

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

STEFÂNIA KONRAD RICHETTI

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO *in vitro* COM CAFEÍNA SOBRE A
ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS COM A HIDRÓLISE
DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS
DE RATOS**

PORTO ALEGRE

2008

STEFÂNIA KONRAD RICHETTI

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO *in vitro* COM CAFEÍNA SOBRE A
ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS COM A HIDRÓLISE
DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS
DE RATOS**

Monografia apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas da Faculdade de Biociências da
Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.

PORTO ALEGRE

2008

STEFÂNIA KONRAD RICHETTI

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO *in vitro* COM CAFEÍNA SOBRE A
ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS COM A HIDRÓLISE
DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS
DE RATOS**

Monografia apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas da Faculdade de Biociências da
Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.

Aprovada em 07 de Novembro de 2008

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho

Prof. Dr. Sandro Luis Bonatto

*Dedico esta monografia com todo carinho e admiração ao meu irmão,
minha fonte de inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Errol Domingos Richetti e Maria Beatriz Konrad pelo apoio e amor incondicional, por terem respeitado quando eu precisei ficar em casa fazendo esta monografia;

Agradeço ao meu namorado Andres, pelo apoio, compreensão, companheirismo e acima de tudo, por ser um grande amigo em todas as horas;

Agradeço à minha prima e irmã Isabela por sempre me ajudar nos momentos que eu precisei, nem que fosse uma janta para aliviar o stress;

Agradeço à minha dinda Sara por ter me levado para conhecer o mundo e quase ter me convencido à entrar para a aviação;

Ao Excelentíssimo Manoel Rodrigues Martins, vulgo DINDO, por ser uma fonte de conhecimento inesgotável, pelo reconhecimento dos meus trabalhos e por sempre me apresentar a bioquímica como algo adorável;

À minha Tia Jane e sua fiel escudeira Vicky por sempre estarem presentes e dispostas a assistirem salões de iniciação científica;

Ao meu primo Nicolas, por sempre estar presente nas nossas vidas;

À minha orientadora Prof. Dra. Rosane Souza da Silva por me apresentar a oportunidade de trabalhar com bioquímica, por sempre estar disposta a esclarecer minhas dúvidas, me mostrar o caminho e acima de tudo, por ser uma grande amiga;

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato Dutra Dias por ser um mestre maravilhoso, apaixonado por bioquímica e por despertar em mim esta paixão pelo conhecimento e por sempre me ajudar nas diversas dúvidas que tive,

À Prof. Dra. Carla Denise Bonan e ao Prof. Dr. Maurício Reis Bogo, por estarem sempre disponíveis a ajudar e esclarecer dúvidas;

Às minhas grandes amigas Daniela e Natália, companheiras de banda, por aceitarem quando eu não podia ensaiar pois estava trabalhando na monografia;

À minha amiga de longa data Isabela, por ser uma grande amiga nas horas boas e difíceis e por participar desta caminhada;

Às minhas grandes amigas e irmãs, Jéssica e Ivy pelo carinho e disponibilidade, mesmo que do outro lado do país;

Aos meus colegas do Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia e do Genoma, por serem ótimas pessoas e colegas para trabalhar e sempre estarem dispostos a uma conversa, café ou trabalho.

“A melhor maneira de prever o futuro é inventá-lo”

Alan Kay

RESUMO

O Sistema Nervoso Central imaturo é um sistema muito suscetível às intervenções externas e alterações internas. O correto desenvolvimento deste órgão requer uma correta interação entre diversos fatores. A cafeína é uma xantina muito consumida, devido ao fato de estar presente em diversas fontes alimentares, tais como café, chá-mate, bebidas de cola e chimarrão. Esta molécula apresenta vários efeitos fisiológicos, como o aumento da vigília e a agitação. As bases bioquímicas para estes efeitos estão relacionadas com o bloqueio dos receptores de adenosina, uma molécula neuromoduladora presente no meio intra e extracelular. O ATP é um nucleotídeo envolvido em diversos processos energéticos e de sinalização e tem seus níveis extracelulares controlados por enzimas da família das ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPP), pela fosfatase alcalina e pela 5'-Nucleotidase, que realizam a sua degradação até adenosina. A avaliação dos efeitos da cafeína sobre a hidrólise de nucleotídeos de adenina contribui a aquisição de um maior conhecimento sobre os efeitos das xantinas sobre o sistema nervoso central, visto que o consumo destas moléculas é muito elevado. Além disto, a cafeína consegue atravessar todas as barreiras biológicas, como a hematoencefálica e a placentária, devido a sua hidrofobicidade. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da exposição *in vitro* à cafeína sobre a atividade de hidrólise de nucleotídeos da adenina e a expressão das enzimas relacionadas a estas atividades enzimáticas em culturas primárias de astrócitos de ratos. Para a execução deste projeto serão realizadas culturas primárias de astrócitos de ratos que serão tratadas com cafeína nas concentrações de 0,2, 10, e 25 μ M. Após serão realizados ensaios enzimáticos para avaliar a atividade e expressão gênica das enzimas E-NTPDase 1, 2 e 3, 5'-Nucleotidase, e NPP 1, 2 e 3. Ao analisar os efeitos da cafeína sobre a hidrólise de nucleotídeos e expressão de ectonucleotidases em astrócitos pretende-se auxiliar no entendimento dos mecanismos que envolvem a interação neurônio-glia sob condições de intervenções no sistema purinérgico. Este trabalho proporcionará, além da produção de conhecimento, a publicação de artigos científicos e participações em congressos e eventos nacionais e internacionais.

Palavras-chave: Cafeína. Adenosina. Ectonucleotidases. Astrócitos. Cultura de células. Ratos.

ABSTRACT

The immature Central Nervous System is a system very susceptible to external interventions and alterations. The correct development of this system requires a correct interaction between many variables. Caffeine is a xantine highly consumed because it is present in diverse dietary sources like coffee, tea, cola drinks and mate. Caffeine has a variety of physiological effects, like increased wakefulness and hyperlocomotion. The biochemical mechanisms of these effects are related with the adenosine receptors blockade, a neuromodulatory molecule that occurs in the intra and extracellular environment. ATP is a nucleotide involved in several energetic and signalling processes. Extracellular levels of ATP are highly controlled by enzymes of the ecto-nucleoside 5'-triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDase) family, ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase (E-NPP) family, alkaline phosphatases and ecto-5'-Nucleotidases, that hydrolyses ATP to adenosine. The evaluation of the effects of caffeine on the adenine nucleotides hydrolysis is very important because it contributes to an acquisition of knowledge about the effects of the xantines on the central nervous system, since xantines are highly consumed throughout the world. Moreover, caffeine can pass through all biological membranes, like the blood brain barrier and the placental barrier. Considering these characteristics of caffeine, the objective of this work is to evaluate the effects of the *in vitro* caffeine exposure on the enzymatic activity and genetic expression of enzymes that are related with the adenine nucleotide hydrolysis in rat primary astrocytes cultures. To the execution of this work, rat primary astrocytes cultures will be treated with caffeine in concentrations of 0.2, 10, and 25 μ M. After, enzymatic assays will be developed to evaluate the enzymatic activity and genetic expression of E-NTPDase 1, 2 and 3, 5'-Nucleotidase and NPP 1, 2 and 3. With the analysis of the effects of caffeine on the hydrolysis of nucleotides and the genetic expression of ectonucleotidases in rat astrocytes, I intend to help the understanding of the mechanisms thar involves the neuron-glia interactions that occurs with interventions in the purinergic system. This work will provide, besides the increase of knowledge, the publication of scientific papers and participation in national and international congress and meetings.

Keywords: Caffeine. Adenosine. Ectonucleotidases. Astrocytes. Cell culture. Rats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Diagrama esquemático das vias de sinalização purinérgica, degradação extracelular de nucleotídeos e recaptção de adenosina. NT: Neurotransmissores; AK: Adenosina quinase; NTPDase: Nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase; 5’N: 5’-nucleotidase; T: transportadores bidirecionais de nucleosídeos. [Cunha, R. A. (2005). Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signalling* 1: 111-134.]. **12**
- Figura 2** – Topografia de membrana das ectonucleotidases [Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Development Research* 52: 44-56 (modificado)]. **15**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	ATP E NEUROTRANSMISSÃO	11
1.2	ADENOSINA E NEUROMODULAÇÃO	12
1.3	ECTONUCLEOTIDASES	14
1.3.1	Ecto-NTPDases	15
1.3.2	Ecto-5'-Nucleotidase.....	17
1.3.3	E-NPPs.....	18
1.3.4	Fosfatases Alcalinas.....	19
1.4	CAFEÍNA.....	19
1.5	JUSTIFICATIVA	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	LOCAL DE EXECUÇÃO.....	23
3.2	CULTURA DE ASTRÓCITOS	23
3.3	TRATAMENTO COM CAFEÍNA	23
3.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	24
3.5	EXPRESSÃO GÊNICA	25
3.6	ANÁLISE DOS DADOS	25
4	RESULTADOS ESPERADOS E PERSPECTIVAS.....	26
	REFERÊNCIAS	27
	APÊNDICE A – Orçamento do Projeto	30
	APÊNDICE B – Cronograma do Projeto.....	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 ATP E NEUROTRANSMISSÃO

As propriedades de sinalização do ATP foram descritas a partir de estudos de Geoffrey Burnstock, em 1972. Esta molécula é reconhecida como um neurotransmissor, pois é sintetizada e armazenada em terminais sinápticos e liberada após estímulo destes terminais (Revisado em Burnstock, 1999). A transmissão de sinal via ATP desempenha papéis complexos, tais como a excitação ou a inibição da neurotransmissão. O ATP pode ser liberado nos terminais pré- e pós-sinápticos. Esta liberação pode ocorrer não somente em resposta a um estímulo elétrico, mas também como resposta a um estímulo fisiológico, como hipóxia (Burnstock, 2008). O ATP age através de receptores purinérgicos específicos do tipo P2, divididos em dois grupos: O primeiro grupo é constituído pelos receptores P2X, ionotrópicos e o segundo grupo é constituído pelos receptores P2Y, metabotrópicos acoplados a uma proteína G. Os receptores P2X proporcionam rápida permeabilidade à cátions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), levando a um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} e despolarização. São amplamente distribuídos em células excitáveis, principalmente no músculo liso e nervos, mas também em outros tecidos e apresentam o papel de mediadores de uma rápida neurotransmissão excitatória tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Até o momento sete receptores pertencentes ao grupo dos receptores P2X foram descritos. Os receptores pertencentes ao segundo grupo, os receptores P2Y, possuem como principal mecanismo de transmissão de sinal a ativação da fosfolipase C (PLC) (Ralevic e Burnstock, 1998). Além da sua atividade como um rápido mensageiro na sinalização entre neurônios e glia, o ATP também pode agir como um fator trófico e de crescimento, alterando o desenvolvimento destas células regulando o cálcio citoplasmático e o AMPc (Fields e Burnstock, 2006).

1.2 ADENOSINA E NEUROMODULAÇÃO

A adenosina é um metabólito constituinte de todas as células (Cunha, 2001) que desenvolve diversos papéis chave no organismo. Esta molécula está envolvida na síntese de ácidos nucleicos purinérgicos, metabolismo de aminoácidos e modulação do estado metabólico da célula. A adenosina não é considerada um neurotransmissor clássico, como o ATP, pelo fato de não ser armazenada em vesículas, não ser liberada por exocitose e não atuar predominantemente em sinapses (Fredholm, 2003). Na verdade, ela desempenha dois papéis, atuando como uma molécula que mantém a homeostase do meio intracelular e como um neuromodulador do sistema nervoso. No sistema nervoso central (SNC), age modulando a liberação de neurotransmissores, as respostas pós-sinápticas e a ação de outros sistemas (Fig. 1) (Cunha, 2001), além de proteger o organismo em caso de isquemia e injúrias (Fredholm, 2003).

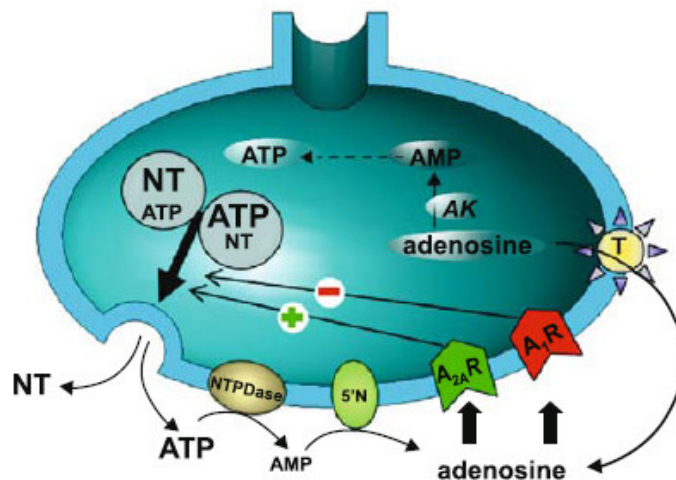


Figura 1 – Diagrama esquemático das vias de sinalização purinérgica, degradação extracelular de nucleotídeos e recaptção de adenosina. NT: Neurotransmissores; AK: Adenosina quinase; NTPDase: Nucleotídeo trifosfato difosfóhidrolase; 5'N: 5'-nucleotidase; T: transportadores bidirecionais de nucleosídeos. [Cunha, R. A. (2005). Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signalling* 1: 111-134.].

No meio intracelular, a adenosina apresenta uma concentração de 10 à 50 nM e no meio extracelular uma concentração de 1 à 17 nM (revisado em Latini e Pedata, 2001). Os níveis desta molécula aumentam quando há um desbalanço entre os níveis de energia em uso e disponíveis e também quando há dano celular, hipoxia e isquemia (revisado em Fredholm, 2003). A adenosina pode ser sintetizada intracelularmente pela clivagem da S-adenosil-

homocisteína pela enzima S-adenosil-homocisteína hidrolase (EC. 3.3.1.1) ou pela degradação do nucleosídeo monofosfatado AMP pela enzima 5' nucleotidase e extracelularmente por uma cascata enzimática de degradação de nucleotídeos, realizada pelas ectonucleotidases, a qual inclui uma ecto-5'-nucleotidase.

A ação da adenosina se dá através da ativação de receptores purinérgicos, do tipo P1 acoplados à proteínas G. Estes receptores são divididos em 4 subtipos de acordo com suas características, como estrutura molecular, distribuição tecidual e afinidade pelo seu ligante. Todos os receptores de adenosina apresentam sete domínios transmembrana formados por aminoácidos hidrofóbicos que presumivelmente se organizam formando sete alfa hélices. A porção N-terminal do receptor está voltada para o meio extracelular e a porção C-terminal está voltada para o lado citosólico da membrana plasmática (Ralevic e Burnstock, 1998). Estes receptores estão acoplados à proteínas G e estão relacionados com vários mecanismos de transmissão de sinal. O receptor do tipo A₁ é o que apresenta maior abundância no cérebro e está envolvido em uma grande amplitude de respostas, que podem ser causadas pelo seu acoplamento à diferentes proteínas G. A mais conhecida via de sinalização desencadeada pela ativação dos receptores A₁ é a inibição da atividade da adenilato ciclase, causando uma redução nos níveis do segundo mensageiro AMPc. Esta redução, por sua vez altera a atividade da proteína Quinase dependente de AMPc, que fosforila diversas proteínas (revisado em Ralevic e Burnstock, 1998). O receptor A₁ também está relacionado com a ativação de canais de potássio e à inativação de canais de cálcio, levando à inibição da atividade neuronal. (Dunwiddie e Masino, 2001, Fredholm, 1995). Este receptor é amplamente distribuído no cérebro, principalmente no hipocampo, cerebelo e córtex cerebral e está presente tanto em neurônios, astrócitos, microglia e oligodendrócitos (revisado em Fredholm, 2003). O receptor do tipo A_{2A} é encontrado em altas concentrações em poucas regiões do cérebro, principalmente no estriado, mas também em outras áreas, como cerebelo, córtex e hipocampo, presente em neurônios, astrócitos e microglia. Este receptor também ocorre em outros sistemas do organismo, como sistema imune, plaquetas, endotélio e musculatura vascular. O mais conhecido mecanismo de transmissão de sinal desencadeado pela ativação deste receptor é a ativação da adenilato ciclase e o aumento dos níveis de AMPc. Também é sugerida uma resposta independente de AMPc em neurônios estriatais gabaérgicos e colinérgicos. À este receptor está acoplada uma proteína G estimulatória (G_s), porém acredita-se que outras proteínas G também estejam envolvidas na transmissão de sinal via A_{2A} (Ralevic e Burnstock, 1998). A facilitação da transmissão sináptica e liberação de neurotransmissores via A_{2A} parece

ocorrer via canais de Ca^{+2} e provavelmente também envolve a adenilato ciclase e a ativação de uma proteína quinase dependente de AMPc (Correia de Sá e Ribeiro, 1994).

Outros receptores de adenosina, pouco estudados até o dado momento, são os receptores A_{2B} e A_3 . O receptor A_{2B} está localizado praticamente em todos os tipos de células, porém em concentrações muito baixas e uma grande concentração de adenosina é necessária que ocorra a sua ativação. Está presente em células da glia e neurônios, e sua ação envolve também ativação da adenilato ciclase, aumento do influxo de cálcio e acoplamento à PLC mediado pelas proteínas Gq e G_{11} . O receptor A_3 foi pouco estudado até o momento, porém acredita-se que ele desacople receptores A_1 e glutamatérgicos, via proteína quinase C (Dunwiddie e Masino, 2001). Atribui-se a ele a estimulação da PLC, a elevação intracelular de cálcio e a inibição da atividade da adenilato ciclase (revisado em Ralevic e Burnstock, 1998)

1.3 ECTONUCLEOTIDASES

Os nucleotídeos extracelulares podem atuar como moléculas sinalizadoras que precisam ter o seu sinal inativado após a sua ação. A inativação deste sinal e a manutenção das concentrações dos nucleotídeos pode se dar pela recaptura destas moléculas ou pela hidrólise extracelular dos mesmos. Os nucleotídeos são hidrolizados por uma cascata que resulta na formação do respectivo nucleosídeo e fosfato livre. As enzimas que catalisam esta reação são as ectonucleotidases, atualmente divididas em quatro famílias: As E-NTPDases (ecto-nucleosídeos trifosfo difosfohidrolase), E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), fosfatases alcalinas e ecto-5' nucleotidase (Zimmermann, 2000) (Fig. 2).

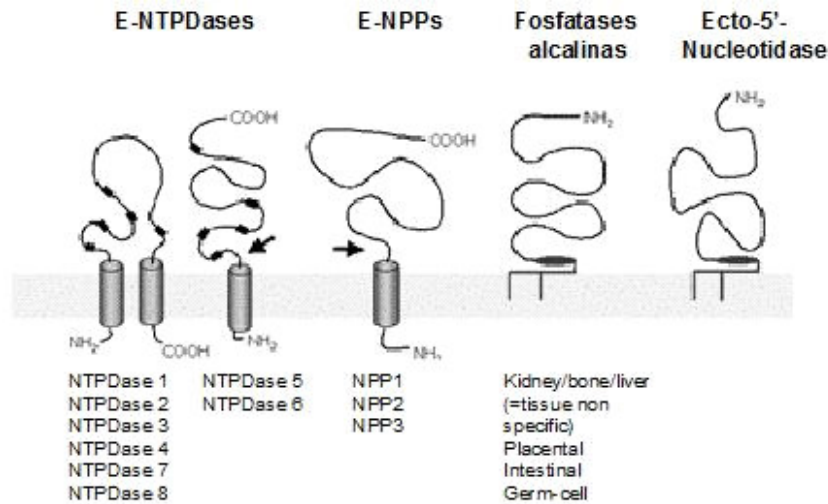


Figura 2 – Topografia de membrana das ectonucleotidasas [Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidasas: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Development Research* 52: 44-56 (modificado)].

1.3.1 Ecto-NTPDases

Membros desta família podem hidrolisar nucleosídeos-5'-trifosfatados e nucleosídeos-5'-difosfatados e são chamadas de ecto-nucleosídeos 5'-trifosfo difosfohidrolases (E-NTPDases). Estas enzimas apresentam membros em vertebrados, invertebrados, plantas, leveduras e protozoários (revisado em Zimmermann, 2001). Os membros desta família diferem em relação à preferência pelo substrato, neste caso nucleotídeos 5'-tri e nucleotídeos 5'-difosfatados que vão ser hidrolisados. Os membros da família das NTPDases são codificados por oito genes diferentes, chamados de genes *ENTPD*. Dos oito membros descritos até o momento, quatro estão localizados na membrana celular com o sítio ativo voltado para o meio extracelular (NTPDases 1,2,3 e 8). As NTPDases 5 e 6 se localizam intracelularmente porém são secretadas após expressão heteróloga. As NTPDases 4 e 7 apresentam localização intracelular com o sítio ativo voltado para o lúmen de organelas citoplasmáticas (Zimmermann, 2000).

As NTPDases podem ser separadas em dois grupos distintos de acordo com a sua estrutura: os membros do primeiro grupo incluem as E-NTPDases 1 à 4, 7 e 8 e apresentam domínios transmembranares N- e C- terminais. O segundo grupo inclui as enzimas NTPDase 5 e 6 que não apresentam o domínio transmembranares C-terminal e o domínio N-terminal pode ser clivado e formar uma forma solúvel da enzima.

A partir de análises realizadas utilizando placenta humana, aorta bovina e pâncreas de porco foi constatado que a NTPDase 1 (também conhecida como CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfohidrolase) hidrolisa ATP e ADP em uma razão molecular de aproximadamente 1:0.9. Em contraste, a NTPDase 2 (CD39 L1, Ecto-ATPase) tem uma grande preferência pela hidrólise de ATP, com uma razão molecular de ATP:ADP de aproximadamente 1:0.03 (revisado em Zimmermann, 2000). A NTPDase 3 (HB6) corresponde a um intermediário entre as duas enzimas, apresentando uma razão de hidrólise ATP:ADP de aproximadamente 1:0.3. A atividade de todos estes três tipos de ecto-nucleotidasas depende de concentrações milimolares de cátions divalentes como Ca^{+2} ou Mg^{+2} . Nem todos os membros das E-NTPDases estão localizados na superfície celular. A NTPDase 4 apresenta duas isoformas se localizam no Complexo de Golgi, em lisossomos e em vesículas fagocitárias. As enzimas que estão presentes no Golgi apresentam uma maior atividade com UDP como substrato. Ela hidrolisa também outros nucleosídeos-5'-di e trifosfatados, mas não ATP ou ADP e acredita-se que a sua principal função seja importar açúcares para as cisternas do complexo de Golgi (Zimmermann, 2000). A NTPDase 8 apresenta uma preferência pela hidrólise de nucleosídeos tri fosfatados, com uma razão de hidrólise de ATP/ADP igual a 0.94 e UTP/UDP igual a 0.98 (Fausther et al., 2006).

Os valores de Km das enzimas purificadas para a hidrólise de ATP e ADP estão em uma faixa de concentração micromolar. As massas moleculares destas enzimas, obtidas a partir da sua estrutura primária e formas não glicosiladas estão entre 55-60 kDa. As massas moleculares obtidas a partir da formas glicosiladas correspondem a 70-80 kDa. Estas enzimas encontram-se na forma de homooligomeros (dímeros, trimeros e até tetrâmeros) e os diferentes estados de oligomerização afetam a atividade catalítica (revisado em Zimmermann, 2000).

Em relação ao segundo grupo, a E-NTPDase 5 apresenta uma grande preferência para a hidrólise de nucleosídeos 5' difosfatados, principalmente UDP. A E-NTPDase 6 apresenta uma grande preferência pela hidrólise de GDP e IDP.

Os membros desta família são expressos em uma ampla variedade de tecidos, e em vários destes são co-expressos com outras enzimas, tais como os integrantes da família das E-NPPs. Esta co-expressão ocorre no cérebro, coração, rins, pulmões, ovários, pâncreas, placenta, próstata, músculo esquelético, intestino delgado, baço, testículo e timo. (Zimmermann, 2001). As enzimas desta família são expressas também nos sistemas vascular, imune, digestório, renal e nervoso central e periférico (Zimmermann, 2006).

Todos os membros da família compartilham cinco domínios com seqüências altamente conservadas, chamados de “região conservada da apirase” (Handa e Guidotti, 1996). A importância destas regiões foi evidenciada em experimentos com mutagênese sítio-direcionada, onde uma alteração nas regiões conservadas da apirase I e IV afetaram a atividade catalítica destas enzimas.

1.3.2 Ecto-5'-Nucleotidase

A ecto-5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, Ecto-5'-NT) desfosforila nucleosídeos monofosfatados não cíclicos (Zimmermann, 2000, Bianchi e Spychala, 2003), através da hidrólise da ligação fosfodiéster de 5'-ribonucleotídeos, levando à formação do correspondente ribonucleosídeo e fosfato. A principal função em animais é a hidrólise de AMP até adenosina (Zimmermann, 2000). A ecto-5'-nucleotidase é parte da cascata para finalizar a ação de nucleotídeos como ATP e moléculas sinalizadoras que agem em receptores P2X e P2Y, sendo a principal enzima responsável pela formação extracelular de adenosina. Funciona como um importante controle da concentração e ação de nucleotídeos e nucleosídeos. É importante também na reciclagem de nucleotídeos extracelulares que são convertidos à nucleosídeos pela Ecto-5'NT e são levados ao meio intracelular por transportadores específicos. Os valores de Km para 5'-AMP como substrato estão em uma faixa de concentração micromolar. ADP e ATP são inibidores competitivos da ecto-5'-nucleotidase, ou seja, se ligam ao sítio ativo, porém não são hidrolisados, e apresentam valores de Km semelhantes ao AMP (Sträter, 2005).

São encontradas em bactérias, animais e vegetais, apresentando grande diferença nos substratos utilizados. Em relação à distribuição tecidual, esta enzima está presente em todos os tecidos, porém geralmente ela é restrita à alguns compartimentos celulares, como terminações nervosas (Zimmermann, 1993, Zimmermann, 2000)

A estrutura primária da ecto-5'-Nucleotidase foi determinada a partir de estudos que revelaram que a enzima madura é constituída por 548 aminoácidos e apresenta uma massa molecular de 61 kDa. Uma seqüência de aproximadamente 25 resíduos hidrofóbicos na porção C-terminal é substituída por uma âncora constituída de Glicosil Fosfatidilinositol (GPI) pela qual a enzima se liga à membrana via um resíduo C-terminal a um complexo

oligoglicano e um grupo esfingolipidioinositol. Nenhum segmento da proteína se localiza na porção intermembrana. Há formas solúveis, que são derivadas da forma ligada à membrana que teve a âncora de GPI clivada por uma Fosfatidilinositol Fosfolipase específica (revisado em Sträter, 2005 e Colgan et al., 2006) ou por uma clivagem proteolítica. Além disto, considerada uma metaloenzima que se liga a um átomo de zinco (Zimmermann, 2000).

As seqüências destas enzimas nos mamíferos apresentam uma identidade de mais de 20% com as enzimas de bactérias, indicando um ancestral e estruturas comuns. Em relação aos motivos presentes na seqüência, a Ecto-5'-NT pertence à uma grande superfamília de metalofosfoesterases, que atuam em diversos substratos (Sträter, 2006).

1.3.3 E-NPPs

Também conhecidas como ecto-fosfodiesterase/pirofosfatases, as NPPs são enzimas que hidrolisam ligações fosfodiester entre nucleotídeos e entre outros substratos. A família das NPPs é formada por sete membros, dos quais apenas as NPPs 1 à 3 realizam a hidrólise de nucleotídeos e serão abordados nesta. Os componentes desta família apresentam uma ampla gama de substratos, sendo capazes de hidrolisar 3',5'-AMPc, ATP, ADP, o NAD e NMN entre outros. Podem hidrolisar tanto nucleotídeos púricos quanto pirimídicos. Os membros das NPPs de mamíferos apresentam um peso molecular de aproximadamente 110-125 kDa. A atividade catalítica destas enzimas é dependente de cátions divalentes. O pH ótimo para o funcionamento da enzima é alcalino e os valores de Km para ATP entre 20 μ M e 50 μ M (revisado em Zimmermann, 2000).

As NPPs são co-expressas em uma grande variedade de tecidos juntamente com as E-NTPDases. Além desta co-expressão, estas enzimas são encontradas principalmente no sistema nervoso, linfócitos, células tumorais, e nos epitélios do sistema respiratório, fígado e intestino.

As NPPs são enzimas que se localizam na membrana celular com um domínio transmembrana, exceto pela NPP2. Esta é uma enzima que existe apenas na forma de enzima secretada. As NPPs 1 e 3 apresentam uma orientação tipo II, com a porção N-terminal voltada para o citosol, enquanto as NPPs 4 à 7 apresentam uma orientação tipo I, com a porção N-terminal voltada para o meio extracelular (Stefan, Jansen e Mathieu, 2006). Os membros

desta família de enzimas apresentam um domínio catalítico de 400 resíduos e uma região putativa cálcio-ligante que é essencial para a atividade enzimática (Zimmermann, 2000)

1.3.4 Fosfatases Alcalinas

As fosfatases alcalinas representam uma família de ecto-fosfomonoesterases, Elas atuam hidrolisando muitos compostos orgânicos, como nucleosídeos 5'-tri, -di e -monofosfatados. Elas também hidrolisam pirofosfato inorgânico (PPi). Estas enzimas são capazes de realizar toda a cascata de hidrólise de nucleotídeos 5'-trifosfatados até o respectivo nucleosídeo. Os valores de Km estão na concentração milimolar, em contraste as outras enzimas que apresentam um Km pelo substrato em concentrações micromolares. Estas enzimas não serão avaliadas neste trabalho, pois até o momento a relação destas com a sinalização purinérgica e o metabolismo de nucleotídeos extracelulares não é muito conhecida (revisado em Zimmermann, 2000).

1.4 CAFEÍNA

A cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo. As principais fontes de cafeína são provenientes da dieta, principalmente do café e chá. O consumo de cafeína faz parte do cotidiano de países no mundo todo. A concentração de cafeína presente em algumas fontes alimentares varia de 40 à 180 mg/150 mL de café, 24 à 50 mg/150 mL de chá e 15 à 29 mg/180mL de refrigerantes de cola. O consumo de cafeína médio mundial corresponde a aproximadamente 70 à 76 mg/dia/pessoa, mas esta média apresenta grandes variações. No Brasil, a média de consumo equivale à 40 mg/dia/pessoa, porém no Rio Grande do Sul este valor possivelmente é maior devido ao alto consumo de erva mate. As propriedades hidrofóbicas da cafeína permitem que ela passe através de todas as barreiras biológicas, tanto a hemato-encefálica quanto a placentária. A cafeína apresenta vários mecanismos bioquímicos pelos quais ela exerce seus efeitos, porém a principal ação é o bloqueio inespecífico dos receptores de adenosina, agindo como um antagonista (revisado em Fredholm et al., 1999). O

consumo de cafeína apresenta diversos efeitos, visto a sua ação sobre os receptores adenosinérgicos. Os efeitos em relação à memória e aprendizado são controversos até o dado momento. Estudos demonstram que a cafeína é uma substância que pode reduzir a neurogênese hipocampal de ratos após 4 semanas de consumo em até 34,4% e a sobrevivência dos neurônios recém divididos em 23,8%, levando a um déficit na memória e aprendizado de ratos adultos (Han et al., 2007). Entretanto, estudos recentes mostram que a cafeína administrada em ratos adultos até a sua velhice reduziu o déficit cognitivo e a perda da memória que ocorre naturalmente com a idade, aproximando os ratos velhos que receberam cafeína dos ratos adultos que não receberam cafeína (Costa et al., 2008). Estudos prévios mostram que a cafeína é capaz de aumentar a hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas hipocampais e estriatais após tratamento agudo, porém não houve alteração na hidrólise de nucleotídeos após tratamento crônico (Da Silva et al., 2003). A avaliação dos efeitos da cafeína sobre vários sistemas em humanos é escassa, pois pode haver a interferência de consumo prévio de cafeína, além da dificuldade de manter o controle dos níveis de consumo (Han et al., 2007).

1.5 JUSTIFICATIVA

A avaliação dos efeitos da cafeína sobre a hidrólise de nucleotídeos de adenina permite a aquisição de um maior conhecimento sobre os efeitos das xantinas sobre o sistema nervoso central, visto que o consumo destas moléculas é muito elevado no país, pois está presente em fontes como café, chá-mate e chimarrão. O padrão de expressão de ectonucleotidases em neurônios e astrócitos apresentam-se diferenciados e com padrão transitório ao longo do desenvolvimento. Considerando que os astrócitos são células que participam com 30% do volume do córtex cerebral e que estas células, diferentemente dos neurônios, continuam a se dividir no momento do nascimento (Hertz, 1998), torna-se necessário a observação destas células para o entendimento do funcionamento do cérebro imaturo e dos efeitos de intervenções sobre este sistema. Neste trabalho pretende-se avaliar pela primeira vez os efeitos da exposição astrocitária à cafeína com a finalidade de auxiliar na compreensão do metabolismo glial de purinas. Além disto, pretende-se ampliar este estudo

avaliando este mesmo modelo em de culturas de astrócitos de animais que receberam cafeína durante a fase gestacional.

Este trabalho será executado durante o curso de mestrado, a ser desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do tratamento *in vitro* com cafeína sobre a hidrólise de Nucleotídeos de Adenina em cultura primária de astrócitos hipocampais, corticais e cerebelares de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a atividade enzimática de hidrólise de nucleotídeos de cultura de astrócitos hipocampais, corticais e cerebelares.
- Quantificar a expressão gênica das enzimas E-NTPDase 1, 2 e 3 de cultura de astrócitos hipocampais, corticais e cerebelares.
- Quantificar a expressão gênica da enzima E-5'Nucleotidase de cultura de astrócitos hipocampais, corticais e cerebelares.
- Quantificar a expressão gênica das enzimas E-NPP 1, 2 e 3 de cultura de astrócitos hipocampais, corticais e cerebelares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

Esta investigação será executada no Laboratório de Neuroquímica e psicofarmacologia e no Centro de Biologia Genômica e Molecular, ambos nesta universidade e terá duração de dois anos. O projeto será submetido à análise pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais na PUCRS (CEUA/PUCRS) e será executado mediante a sua aprovação.

3.2 CULTURA DE ASTRÓCITOS

As culturas primárias de astrócitos serão preparadas como descrito em Pinto et al. (2001). O Hipocampo, córtex e cerebelo de ratos Wistar recém nascidos (1-3 dias pós-natal) serão removidos, colocados em um meio salino livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} . (CMF-BSS; pH 7,4, contendo 137 mM NaCl; 5,36 mM KCl; 0,27 mM Na_2HPO_4 ; 1,1 mM KH_2PO_4 e 6,1 mM glicose). Os órgãos terão as veias e as meninges retiradas e serão dissociados mecanicamente por uma seqüência de passagens através de uma pipeta Pasteur. A suspensão será centrifugada a uma velocidade de 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante será descartado e o pellet será suspenso em meio de cultura (pH 7,6) contendo 1% DMEM; 8,39 mM HEPES; 23,8 mM NaHCO_3 ; 0,1% fungizona; 0,032% garamicina e 10% soro fetal bovino. As células serão plaqueadas numa densidade de $1,5 \times 10^5$ células/ cm^2 em placas pré-tratadas com poli-L-lisina. As culturas serão mantidas a 37°C (5% CO_2), o meio será trocado a cada 5 dias.

3.3 TRATAMENTO COM CAFEÍNA

Após o estabelecimento da cultura de células (aproximadamente 15 dias) as culturas receberão cafeína diluída no meio de cultura nas concentrações de 0,2 , 10 e 25 μM e após 24,

48 e 72h do tratamento serão analisadas as atividades enzimáticas de hidrólise de nucleotídeos e a expressão gênica das enzimas relacionadas com a hidrólise de nucleotídeos.

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática será analisada de duas maneiras: A primeira, para verificar a hidrólise de ATP, ADP e AMP e a segunda, para verificar a atividade das E-NPPs.

A primeira maneira será realizada de acordo com Wink et al. (2003) utilizando um meio de reação para ATP e ADP contendo 5 mM KCl, 120 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM glicose 20mM Hepes, pH 7,4, em um volume final de 0,2 mL. O meio de reação para a hidrólise de AMP é semelhante ao meio anterior, porém serão utilizados 2 mM MgCl₂ ao invés de CaCl₂ de acordo com a preferência da enzima relacionada com a hidrólise deste nucleotídeo.

A concentração final dos nucleotídeos será de 1 mM. Após incubação de 10 minutos a reação é terminada pela com a transferência de uma alíquota do meio de incubação para um tubo resfriado contendo TCA (5%). A determinação do fosfato inorgânico liberado é feita pelo método de Chan et al. (1986), e a atividade enzimática é expressa em nmol Pi.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. A quantidade de proteína será avaliada de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

A segunda maneira será realizada utilizando um substrato artificial, o *p*-nitrofenil-5'-timidina monofosfato (*p*-Nph-5'-TMP) segundo Furstenau et al. (2006) e será utilizado um meio de reação contendo 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glicose e 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.9. Após incubação de 80 minutos a reação é terminada com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 N. A atividade e hidrólise das NPPs será analisada de acordo com a quantidade de *p*-nitrofenol liberado que será determinada em leitura espectrométrica, a 400 nm.

3.5 EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão gênica será analisada a partir da extração do RNA total de culturas de astrócitos hipocâmpais, cerebelares e corticais tratados previamente com 0,2, 10 e 25 μM de cafeína por 24 ou 48 ou 72h (Wink et al., 2003), utilizando Trizol (Invitrogen). O cDNA será sintetizado utilizando o kit superscript First-Strand (Invitrogen) a partir de 3 μg de RNA total em um volume de 25 μL , utilizando oligonucleotídeos [oligo(dt)], ambos de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Para a reação de PCR, será utilizado um microlitro de cDNA e primers específicos para as enzimas estudadas: NTPDase 1, 2, 3, 5 e 6, ecto - 5'-nucleotidase e NPP 1,2 e 3. O controle da expressão gênica será realizado a partir de um gene que codifica uma proteína constitutiva (β -actina). Todas as reações do PCR serão realizadas em 35 ciclos e incluirão uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C e temperaturas de anelamento que variam entre as enzimas (e-NTPDase 1, 3, 5, 6 e e-5'-Nucleotidase = 65°C, e-NTPDase 2 = 66°C e β -actina = 58.5°C). Após, o produto do PCR será submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% e será analisado utilizando o software Kodak 1D v.3.5.4.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

A análise da atividade enzimática será verificada através da quantidade de fosfato inorgânico liberado por mg de proteína. A expressão gênica será realizada a partir da densidade óptica relativa observada no gel de eletroforese que será analisado de maneira semi-quantitativa utilizando o software da Kodak. Os resultados obtidos em ambos os testes serão submetidos a um teste estatístico (ANOVA) para verificar a significância dos resultados obtidos.

4 RESULTADOS ESPERADOS E PERSPECTIVAS

A partir da realização deste trabalho espera-se contribuir para o conhecimento dos efeitos da cafeína sobre o sistema nervoso central. A análise dos efeitos da cafeína em astrócitos pode contribuir para clarear os mecanismos que envolvem a interação neurônio-glia.

Este trabalho proporcionará, além da produção de conhecimento, a publicação de artigos científicos e participações em congressos e eventos nacionais e internacionais, além do treinamento de alunos de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

BIANCHI, V. e SPYCHALA, J. Mammalian 5'-nucleotidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46195-46198, ago. 2003.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, mai. 1976.

BURNSTOCK, G. Purinergic Nerves. **Pharmacological Reviews**, v. 24, n. 3, p. 509-581, set. 1972.

_____. Purinergic cotransmission. **Brain Research Bulletin**, v. 50, n. 5-6, p. 355-357, nov. 1999.

_____. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 7, n. 7, p. 575-590, jul. 2008.

CHAN K. et al. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375-380, set. 1986.

COLGAN, S. P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling**, v.2, n.2, p. 351-360, jun. 2006.

COSTA M.S. et al, Caffeine Prevents Age-associated Recognition Memory Decline and Changes Brain-derived Neurotrophic Factor And Tيروسine Kinase Receptor (trkb) Content in Mice. **Neuroscience**, v. 153, p. 1071-1078 jun. 2008.

CORREIA-DE-SÁ, P. e RIBEIRO, J A. Evidence that the presynaptic A_{2A}-adenosine receptor of the rat motor nerve endings is positively coupled to adenylate cyclase. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 350, n. 5, p. 514-522, nov. 1994.

CUNHA R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 2, p.107-125, fev. 2000.

_____. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 111-134, mar. 2005.

DA SILVA, R.S. et al. Acute Caffeine Treatment Increases Extracellular Nucleotide Hydrolysis from Rat Striatal and Hippocampal Synaptosomes. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 8, p. 1249-1254, ago. 2003.

DUNWIDDIE, T. e MASINO, S. The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 31-55, 2001.

FAUSTHER, M. et al. Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 292, n. 3, p. 785-795, nov. 2006.

FIELDS, R. e BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 423-436, jun. 2006.

FREDHOLM, B. Purinoreceptors in the Nervous System. **Pharmacology and Toxicology**, v. 76, n. 4, p. 228-239, nov. 1995.

_____. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 83-133, mar. 1999.

_____. Adenosine and Brain Function. **International Review of Neurobiology**, v. 63, 191 – 241, 2003.

FÜRSTERNAU, C. et al. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**, v. 17, n. 2, p. 84-91, mar. 2006.

HAN, M. E. et al. Inhibitory effects of caffeine on hippocampal neurogenesis and function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 4, 976-980, mai. 2007.

HANDA, M. e GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 218, n. 3, p. 916-923, jan. 1996.

HERTZ, L., PENG, L., LAI, J. C. Functional Studies in Cultured Astrocytes. **Methods**, v. 16, n. 3, p. 293-310, nov. 1998.

LATINI, S. e PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 463-484, nov. 2001.

PINTO, S. et al. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. **FEBS letters**, v. 486, n. 3, p. 203-207, dez. 2000.

RALEVIC, V. e BURNSTOCK, G. Receptors for purines and Pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 413-492, set. 1998.

STEFAN, C., JANSEN, S. e MATHIEU, B. Modulation of purinergic signalling by NPP-type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 361-370, jun. 2006.

STRÄTER, N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. **Purinergic Signalling**, v.2, n.2, p. 343-350, mai. 2006.

ZIMMERMANN, H., VOGEL, M., LAUBE, U. Hippocampal localization of 5'-nucleotidase as revealed by immunocytochemistry. **Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 105-112, jul. 1993

_____. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 362, n. 4-5, p. 299-309, ago. 2000.

_____. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, mai. 2001.

_____. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 409-430, mai. 2006.

WINK, M.R. et al. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. **Neurochemistry international**, v. 43, n. 7, p. 621-628, dez. 2003

APÊNDICE A – Orçamento do Projeto

1 - Orçamento Bens de Consumo

Especificação	Quantidade	Valor (R\$)
Ácido tricloroacético	50g	102,00
Adenosina difosfato (ADP)	5g	247,00
Adenosina monofosfato (AMP)	1g	198,00
Adenosina trifosfato (ATP)	1g	762,00
Albumina	10g	155,00
Álcool polivinílico	50g	35,00
Cloreto de cálcio	100g	50,00
Cloreto de magnésio	50g	72,00
Cloreto de potássio	100g	58,00
Cloreto de sódio	500g	140,00
Glicose	50g	64,00
Hepes	50g	156,00
Hidróxido de sódio	250g	118,00
Molibdato de amônio	50g	250,00
Primers 5'-nucleotidase	25nM	150,00
Primers NPP 1	25nM	150,00
Primers NPP 2	25nM	150,00
Primers NPP 3	25nM	150,00
Primers NTPDase 1	25nM	150,00
Primers NTPDase 2	25nM	150,00
Primers NTPDase 3	25nM	150,00
Primers b-actina	25nM	150,00
Verde malaquita	100g	169,00
ρ -nitrofenil-5'-timidina monofosfato	250mg	2592,00
Vidraria, luvas, material de limpeza, de informática e de escritório	Variável	1000,00
Reagente Trizol	2000 mL	1200,00
Recipientes plásticos e vidraria: Placa e frasco para cultura de células, tubo criogênico, microtubos, ponteiras.	Variável	2500,00
Participação em 2 congressos científicos nacionais, incluindo transporte, estadia, alimentação e inscrição.	Variável	2000,00
Preço total dos materiais		13068,00
Imprevistos (20%)		2613,60
Subtotal		15681,60

2 - Orçamento Bens de Capital

Especificação	Quantidade	Valor (R\$)
Conjunto de Micropipetas	1	3000
Preço total dos materiais		3000
Imprevistos (20%)		600,00
Subtotal		3600,00

