Lahav, J., Hod, M., Ben-Rafael, Z., Weinberger, I., Brosens, J. (2000). *Thromb. Haemos.* **84**, 695-700.
13. Coade, S.B., Pearson, J.D. (1989). *Circ. Res.* **65**, 531-537.
14. Ralevic, V. and Burnstock, G. (2003). *Drugs News Perspect.* **16 (13)**, 133-140.
15. Gachet, C. (2001). *Thromb. Haemost.* **86**, 222 -232.
16. Burnstock, G. and Williams, M. (2000). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295 (3)**, 862 - 869.
17. Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Islam, N., Alyonycheva, T.N., Safier, L.B., Hajjar, K.A., Posnett, D.N., Schoenborn, M.A., Schooley, K.A., Gayle, R.B. and Maliszewski, C.R. (1997). *J Clin. Invest.* **99**, 1351-1360.

18. Birk, A.V., Broekman, J., Gladek, E.M., Robertson, H.D., Drosopoulos, J.H.F., Marcus, A.J., Szeto, H.H. (2002). *J. Lab. Clin. Med.* **140(3)**, 166-175.
19. Zimmermann, H. (2001). *Drug Development Research* **52**, 44-56.
20. Meyerhof, O. (1945). *J. Biol. Chem.* **157**, 105-109.
21. Battastini, A.M.O., Rocha, J.T.B., Barcellos, C.K., Dias, R.D. and Sarkis, J.J.F. (1991). *Neurochem. Res.* **16**, 1303-1310.
22. Sarkis, J.J.F., Salto, C. (1991). *Brain Res. Bull.* **26**, 871-876.
23. Frassetto, S.S., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F. (1993). *Mol. Cell. Biochem.* **129**, 47-55.
24. Pilla, C., Emanuelli, T., Frassetto, S.S., Battastini, A.M.O., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F. (1996). *Platelets* **7**, 225-230.
25. Battastini, A.M.O., Oliveira, E.D., Moreira, C.M., Bonan, C.D., Sarkis, J.J.F., Dias, R.D. (1995). *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **37**, 209-219.
26. Oses, J.P., Cardoso, C.M., Germano, R.A., Kirst, I.B., Rücker, B., Fürstenau, C.R., Wink, M.R., Bonan, C.D., Battastini, A.M.O. and Sarkis, J.J.F. (2004). *Life Sciences* **74 (26)**, 3275-3284.
27. Pinsky, D.J., Broekman, M.J., Peschon, J.J., Stocking, K.L., Fujita, T., Ramasamy, R., Connolly Jr., E.S., Huang, J., Kiss, S., Zhang, Y., Choudhri, T.F., McTaggart, R.A., Liao, H., Drosopoulos, J.H.F., Price, V.L., Marcus, A.J. and Maliszewski, C.R. (2002). *J. Clin. Invest.* **109**, 1031-1040.
28. Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H.F., Islam, N., Pinsky, D.J., Sesti, C. and Levi, R. (2002). *J. Pharm. Exp. Ther.* **305(1)**, 9-16.
29. Rongen, G.A., Floras, J.S., Lenders, J.W., Thien, T., Smits, P. (1997). *Clin. Sci. (Lond)*. **92 (1)**, 13-24.
30. Kawashima, Y., Nagasawa, T., Ninomiya, H. (2000). *Blood* **96 (6)**, 2157-62.

31. Lunkes, G.I., Lunkes, D., Stefanello, F., Morsch, A., Morsch, V.A., Mazzanti, C.M. and Schetinger, M.R.C. (2003). *Thrombosis Research* **109**, 189-194.
32. Bruno, A.N., Oses, J.P., Amaral, O., Coitinho, A., Bonan, C.D., Battastini, A.M.O., Sarkis, J.J.F. (2003). *Molecular Brain Research* **114**, 140-145.
33. Zylińska, L., Gromadzińska, E., Lachowicz, L. (1999). *Biochim. Biophys. Acta* **1437**, 257-264.
34. Nedeljkovic, N., Djordjevic, V., Horva, A., Nikezic, G., Kanazir, D.T. (2000). *Physiol. Res.* **49**, 419-426.
35. Kaczmarek, E., Koziak, K., Sévigny, J., et al. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 33116-33122.
36. Pieber, M., Valenzuela, M.A., Kettlun, A.M., Mancilla, M., Aranda, E., Collados, L., Traverso-Cori, A. (1991). *Comp. Biochem. Physiol.* **100B**, 281-285.
37. Pearson, J.D., Carleton, J.S., Gordon, J.L. (1980). *Biochem. J.* **190**, 421-429.
38. De Vente, J., Velema, J., Zaagsma, J. (1984). *Arch. Biochem. Biophys.* **233**, 180-187.
39. Fleetwood, G., Coade, S.B., Gordon, J.L., Pearson, J.D. (1989). *Am. J. Physiol.* **256**, H1565-H1572.
40. Konishi, C., Naito, Y. and Ohara, N. (1999). *Life Sci.* **64**, 1265-73.
41. Puri, R.N. and Colman, R.W. (1997). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 437-502.
42. Thijs, A., van Baal, W.M., van der Moren, M.J., Kenemans, P., Dräger, A.M., Huijgens, P.C. and Stehouwer, C.D.A. (2002). *European Journal of Clinical Investigation* **32**, 613-618.
43. Gamaro, G.D., Prediger, M.E., Lopes, J.B., Dalmaz, C. (2003). *Pharmacol. Biochem. Behav.* **76**, 327-333.
44. Brown, T.J., MacLusky, N.J., Shanabrough, M., Naftolin, F. (1990). *Endocrinol.* **126**, 2965-2972.
45. Luine, V.N., Richards, S.T., Wu, V.Y., Beck, K.D. (1998). *Horm. Behav.* **34**, 149-162.
46. Hantgan, R. R. (1984). *Blood* **64**, 896 – 906.

47. Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D. (1986). *Anal. Biochem.* **157**, 375-380.
48. Bradford, M.M. (1976). *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1: Effects of ovariectomy and estradiol replacement therapy (ERT) on ATP and ADP hydrolysis in platelets of female rats. OVX treatment group significantly decreased the ATP and ADP hydrolysis when compared to control and sham-operated animals. OVX-ER treatment did not revert the inhibition of adenine nucleotides hydrolysis found after the ovariectomy. In comparison to respectively control the OVX-ER rats showed a similar profile of inhibition of OVX-oil animals. Bars represent means \pm S.D. of at least five animals. Significance level determined by one-way ANOVA (* $p < 0.002$).

Fig. 2: Effects of ovariectomy and estradiol replacement therapy on ecto-5'-nucleotidase activity from rat platelets. The results regarding ecto-5'-nucleotidase showed a similar profile of inhibition when compared to ATP and ADP hydrolysis. Bars represent means \pm S.D. of at least five animals. Significance level determined by one-way ANOVA (* $p < 0.002$).

Fig. 1

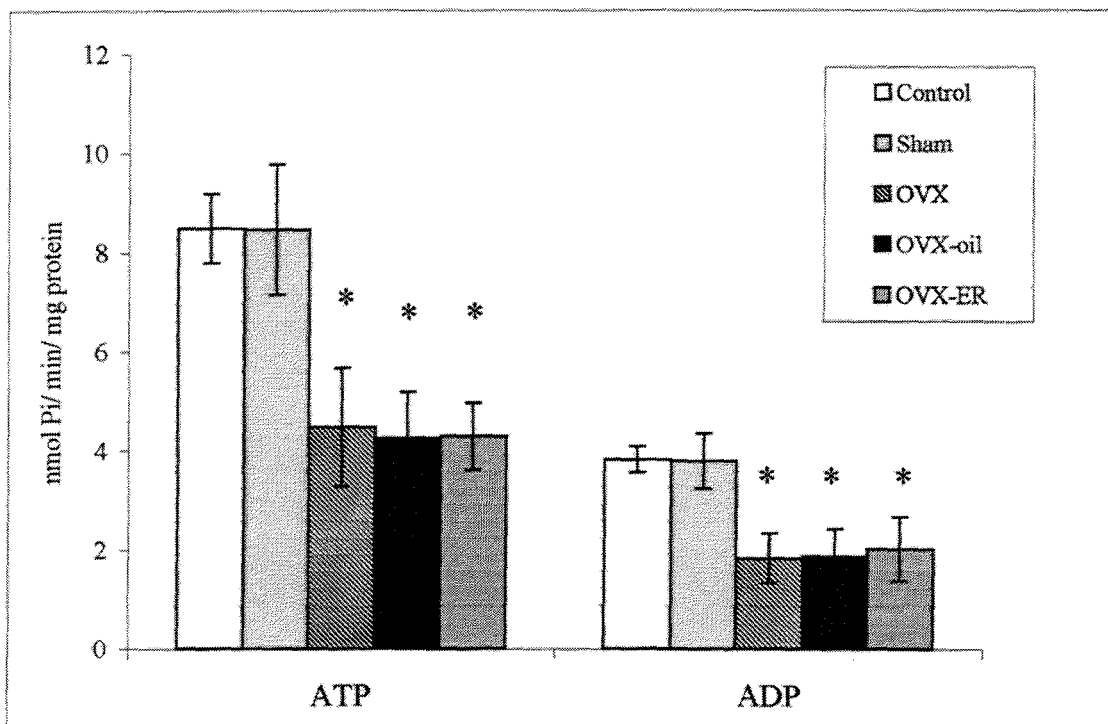
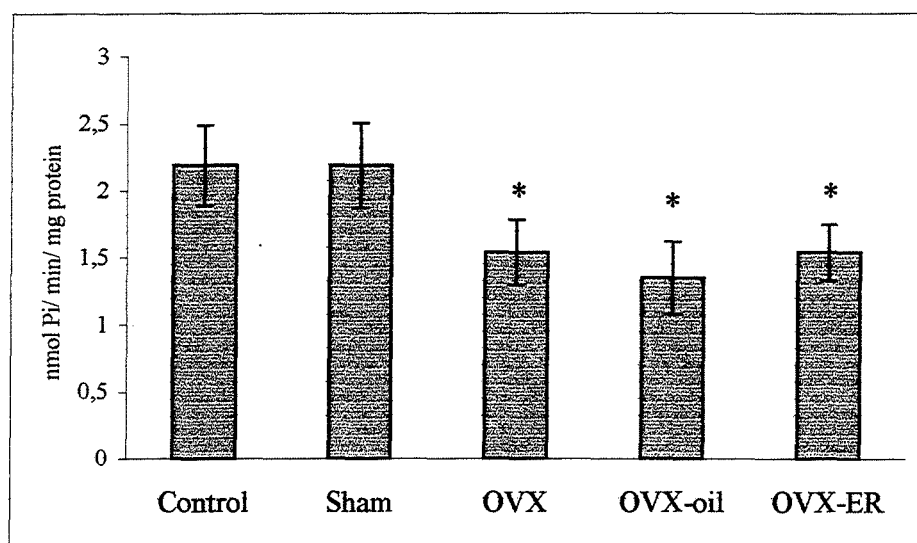


Fig. 2



4. DISCUSSÃO

Numerosos estudos postulam a idéia do papel protetor dos estrogênios sobre o sistema cardiovascular (COLDITZ et al., 1987; BARRET-CONNOR & BUSH, 1991; STAMPFER et al., 1991; BAR et al., 1998; BARRET-CONNOR & GRADY, 1998; WHITE, 2002; TOSTES et al., 2003). Todavia, os mecanismos precisos de ação dos hormônios esteróides sexuais sobre o sistema cardiovascular, particularmente sobre o endotélio vascular e plaquetas ainda necessita ser mais claramente elucidado. Desordens vasculares também podem estar associadas a níveis alterados dos nucleotídeos da adenina no sistema cardiovascular (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003); contudo, os possíveis efeitos dos hormônios sexuais sobre o metabolismo dos nucleotídeos da adenina em soro e plaquetas de ratas ainda não foram demonstrados. As enzimas nucleotidases localizadas nas membranas plasmáticas de numerosas células ou solúveis no meio intersticial representam o mais importante mecanismo de controle dos níveis de ATP, ADP e AMP na circulação, sendo a sua regulação importante para a hemostasia, trombo-regulação e outros aspectos da sinalização purinérgica (ZIMMERMANN, 2001).

No presente estudo, investigamos os efeitos da privação dos hormônios gonadais (ovariectomia) e da terapia de reposição hormonal com estradiol sobre as enzimas que degradam ATP, ADP e AMP em soro e plaquetas de ratas. Além disso, avaliamos os efeitos *in vitro* de alguns hormônios sexuais sobre a hidrólise de nucleotídeos no soro das ratas.

Nossos resultados demonstraram alterações na hidrólise de ATP, ADP e AMP em plaquetas de ratas submetidas à remoção dos ovários e com terapia de reposição de estradiol. A ausência dos hormônios gonadais diminuiu significativamente a hidrólise dos três nucleotídeos testados quando comparado aos grupos controle (fase de diestro) e sham-operados, mostrando que estes efeitos se devem a privação hormonal e que não há nenhum efeito proveniente do estresse da cirurgia.

Numerosos estudos têm estabelecido o papel das plaquetas na patologia da aterosclerose e doenças cardiovasculares (ROSS & GLOMSET, 1976; FUSTER et al., 1992; ROSS, 1999); além disso, outras pesquisas têm demonstrado associação entre o aumento da ativação plaquetária e a ausência de estrogênios após a menopausa (BARRET-CONNOR & GRADY, 1998; BAR et al., 2000). Evidentemente, os estrogênios podem reduzir a aterosclerose através da diminuição das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de processos inflamatórios no sistema vascular, além da modulação das atividades antioxidantes e de vasodilatação (WHITE, 2002); contudo, nossos resultados parecem revelar outro importante mecanismo pelo qual os hormônios sexuais atuam na circulação.

As inibições encontradas para a hidrólise de ATP e ADP nas plaquetas após a remoção dos ovários poderiam acentuar a vasoconstrição induzida pelo ATP (KONISHI et al., 1999) e a agregação plaquetária mediada pelo ADP, que é o mais potente agonista plaquetário (PURI & COLMAN, 1997; GACHET, 2001), uma vez que, estariam disponibilizados níveis mais altos destes nucleotídeos na circulação. Em adição, a inibição da hidrólise do AMP poderia contribuir para uma diminuição dos níveis de adenosina, uma estrutura que exerce numerosos efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular, como vasodilatação e inibição da agregação plaquetária (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003). Este resultado pode contribuir para um melhor entendimento do aumento da ativação plaquetária e de outros processos descritos como fatores de risco para o sistema cardiovascular durante e após a menopausa.

Os perfis paralelos de inibição da hidrólise do ATP e do ADP durante a privação hormonal sugerem o envolvimento de uma enzima ATP-difosfohidrolase neste processo, assim como a inibição da hidrólise do nucleotídeo AMP estaria sendo catalisada pela enzima 5'-nucleotidase. A enzima ATP-difosfohidrolase já foi descrita em plaquetas pelo nosso grupo (FRASSETTO et al., 1993), além disso, a ação conjunta com a 5'-nucleotidase tem sido sugerida como um mecanismo importante para o metabolismo completo dos nucleotídeos,

(FRASSETTO et al., 1993), além disso, a ação conjunta com a 5'-nucleotidase tem sido sugerida como um mecanismo importante para o metabolismo completo dos nucleotídeos, limitando seus efeitos e até mesmo evocando efeitos opostos através da ação dos nucleosídeos formados sobre alguns receptores.

Adicionalmente, testamos o efeito da terapia de reposição hormonal com estradiol sobre a atividade das nucleotidases de plaquetas de ratas ovariectomizadas. Os resultados obtidos demonstraram que a terapia escolhida não reverteu a inibição da hidrólise dos nucleotídeos causada pela ausência dos hormônios gonadais, mantendo o mesmo padrão de diminuição da atividade enzimática do grupo ovariectomizado quando comparado ao grupo controle.

Embora muitos estudos indiquem os efeitos benéficos dos estrogênios sobre o sistema circulatório, a terapia de reposição hormonal precisa ser melhor estudada. Numerosos trabalhos sugerem a redução do risco de doenças cardiovasculares em mulheres fazendo a terapia de reposição (STAMPFER et al., 1991; BARRET-CONNOR & GRADY, 1998); em contraste, outros resultados publicados revelam um aumento do risco de trombose (THIJS et al., 2002). Nossos resultados demonstram que o tratamento escolhido não afetou a hidrólise dos nucleotídeos nas plaquetas das ratas; contudo, outros tratamentos com combinações hormonais poderiam ser testados para verificar seus efeitos sobre a atividade das enzimas que controlam os níveis de nucleotídeos no meio extracelular. Isso se torna necessário uma vez que existem numerosos tratamentos de reposição hormonal, com diferentes tipos de estrogênios sozinhos e diferentes combinações de estrogênios com progesteronas.

Os efeitos observados na ausência dos hormônios sexuais sobre o metabolismo de ATP, ADP e AMP em plaquetas poderiam contribuir para uma melhor compreensão das modificações da menopausa. Uma vez que as enzimas testadas são descritas como importantes no controle de processos trombóticos e isquêmicos, além de algumas outras

patologias através da modulação da atividade dos nucleotídeos, as alterações encontradas poderiam estar favorecendo estes processos no sistema cardiovascular em situações de privação dos hormônios ovarianos. Além disso, o tratamento de reposição hormonal utilizado neste trabalho não estaria exercendo um efeito protetor sobre o sistema circulatório, uma vez que não restaurou as atividades enzimáticas inibidas pela ovariectomia.

Em relação aos efeitos dos hormônios sexuais sobre as enzimas de soro, os resultados obtidos demonstraram um padrão diferente daquele das plaquetas. A hidrólise de ATP, ADP e AMP foi significativamente aumentada no soro das ratas submetidas à remoção dos ovários. Além destes nucleotídeos, testamos ainda a hidrólise do substrato artificial *p*-nitrofenil-5'-timidina-monofosfato (*p*-Nph-5'-TMP), marcador da enzima 5'-nucleotídeo fosfodiesterase, que também hidrolisa ATP e ADP. Os resultados confirmam a atividade desta enzima no soro, porém ela não foi influenciada pela privação hormonal.

O aumento paralelo na hidrólise de ATP e ADP e a ausência de alteração na atividade da enzima 5'-nucleotídeo fosfodiesterase sugerem o envolvimento de uma ATP-difosfohidrolase na regulação da concentração destes nucleotídeos na circulação após a remoção dos ovários. Recentemente, nosso grupo descreveu a co-existência de uma 5'-nucleotídeo fosfodiesterase e uma ATP-difosfohidrolase em soro de ratos (OSES & CARDOSO et al., 2004). A presença de duas enzimas com a mesma atividade no organismo pode representar um duplo sistema na manutenção da homeostasia dos nucleotídeos. Todavia, no presente estudo, observamos apenas alterações na atividade de hidrólise do ATP e ADP e não na atividade da 5'-nucleotídeo fosfodiesterase. Assim, é possível pensar que somente uma destas atividades está envolvida na manutenção dos níveis de nucleotídeos na circulação com respeito a privação dos hormônios gonadais.

As alterações observadas na atividade das enzimas ATP-difosfohidrolase e 5'-nucleotidase no soro das ratas ovariectomizadas poderiam ser relacionadas a um mecanismo

compensatório para a manutenção dos níveis circulantes de nucleotídeos em situações de atividade plaquetária aumentada e risco cardiovascular, o que acontece após a menopausa, desenvolvendo um importante papel na tentativa de manter uma adequada hemostasia.

Adicionalmente, encontramos um efeito significativo da terapia de reposição hormonal com estradiol sobre a atividade das enzimas testadas no soro. O tratamento reverteu o aumento causado pela privação hormonal a níveis inferiores ao do controle, sugerindo ainda mais uma relação entre o sistema hormonal e a hidrólise de nucleotídeos neste sistema. É interessante notar que a atividade da enzima 5'-nucleotídeo fosfodiesterase sobre a hidrólise do substrato marcador também foi diminuída nesta situação, sugerindo que o tratamento escolhido possa afetar dois sistemas na manutenção dos níveis de nucleotídeos. Até o momento não existe nenhum dado na literatura com respeito a alterações na atividade de nucleotidases solúveis em modelos de reposição hormonal.

Com base em evidências recentes que indicam que alguns hormônios sexuais poderiam produzir efeitos não-genômicos, sendo potentes moduladores de proteínas de membrana plasmática (ZYLIŃSKA & LEGUTKO, 1998; ZYLIŃSKA et al., 1999; MASSHEIMER et al., 2001), nós investigamos se as alterações encontradas sobre as enzimas de soro poderiam ser devido a ações diretas dos hormônios sexuais. Nossos resultados mostraram que, quando testados *in vitro*, os hormônios 17 β -estradiol, DHEAS e pregnenolona não afetaram a hidrólise de ATP, ADP e AMP e nem do substrato marcador da enzima 5'-nucleotídeo fosfodiesterase, nas concentrações testadas. Portanto, os mecanismos precisos, pelos quais os hormônios sexuais podem estar afetando as enzimas testadas no soro não foram totalmente esclarecidos, necessitando estudos mais detalhados para avaliar este envolvimento.

Assim, nossos resultados sugerem uma importante relação entre o sistema hormonal e as enzimas que controlam os níveis de nucleotídeos em plaquetas e soro de ratas. Além disso, estes resultados podem indicar um novo mecanismo de ação dos hormônios sexuais sobre o

sistema circulatório. Os resultados obtidos em plaquetas podem ser importantes para um melhor entendimento dos efeitos anti-trombóticos dos hormônios sexuais e do aumento dos riscos de problemas cardiovasculares durante e após a menopausa. Da mesma maneira, os resultados obtidos em soro podem estar indicando um mecanismo compensatório do organismo na tentativa de controlar os eventos desencadeados pela privação hormonal no sangue total.

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram uma importante interação entre os hormônios sexuais e as enzimas que degradam os nucleotídeos da adenina em soro e plaquetas de ratas. Essa interação demonstrou-se importante em diversos processos da regulação da função cardiovascular, uma vez que está relacionada com a modulação do sistema purinérgico. Assim, podemos apresentar as seguintes conclusões:

1. A privação hormonal, induzida pela remoção cirúrgica dos ovários, causou uma diminuição na hidrólise de ATP, ADP e AMP nas plaquetas das ratas, elevando os níveis destes nucleotídeos na circulação e possivelmente favorecendo os processos de agregação plaquetária e vasoconstrição. Este resultado auxiliaria no entendimento de alguns processos descritos como fatores de risco para doenças cardiovasculares após a menopausa.
2. No soro, a hidrólise de ATP, ADP e AMP foi aumentada após a ovariectomia. Sugerindo um mecanismo compensatório para a manutenção dos níveis de nucleotídeos no sangue total nesta situação. Além disso, a ausência de alteração na hidrólise do substrato artificial *p*-nitrofenil-5'-timidina-monofosfato sugere o envolvimento da enzima ATP-difosfohidrolase na modulação dos níveis circulantes dos nucleotídeos da adenina durante o processo de privação hormonal.
3. A reposição hormonal com estradiol não reverteu a inibição causada pela ausência dos hormônios sobre a hidrólise dos nucleotídeos em plaquetas; todavia, no soro, o tratamento mostrou-se eficiente em reverter o efeito causado pela remoção dos ovários. Estes resultados reforçam o envolvimento do sistema hormonal com as nucleotidases estudadas e sugerem que, dependendo do meio, estas enzimas são diferentemente afetadas pelos hormônios sexuais.

4. Os hormônios 17β -estradiol, DHEAS e pregnenolona, quando testados *in vitro*, não alteraram a hidrólise dos nucleotídeos testados, sugerindo que, nestas preparações, os hormônios sexuais não são capazes de atuar via mecanismos não-genômicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO, M.P. & BURNSTOCK, G. (1994). Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64: 445-475.
- ABBRACCHIO, M.P.; CERUTI, S.; BARBIERI, D.; FRANCESCHI, C.; MALORNI, W.; BIONDO, L.; BURNSTOCK, G.; CATTABENI, F. (1995). A novel action of adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 908-915.
- BAR, J.; TEPPER, R.; FUCHS, M.; PARDO, J.; OVADIA, J. (1993). The effect of replacement therapy on platelet aggregation and ATP release in postmenopausal women. *Obstet. Gynecol.* 81: 261-264.
- BAR, J.; LAHAV, J.; HOD, M.; BEN-RAFAEL, Z.; WEINBERGER, I.; BROSENS, J. (2000). Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release *in vitro* by 17β -estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb. Haemos.* 84: 695-700.
- BARRET-CONNOR, E. & BUSH, T.L. (1991). Estrogen and coronary heart disease in women. *Journal of the American Medical Association* 265: 1861-1867.
- BARRET-CONNOR, E. & GRADY, D. (1998). Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu. Rev. Public. Health* 19: 55-72.
- BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.T.B.; BARCELLOS, C.K.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. (1991). Characterization of an ATP diphosphohydrolase (E.C. 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16: 1303-1310.

- BATTASTINI, A.M.O.; OLIVEIRA, E.D.; MOREIRA, C.M.; BONAN, C.D.; SARKIS, J.J.F.; DIAS, R.D. (1995). Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 37: 209-219.
- BERNE, R.M. (1963). Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* 204: 317-322.
- BEATO, M. et al. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-857.
- BONAN, C.D.; ROESLER, R.; PEREIRA, G.S.; BATTASTINI, A.M.O.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F. (2000). Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. *Brain Res.* 854: 253-256.
- BONAN, C.D.; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, I.C.; WALZ, R.; BATTASTINI, A.M.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F. (2000a). Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem. Res.* 25(6): 775-779.
- BONAN, C.D.; WALZ, R.; PEREIRA, G.S.; WORM, P.V.; BATTASTINI, A.M.O.; CAVALHEIRO, E.A.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F. (2000b). Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy res.* 39(3): 229-238.
- BONAN, C.D.; SCHETINGER, M.R.C.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J.F. (2001c). Ectonucleotidases and synaptic plasticity: implications in physiological and pathological conditions. *Drug Dev. Res.* 52: 57-65.
- BROWN, T.J.; MACLUSKY, N.J.; SHANABROUGH, M.; NAFTOLIN, F. (1990). Comparison of age and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progestin receptor induction in the rat brain. *Endocrinol.* 126: 2965-2972.

- BRUNO, A.N.; OSES, J.P.; BONAN, C.D.; WALZ, R.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. (2002). Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol. *Neurosci. Res.* 43(3): 283-288.
- BRUNO, A.N.; OSES, J.P.; AMARAL, O.; COITINHO, A.; BONAN, C.D.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. (2003). Changes in nucleotide hydrolysis in rat blood serum induced by pentylenetetrazol-kindling. *Molecular Brain Research* 114: 140-145.
- BURNSTOCK, G. & WILLIAMS, M. (2000). P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (3): 862 - 869.
- BURNSTOCK, G. (2002). Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 364-373.
- CARIO-TOUMANIANTZ, C.; LOIRAND, G.; FERRIER, L.; PACAUD, P. (1998). Non-genomic inhibition of human P2X7 purinoreceptor by 17 β -oestradiol. *J. Physiol.* 508: 659-666.
- COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J.; ROSNER, B.; SPEIZER, F.E.; HENNEKENS CH. (1987). Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med.* 316: 1105-1110.
- COLDITZ, G.A. (1996). Postmenopausal estrogen and breast cancer. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 3: 50-56.
- CRISTALLI, G.; VOLPINI, R.; VITTORI, S.; et al. (1994). 2-alkynyl derivatives of adenosine-5'-N-ethyluronamide: selective A2 adenosine receptor agonists with potent inhibitory activity on platelet aggregation. *J. Med. Chem.* 37: 1720-1726.
- CRONSTEIN, B.N.; LEVIN, R.I.; BELANOFF, J.; WEISSMANN, G.; HIRSCHHORN, R. (1996). Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 78: 760-770.

- ENJYOJI, K.; SÉVIGNY, J.; LIN, Y.; FRENETTE, P.S.; et al. (1999). Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat. Med.* 5: 1010-1017.
- FRASSETTO, S.S.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. (1993). Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Molecular and Cellular Biochemistry* 129: 47-55.
- FREDHOLM, B.B.; JOHANSSON, B.; VAN DER PLOEG, I.; HU, P.S.; JIN, S. (1993). Neuromodulatory roles of purines. *Drug. Dev. Res.* 28: 349-353.
- FREDHOLM, B.B.; ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; DALY, J.W.; HARDEN, K.T.; JACOBSON, K.A.; LEFF, P.; WILLIAMS, M. (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46: 143-156.
- FRYE, C.A. & RHODES, M.E. (2002). Enhancing effects of estrogen on inhibitory avoidance performance may be in part independent of intracellular estrogen receptors in the hippocampus. *Brain res.* 956: 285-293.
- FUGGER, H.N.; FOSTER, T.C.; GUSTAFSSON, J-A.; RISSMAN, E.F. (2000). Novel effects of estradiol and estrogen receptor α and β on cognitive function. *Brain Res.* 883: 258-264.
- FUSTER, V.; BADIMON, L.; BADIMON, J.J.; CHESEBRO, J.H. (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 326: 310-318.
- GACHET, C. (2001). ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb. Haemost.* 86: 222 -232.
- GAMARO, G.D.; PREDIGER, M.E.; LOPES, J.B.; DALMAZ, C. (2003). Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76: 327-333.

- HANDA, M. & GUIDOTTI, G. (1996). Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 916-923.
- HIRATA, K.; SHIMADA, K.; WATANABE, H.; MURO, T.; YOSHIYAMA, M.; TAKEUCHI, K.; HOZUMI, T.; YOSHIKAWA, J. (2001). Modulation of coronary flow velocity reserve by gender, menstrual cycle and hormone replacement therapy. *J. Amer. Coll. Card.* 38: 1879-1884.
- HOAR, W. & HICKMAN, C.P. (1975). Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W. Hoar & C. P. Hickman (eds.), *General and comparative physiology*. 2 ed. Prentice-Hall, New Jersey, pp. 260-265.
- HULLEY, R.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B.; VITTINGHOFF, E. (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 280: 605-613.
- KACZMAREK, E.; KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; et al. (1996). Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 271: 33116-33122.
- KELLY, M.J. & LEVIN, E.R. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* 12(4): 152-156.
- LIU, P-S.; HSIEH, H-L.; LIN, C-M. (2001). Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) supresses P2X purinoceptor-coupled responses in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 39: 193-198.
- LONG, J.A. & EVANS, H.M. (1922). The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univers. Calif.* 6: 1-148.

- LUINE, V.N.; RICHARDS, S.T.; WU, V.Y.; BECK, K.D. (1998). Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm. Behav.* 34: 149-162.
- MANOLAGAS, S.C. & KOUSTENI, S. (2001). Perspective: Nonreproductive sites of action of reproductive hormones. *Endocrinology* 142(6): 2200-2204.
- MARCONDES, F.K.; MIGUEL, K.; MELO, L.L.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 74(4-5): 435-440.
- MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.F.; ISLAM, N.; PINSKY, D.J.; SESTI, C.; LEVI, R. (2002). Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J. Pharm. Exp. Ther.* 305(1): 9-16.
- SELLES, J.; POLINI, N.; ALVAREZ, C.; MASSHEIMER, V. (2001). Progesterone and 17 β -estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sciences* 69: 815-827.
- MENDELSON, M.E. & KARAS, R.H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 340: 1801-1811.
- MUBAGWA, K.; MULLANE, K.; FLAMENG, W. (1996). Role of adenosine in heart and circulation. *Cardiovascular Research* 32: 797-813.
- NEDELJKOVIC, N.; DJORDEVIC, V.; HORVAT, A.; NIKEZIC, G.; KANAZIR, D.T. (2000). Effect of steroid hormone deprivation on the expression of ecto-ATPase in distinct brain regions of female rats. *Physiol. Res.* 49: 419-426.
- OSÉS, J.P.; CARDOSO, C.M.; GERMANO, R.A.; KIRST, I.B.; RÜCKER, B.; FÜRSTENAU, C.R.; WINK, M.R.; BONAN, C.D.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS,

- J.J.F. (2004). Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sciences* 74(26): 3275-3284.
- PARKER, M.G. & WHITE, R. (1996). Nuclear receptors spring into action. *Nat. Struct. Biol.* 3: 113-115.
- PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. (1996). ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7: 225-230.
- PINSKY, D.J.; BROEKMAN, M.J.; PESCHON, J.J.; STOCKING, K.L.; FUJITA, T.; RAMASAMY, R.; CONNOLLY JR., E.S.; HUANG, J.; KISS, S.; ZHANG, Y.; CHOUDHRI, T.F.; MCTAGGART, R.A.; LIAO, H.; DROSOPOULOS, J.H.F.; PRICE, V.L.; MARCUS, A.J.; MALISZEWSKI, C.R. (2002). Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 109: 1031-1040.
- RALEVIC, V. & BURNSTOCK, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50(3): 413-492.
- RALEVIC, V. & BURNSTOCK, G. (2003). Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug. News Perspect.* 16(3): 133-140.
- ROSS, R. & GLOMSET, J.A. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis: Part 1. *N. Eng. J. Med.* 295: 369-377.
- ROSS, R. (1999). Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340: 115-126.
- 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. & SALTÓ, C. (1991). Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26: 871-876.
- SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N.; GUCKELBERGER, O.; CSIZMADIA, E.; QAWI, I.; IMAI, M.; ZIMMERMANN, H.; ROBSON, S.C. (2002). Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99(8): 2801-2809.
- SMITH, T.M. & KIRLEY, T.L. (1998). Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1386: 65-78.
- SOSLAU, G. & YOUNGPRAPAKORN, D. (1997). A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1355: 131-140.
- SPORNITZ, U.M.; SOCIN, C.D. ; DAVID, A.A. (1999). Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anat. Rec.* 254: 116-126.
- STOREY, F. (2001). The P2Y12 receptor as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Platelets* 12: 197-209.
- SUBBIAH, M.T.R. (2002). Estrogen replacement therapy and cardioprotection: mechanisms and controversies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35: 271-276.
- THIJS, A.; van BAAL, W.M.; van der MOREN, M.J.; KENEMANS, P.; DRÄGER, A.M.; HUIJGENS, P.C.; STEHOUWER, C,D,A. (2002). Effects of hormone replacement therapy on blood platelets. *European Journal of Clinical Investigation* 32: 613-618.

- TOSTES, R.C. et al. (2003). Effects of estrogen on the vascular system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36(9): 1143-1158.
- VALVERDE, M.A. & PARKER, M.G. (2002). Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *TRENDS in Biochemical Sciences* 27(4): 172-173.
- WANG, T.F. & GUIDOTTI, G. (1996). CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271: 9898-9901.
- WEAVER, D.R. (1996). A1-adenosine receptor gene expression in fetal rat brain. *Dev. Brain Res.* 94: 205-223.
- WHITE, R.E. (2002). Estrogen and vascular function. *General Pharmacology* 38: 1-8.
- WHITING, K.P.; RESTALL, C.J.; BRAIN, P.F. (2000). Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sciences* 67: 743-757.
- WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 288: 321-333.
- ZIMMERMANN, H. (1994). Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17: 420-426.
- ZIMMERMANN, H. (2001). Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature. *Drug Develop. Res.* 52: 44-56.
- ZUMOFF, B. (1993). Biological and endocrinological insights into the possible breast cancer risk from menopausal estrogen replacement therapy. *Steroids* 58: 196-204.
- ZYLINSKA, L.; REBAS, E.; GROMADZINSKA, E.; LACHOWICZ, L. (1995). Neuroactive steroids modulate *in vivo* the Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase activity in rat cortical and cerebellar synaptosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 176-183.

ZYLIŃSKA, L. & LEGUTKO, B. (1998). Neuroactive steroids modulate *in vitro* the Mg^{2+} -dependent Ca^{2+} -ATPase activity in cultured rat neurons. *Gen. Pharmacol.* 30(4): 533-536.

ZYLIŃSKA, L.; GROMADZIŃSKA, E.; LACHOWICZ, L. (1999). Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1437: 257-264.