

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

PAROMITA MAJUMDER

**Análise dos receptores P2X₂ e P2X₄ durante a
diferenciação neuronal**

São Paulo

14/02/2007

PAROMITA MAJUMDER

**Análise dos receptores P2X₂ e P2X₄ durante a
diferenciação neuronal**

**Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências (Bioquímica)**


Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Henning Ulrich

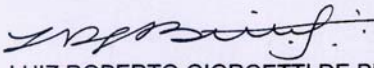
**São Paulo
2007**

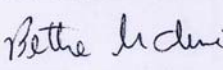


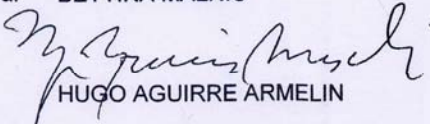
Universidade de São Paulo
Instituto de Química

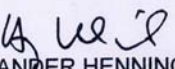
ATA. Julgamento da Tese de Doutorado em **Bioquímica** de **PAROMITA MAJUMDER**. Ao vigésimo terceiro dia do mês de março do ano de dois mil e sete às treze horas e trinta minutos, no anfiteatro Vermelho do pavimento superior do bloco seis deste Instituto, instalou-se a Comissão Julgadora da Tese de Doutorado intitulada "**Análise dos receptores P2X₂ e P2X₄ durante a diferenciação neuronal**", apresentada por **PAROMITA MAJUMDER**, cujos estudos pós-graduados visando o doutorado iniciaram-se em fevereiro de dois mil e dois, neste Instituto de Química. A Comissão Julgadora indicada nos termos do artigo 106 do Regimento Geral da Universidade de São Paulo constituiu os Professores Doutores: Alexandre Henning Ulrich (Orientador e Presidente), Hugo Aguirre Armelin (Instituto de Química - USP), Bettina Malnic (Instituto de Química - USP), Luiz Roberto Giorgetti de Brito (Instituto de Ciências Biomédicas - USP) Maria Teresa Riggio de Lima Landman (Universidade Federal de São Paulo). Verificado o cumprimento das exigências regulamentares, a Comissão Julgadora passou a arguir a candidata na seguinte ordem: Professores Doutores: Maria Teresa Riggio de Lima Landman, Luiz Roberto Giorgetti de Brito, Bettina Malnic, Hugo Aguirre Armelin e Alexandre Henning Ulrich. Concluídas as arguições, a Comissão Julgadora em sessão secreta, atribuiu os seguintes conceitos: Professores Doutores: Maria Teresa Riggio de Lima Landman (Aprovada), Luiz Roberto Giorgetti de Brito (Aprovada), Bettina Malnic (Aprovada), Hugo Aguirre Armelin (Aprovada) e Alexandre Henning Ulrich (Aprovada). Em conclusão, a candidata foi considerada **Aprovada**. Em seguida, a Comissão Julgadora elaborou relatório a ser encaminhado à Comissão de Pós-Graduação. Reaberta a sessão, o Senhor Presidente anunciou os resultados e deu por encerrados os trabalhos. E para constar eu, Cibele Rosani Carlos, Secretária da Pós-Graduação, lavrei a presente Ata que vai datada e assinada pelos membros examinadores. São Paulo, 23 de março de 2007.


Profa. Dra. MARIA-TERESA RIGGIO DE LIMA LANDMAN


Prof. Dr. LUIZ ROBERTO GIORGETTI DE BRITO


Profa. Dra. BETTINA MALNIC


Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN


Prof. Dr. ALEXANDER HENNING ULRICH



Universidade de São Paulo

Instituto de Química

CERTIFICADO DE DEFESA

CERTIFICO, para os devidos fins, que a Sra. **PAROMITA MAJUMDER**, código USP 3266941, defendeu em sessão pública, no dia 23 de março de 2007, no Programa de Ciências Biológicas (Bioquímica) do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo, a Tese de Doutorado intitulada: "**Análise dos receptores P2X₂ e P2X₄ durante a diferenciação neuronal**"

CERTIFICO, ainda, que a aluna faz jus ao título de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica, tendo sido o relatório da Comissão Julgadora homologado "**ad referendum**" pela Comissão de Pós-Graduação, em 26 de março de 2007.

São Paulo, 29 de março de 2007.

Cibele Rosani Carlos
Secretária da Pós-Graduação
Instituto de Química - USP



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICATE OF CONCLUSION

The Director of the Institute of Chemistry of the University of São Paulo hereby **CERTIFIES** that, according to the documentation available in the office of the Graduate Registrar of the Institute, Ms. **PAROMITA MAJUMDER**, concluded and defended her Doctoral Thesis in Biochemistry entitled: "**Análise dos receptores P2x₂ e P2X₄ durante a diferenciação neural**" on March 23, 2007 before a five-member Examining Committee consisting of the following members:

Thesis Examining Committee

Profs. Drs:

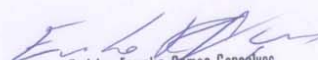
Alexander Henning Ulrich (Thesis Advisor & President)
Hugo Aguirre Armelin (Instituto de Química – USP)
Bettina Malnic (Instituto de Química – USP)
Luiz Roberto Giorgetti de Brito (Instituto de Ciências Biomédicas - USP)
Maria Teresa Riggio de Lima Landman (Universidade Federal de São Paulo)

Evaluation of Thesis:

Approved
Approved
Approved
Approved
Approved

I further certify that the result of the thesis defense was homologated by the Graduate Committee of the Institute and that Ms. **PAROMITA MAJUMDER** completed all of the other necessary requirements for obtaining the degree of Doctor of Science in Biochemistry from the Institute. The corresponding Diploma is currently in the process of expedition and registry by the University of São Paulo (USP).

Graduate Registrar of the Institute of Chemistry of the University of São Paulo, July 17, 2007.


Emílio Rodrigo Ferrelia Gomes Gonçalves
Técnico Acadêmico
IQUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 748 - 05508-000 - São Paulo - Brasil
Caixa Postal 26077 - 05513-970 - São Paulo - Brasil
FAX: (11) 3815-5579 - www.iq.usp.br

Dedicatória

Aos meus pais pelo amor, carinho, apoio para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO(S)

Ao Professor Dr. Henning Ulrich por ter me aceito como sua aluna de doutorado. Muito obrigada pela sua orientação, pelas oportunidades e pela sua amizade

Aos meus pais Pronab e Krishna e minha irmã Indrani pelo sempre amor, dedicação e carinho além do apoio principalmente durante a realização deste trabalho de tese.

Ao Professor Dr. Walter Colli e a Professor Dra. Maria Júlia Manso Alves por terem me aceito em seu laboratório em 2001 para estagiar durante alguns meses com o professor Henning. Gostaria também de agradecer o Dr. Ariel Mariano Silber, a Marinei, Roberto e a Célia.

Ao Professor Hugo Armelin por ter me permitido iniciar meu trabalho com cultura de células no início do meu doutorado. Eu aprendi muito com todos os seus alunos(Dr. Érico Costa, Gilson Murata, Dr. Ivan Tadeu Rebustini, Marianna Koga, Matheus Dias, Dra. Paula Asprino e a Maria) e com professor com quem tive oportunidade de interagir nas monitorias no curso de graduação de Bioquímica para Biologia nos anos de 2003 e 2004. Gostaria de agradecer também ao Professor Sandro R. Marana e aos seus alunos Lúcio Mendonça e Fabiane pela sempre disposição em me ajudar.

Aos meus amigos que me incentivaram muito durante o doutorado com idéias e muito ânimo, Alexandre Dermagos, Alexandre Quaresma, Dr. Alex Kors Vidsiunas, Dra. Armanda F. Gameiro, Arquimedes Cheffer, Dra. Elaine Favaro, Dr. Eric Kors Vidsiunas, Jacqueline Salotti, Júlio Rozenfeld, Dr. Miguel Filipe P. Carvalho, Mirabela Rusu e Tatiana Matos.

Gostaria de agradecer em especial aos meus amigos Katia Neves Gomes, Katia Yuahasi e ao Dr. Rodrigo R. Resende pela amizade e pela grande ajuda neste período final de tese.

Ao Cleber Augusto Trujillo pelas diversas medidas de whole cell recoding utilizando as bibliotecas SELEX e os aptâmeros selecionados.

Aos meus colegas de laboratório que foram sempre prestativos: Arthur Andrade Nery, Cristiana Carvalho Ribeiro, Hugo Arruda de Moura Torres, Cristiele Pereira e Zilda Domenice Bagh.

Ao Professor Dr. Fernando A. González, por nos ceder as células selvagens e transfectadas com receptores purinérgicos recombinantes as quais utilizei durante todo o doutorado.

Ao Dr. Antônio Carlos Cassola (ICBI) por ter me permitido utilizar o microscópio confocal do departamento de Biofísica (ICB-USP) e a Dra. Alicia Kowaltovski (IQ-USP) pela utilização do fluorímetro.

Aos Professores Dra. Vasanthi Jayaraman, Dra. Sudha Veeraraghavan, ao Dr. Roger O' Neil e aos alunos Dra. Gomathi Ramanoudjame, Diana Albarado, Dra. Rachel Brown e Yanlan Dong e pela oportunidade de aprender um pouco sobre estrutura de receptores e de desenvolver aptâmeros seletivos ao receptor TRPV4 através da técnica SELEX em Houston, Texas, EUA.

Ao Professor Dr. George P. Hess pelo treinamento no set up de eletrofisiologia na Cornell University e aos alunos do laboratório Dr. One Pagan, Dr. Kannan, Dra. Latha, Dra. Yong Lee e Dra. Vishanka em Nova York, EUA.

Ao Professor Dr. Manfred Lindau por ter me permitido estagiar em seu laboratório desenvolvendo a técnica de RNA de interferência transiente no modelo de estudo de exocitose nas células cromaffins em Nova York, EUA.

A Fundação Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa 01/14370-7 durante este período para a realização deste projeto e tese.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela sempre ajuda e atenção.

" De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo..

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho uma ponte...

Da procura um encontro...'"

Fernando Sabino

SUMÁRIO

Lista de abreviações, siglas e termos técnicos	xvi
Resumo	1
Abstract	3
Prefácio	5
1. Introdução	7
1.1 Purinas no desenvolvimento neuronal	8
1.2 Modelos <i>in vitro</i> de diferenciação neuronal	14
1.2.1 Células carcinoma embrionárias P19	16
1.2.2 Células de feocromocitoma de rato PC12	19
1.2.3 Células NH 15-CA2	20
1.3 Receptores purinérgicos	22
1.3.1 Receptor P2X ₂	24
1.3.2 Receptor P2X ₄	26
1.4 SELEX	27
1.4.1 Técnica SELEX	27
1.4.2 Método de seleção de aptâmeros pelo SELEX	29
1.4.3 SELEX e as técnicas de modulação gênica e protéica	32
1.4.4 Propriedades dos aptâmeros	33
1.4.5 Utilização como fármacos	34
2. Objetivos	37
3. Materiais e Métodos	39
3.1 Materiais	40
3.1.1 Linhagens celulares	40
3.1.2 Anticorpos	40
3.1.3 Fatores de indução a diferenciação	41
3.1.4 Enzimas e reagentes de Biologia Molecular	41
3.1.5 Inibidores de atividade de proteases	42
3.1.6 Kits	42
3.1.7 Meios de cultura e soros	42
3.1.8 Nucleotídeos e oligonucleotídeos	43
3.1.9 Plasmídeos	43
3.1.10 Drogas, antibióticos e reagentes diversos	44
3.1.11 Solventes	44
3.1.12 Soluções e tampões	44
3.2 Métodos	46
3.2.1 Diferenciação celular das células P19 em células neuronais	46
3.2.2 Diferenciação neuronal de células feocromocitomas de rato- PC12	46
3.2.3 Cultivo das células de glioma humano 1321N1 e da célula neural (di- híbrido neuroblastoma e glioma)- NH15-CA2	47
3.2.4 Imunofluorescência.	47

3.2.5	Reação de transcrição reversa e reação de PCR	48
3.2.6	<i>Calcium imaging</i> em microscopia confocal para avaliar a $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após aplicação de neuropeptídeos e neurotransmissores nas células P19, PC12 e NH15-CA2 e 1321N1-PLSXN, PLSXN P2X ₂ e PLSXN P2X ₄	50
3.2.7	Ensaio de diferenciação neuronal na presença de ligantes purinérgicos	51
3.2.7.1	Ensaio de determinação de progenitores P19 neurais na presença de ligantes purinérgicos	51
3.2.7.2	Ensaio de diferenciação neural de células P19 com inibidores de receptores purinérgicos- da passagem de progenitores neurais P19 (dia 3) a neurônios P19 (dia 8 e 9)	51
3.2.8	Medidas de correntes de <i>whole-cell</i> induzidas por ATP em células 1321N1 PLSXN-P2X ₂ R e PLSXN P2X ₄ e células PC12	52
3.2.9	Protocolo de extração de membrana celular	53
3.2.10	Ensaio de ligação radioligante-receptor	53
3.2.11	Protocolo de SELEX	54
3.2.11.1	Preparação da biblioteca	54
3.2.11.2	<i>Primer extension</i>	56
3.2.11.3	Amplificação da biblioteca e reação de <i>Error Prone PCR</i>	56
3.2.11.4	Análise da randomicidade da biblioteca de SELEX	57
3.2.11.5	Precipitação de <i>error-prone</i> PCR	57
3.2.11.6	Transcrição <i>in vitro</i>	58
3.2.11.7	Seleção <i>in vitro</i>	58
3.2.11.8	Transcrição reversa do RNA recuperado seguido de amplificação por PCR (RT-PCR)	59
3.2.11.9	Estringência durante os ciclos de seleções de SELEX	60
3.2.12	Clonagem antes para determinar o grau de randomicidade e posteriormente para identificação de aptâmeros selecionados	60
3.2.12.1	Preparação de bactérias competentes para clonagem dos insertos	60
3.2.12.2	Clonagem da biblioteca combinatória	61
3.2.12.3	Sequenciamento	62
3.2.13	Determinação da ligação específica e atividade inibitória das bibliotecas de RNA selecionados aos receptores P2X ₂ e P2X ₄	63
3.2.13.1	<i>Gel Shift</i>	63
3.2.13.2	Testes de ligação radioligante-receptor utilizando extrato de membranas contendo o receptor	63
3.2.13.3	Análise das regiões consenso e previsão da estrutura secundária	64
4.	Resultados	65
4.1.	Caracterização da diferenciação neuronal nas células de carcinoma embrionário P19	66
4.2.	Expressão de receptores de neurotransmissores NMDA e de acetilcolina e dos neuropeptídeos endotelina-B e B2 de cininas nas linhagens neuronais NH15-CA2 e carcinoma embrionário P19	69
4.3.	Identificação de receptores purinérgicos nas células neurais NH15-CA2 e P19 e durante sua diferenciação neural	75
4.4	Efeito da presença de ligantes de receptores purinérgicos sobre os fenótipos neuronais obtidos durante a diferenciação neuronal das células P19	81
4.4.1	Efeito de ligantes de receptores purinérgicos sobre estágio precoce da diferenciação na formação de corpos embrionários	81

4.4.2 Efeito da presença de ligantes de receptores purinérgicos sobre a diferenciação final de células P19 em neurônios	87
4.5 Caracterização das células 1321N1 transfectadas com os receptores P2X ₂ e P2X ₄ de rato	94
4.6 Construção da biblioteca combinatória para o procedimento SELEX	101
4.7 Seleção de antagonistas específicos utilizando SELEX	107
4.8 Avaliação da atividade dos aptâmeros selecionados contra os receptores P2X ₂ e P2X ₄	115
4.9 Inibição de receptores purinérgicos nas células PC12 e P19 utilizando aptâmeros específicos aos receptores P2X ₄	123
4.10 Inibição de receptores purinérgicos nas células PC12 utilizando aptâmeros específicos aos receptores P2X ₂	128
5. Discussão	129
5.1. Caracterização da diferenciação neuronal nas células de carcinoma embrionário P19	130
5.2. Expressão de receptores de neurotransmissores NMDA e de acetilcolina e dos neuropeptídeos endotelina-B e B2 de cininas nas linhagens neuronais NH15-CA2 e carcinoma embrionário P19	132
5.3. Identificação de receptores purinérgicos nas células NH15-CA2 e durante a diferenciação neuronal das células P19	136
5.4 Efeito da presença de inibidores de receptores purinérgicos sobre os fenótipos neuronais obtidos durante a diferenciação neuronal das células P19	140
5.5 Caracterização das células 1321N1 transfectadas com os receptores P2X ₂ e P2X ₄ de rato	148
5.6 A técnica SELEX e os ciclos de enriquecimento de seqüências	150
5.7 Caracterização de seqüências identificadas	152
5.8 Estrutura secundária dos aptâmeros	155
5.9 Inibição de receptores purinérgicos nas células PC12 e P19 utilizando os aptâmeros selecionados	156
5.10 Perspectivas	159
6. Conclusões	160
7. Referências Bibliográfica	163
8. Súmula Curricular	186

Figuras

Figura	Título	página
1	Padrão de desenvolvimento e diferenciação neural a partir da célula-ovo em glias e neurônios.	9
2	Receptores de neurotransmissores e neuropeptídeos coordenam a diferenciação neural.	11
3	Esquema de sinalização purinérgica na fenda sináptica, semelhante ao que ocorre na junção neuro-muscular.	14
4	Processo de diferenciação neural.	21
5	Esquema de atuação das técnicas de modulação gênica: <i>triplex-forming oligonucleotide</i> (TFO), RNA antisense e RNA de interferência (RNAi) e atividade protéica por SELEX	33
6	Esquema de seleção de aptâmeros com atividade inibitória aos receptores de membrana.	55
7	Esquema da diferenciação neuronal das células de carcinoma embrionário P19	67
8	Expressão gênica de VAMP-2 e RECK e dos respectivas β -actinas ao longo da diferenciação neuronal das células P19 e NH15-CA2.	68
9	Medidas de $(\Delta[Ca^{2+}]_i)$ em células individuais NH15-CA2 após aplicação de neurotransmissores.	70
10	Análise da $\Delta[Ca^{2+}]_i$ nas células P19 nos três estágios de diferenciação após aplicação de neurotransmissores ou neuropeptídeos.	71
11	Detecção da expressão e atividade do receptor B2 de cininas (BkR2) nas células NH15-CA2.	73
12	Análise da variação de cálcio intracelular livre $(\Delta[Ca^{2+}]_i)$ após aplicação de bradicinina e carbamoilcolina (CCh) em células P19 indiferenciadas e neurônios dia 7	74
13	Medidas de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após aplicação de ATP nas células PC12 indiferenciada-progenitor e neurônios PC12 diferenciadas com FGF-b	76
14	Identificação da expressão gênica, proteica e de atividade dos receptores purinérgicos nas células NH15-CA2.	77
15	Análise da variação de cálcio intracelular livre $(\Delta[Ca^{2+}]_i)$ após aplicação de diferentes concentrações de ATP nas células P19 pluripotentes indiferenciadas, neurônios neurônios e glias P19 dia 11.	79
16	Expressão gênica e proteica de receptores purinérgicos em diferentes estágios celulares de diferenciação neural das células P19.	80
17	Distribuição do tamanho de corpos embrionários (CE) em porcentagem (%) na ausência ou presença de ligantes purinérgicos.	83
18	Efeito do pré-tratamento de progenitores neurais P19 dia 3 com ligantes purinérgicos na maturação neural.	90
19	Padrão de atividade de receptores purinérgicos e colinérgicos de neurônios provenientes de ensaios na presença de ligantes purinérgicos (brilliant blue, PPADS, RB-2, brilliant blue ou suramina) a partir do estágio de progenitores neurais P19 (dia 3).	91
20	Detecção da expressão gênica dos receptores purinérgicos cálcio-seletivos P2X ₂ , P2X ₄ e P2X ₇ e do receptor muscarínico de acetilcolina M1 nas células provenientes dos diferentes ensaios na presença de ligantes purinérgicos.	93
21	<i>Calcium imaging</i> em microscopia confocal das células 1321N1 expressando receptores P2X ₂ ou P2X ₄ sob estímulo ou não de 100 μ M de ATP.	95

22	Caracterização dos receptores P2X ₄ recombinantes expressos nas células 1321N1.	97
23	Caracterização da expressão gênica e protéica e capacidade de ligação de (³² P-ATP) das células 1321N1 transfectadas com o receptor P2X ₂ .	98
24	Ensaio de determinação de IC ₅₀ e ensaios de Scatchard com ³² P-ATP e o receptor P2X ₄ .	100
25	Construção da biblioteca SELEX	103
26	Padronização das condições dos ensaios de seleção <i>in vitro</i> de aptâmeros com afinidade a receptores P2X.	105
27	Análise de randomicidade da biblioteca de SELEX.	106
28	Experimentos de <i>gel shift</i> para verificação da ligação de (³² P) ATP ou (³² P) RNA do ciclo 3 P2X ₄ ao extrato de membrana PLSXN-P2X ₄ .	109
29	Avaliação do enriquecimento de moléculas de RNA resistente à nucleases ao receptor P2X ₂ avaliados por ensaios de ligação e <i>patch clamping</i> em <i>whole cell recording</i> .	110
30	Análise de ligação específica e atividade das moléculas de RNA selecionadas ao receptor	111
31	Avaliação do enriquecimento de moléculas de RNA como ligantes dos receptores P2X ₂ ou P2X ₄ em <i>gel shift</i> .	114
32	Efeito da co-aplicação de RNA resistente à nucleases do ciclo 9- P2X ₄ R junto com ATP sobre a atividade dos receptores P2X ₄ e P2X ₂ em células 1321N1	116
33	Identificação de aptâmeros presentes nas bibliotecas ciclo 9 P2X ₄ e ciclo 11 P2X ₂	118
34	Avaliação da afinidade e potencial dos aptâmeros anti-receptor P2X ₄ por ensaios de ligação radioligante receptor e <i>patch clamping</i> em <i>whole-cell recording</i> .	119
35	Identificação de seqüências do ciclo 11 P2X ₂ e ensaios de ligação radioligante-receptor.	120
36	Predição da estrutura secundária e identificação do grampo estrutural candidato a atividade de inibição.	122
37	Efeitos da presença de RNA resistente à nucleases (ciclo 0 e 9-P2X ₄) sobre a formação de corpos embriônicos.	124
38	Efeitos de RNA resistente à nucleases ciclo-9-P2X ₄ como inibidores da atividade dos receptores purinérgicos P2X ₄ nas células P19 e PC12.	127
39	Ensaio de <i>patch clamping</i> em <i>whole cell recording</i> nas células PC12 utilizando o aptâmero A63 P2X ₂ membro da família conservada II	128
40	Participação dos receptores purinérgicos P2X ₂ e P2X ₄ na diferenciação neuronal de células P19	138
41	Participação dos receptores purinérgicos na diferenciação neuronal das células P19.	145

Tabelas

Tabela	Título	página
1	Expressão de receptores e canais iônicos na diferenciação neural das células P19.	18
2	Lista de <i>primers</i> e condição para reação de PCR para análise de expressão gênica	48
3	Sumário do padrão farmacológico de agonistas (EC_{50}) e antagonistas (IC_{50}) em micromolar de receptores purinérgicos ionotrópico e metabotrópico descritos na literatura	82
4	Expressão de receptores purinérgicos nos diferentes estágios de diferenciação neuronal das células P19	82
5	Sumário dos dados de distribuição de CE obtidos após o tratamento das células P19 induzidas a diferenciação na presença de ligantes purinérgicos	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E TERMOS TÉCNICOS

$\Delta[Ca^{2+}]_i$ = variação de cálcio livre intracelular
 γ IFN= interferon gama
[ATP]_E= concentração de ATP extracelular
2'-F' dUTP= 2'-fluoro uridina trifosfato
2'-F'dCTP= 2'-fluoro citosina trifosfato
act.= β -actina
Agitador= *shaker*
Aldh1= aldeído desidrogenase
AMD= coroidal neovascularização
AMP cíclico= adenosina monofosfato cíclico
AMPA= α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato ou *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
AMPC dependente de proteína quinase A ou *cyclic AMP-dependent protein kinase A*
AMV= *Avian Myeloblastosis Virus* Enzima de transcriptase reversa
animais com deleção para o gene= *knock-out*
AR= ácido retinóico ou *retinoic acid*
Arranjos= *arrays*
associação alternativa de RNA mensageiro= variantes de *splicing* ou *splicing* alternativo
Ativação do canal= *gating*
bHLH- fatores de transcrição básico hélice-alça-hélice ou *Basic Helix-Loop-Helix*
bibliotecas de peptídeos= *phage display*
Bk= bradicinina.
BkR2= receptor B2 de cininas
BMP-4= proteína morfogenética do osso-4 ou *bone morphogenetic protein-4*
CCh= carbamoilcolina
CE= corpos embriônicos ou corpos embrióides
Cel=célula.
células de fibroblasto irradiado= *feedlayers*
células lâmina basal= *floor plate*
CICR= liberação de cálcio dos estoques intracelulares ou *Calcium-induced Ca²⁺ release*
corte ou *cutoff*
CREB= proteína elemento ligante de AMPC
DAPI= 4',6-Diamidino-2-fenilindoleo
Dibutiril cAMP=dibutiril AMPC
DMEM= *Dulbecco's modified Eagle medium*
DMSO= dimetil sulfóxido
DOPA= *l-3,4-dihydroxyphenylalanine*
EC= carcinoma embrionário
EC₅₀= concentração do agonista para ativar 50% de resposta do receptor
EDTA= *EthyleneDiamineTetrAcetic acid*
EG= embriônicas germinativas
EGF= fatores de crescimento epidermal ou *epidermal growth factor receptors*

EGTA= *ethylene glycol tetraacetic acid*
 Eletrofisiologia de cinética rápida em configuração de células inteira=*Patch clamping in Whole cell recording configuration*
 ERK= extracellular signal regulated kinase
 ES= célula-tronco embrionária murina
 estudos de renovação = *turn-over*
 extensão do iniciador ou *primer extension*
 F/Fo= fluorescência/fluorescência mínima
 F= fluorescência
 FGF 8= fator de crescimento de fibroblasto 8
 FGF-2 = fator de crescimento de fibroblasto ou *fibroblast growth factor-2*
 FGF-b= fator de crescimento de fibroblasto básico ou *Fibroblast Growth Factor-basic*
 FITC=fluorescêina isotiocianato
 FITC=fluorescêina isotiocianato
 F_{máx}= fluorescência máxima
 F_{mín}=fluorescência mínima
 fosfatase alcalina tecido não específica ou *tissue-nonspecific alkaline phosphatase*
 G2-M= ciclo celular G2-M
 GABA_A = ácido aminobutírico do tipo A ou *gama amino butyric acid*
 GADHP= gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase ou *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
 GFAP= proteína fibrilar ácida da glia ou *glial fibrillary acidic protein*
 HA= fator ativador de desenvolvimento encefálico
 HEPES= ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
 HER3= receptor 3 do fator de crescimento epidermal humano ou *human epidermal growth factor receptor 3*
 HOE-140= H₂N-D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-D-Tic-Oic-Arg-OH
house keeping gene= normalizador ou controle interno da reação
 HS= soro de cavalo
 IC₅₀ = concentração do antagonista para inibir 50% de resposta do receptor
 IgE= imunoglobulina E
 imageamento de cálcio= *Calcium imaging*
 imageamento de fósforo ou *phosphor imaging*
 IN =células indiferenciadas.
 InsP3= trifosfato de inosital
 InsP3P= fosfatidil-inositolfosfato
 iono=ionóforo,
 IPTG= Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
 K_i = constante de inibição
 LB= Luria-Bertani
 LFA-1= beta 2 integrina linfócito função-antígeno associada ou *αLβ2 integrin adhesion molecule*
 LIF= fator inibitório da leucemia ou *leukemia inhibitory factor*
 LTD= depressão de longa duração ou *long term depression*
 LTP= potencial de longa duração ou *long term potentiation*
 MAP-2= proteína associada ao microtúbulo ou *microtubule-associated protein*

MAPK= proteína quinase ativada por mitógeno ou *mitogen-activated protein kinase*
 marcação à frente= *forward labeling*
 Mash-1= *mammalian achaete-scute homolog-1*
 MHB= *mid/hindbrain boundary*
 MM= marcador de massa molecular
 MMLV= *Moloney murine leukemia virus-reverse* Enzima de transcriptase reversa
 Na-MOPS= ácido 3-N-Morfolino propanesulfônico de sódio
 Neurocan= *Anti-Neurocan Monoclonal*
 NGF= fator de crescimento de nervo ou *nerve growth factor*
 NMDA= N-metil-D-aspartato ou *N-methyl-D-aspartic acid*
 NO= óxido nítrico
 NPC= células progenitoras neurais ou *neural progenitors cells*
 NPC=Células progenitoras neurais ou *Neural progenitor cells*
 NSE=*enolase específica de neurônio* ou *neuron-specific enolase*
 NTPDase= ecto-nucleosidase trifosfato defosfohidrolase ou *ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*
 P1=receptores de adenosina
 P19=células de carcinoma embrionário murino
 P2=receptores purinérgicos
 P2X= receptores purinérgicos do tipo ionotrópico
 P2Y= receptores purinérgicos do tipo metabotrópico
 PBS= Tampão fosfato salino com cálcio e magnésio ou *Phosphate Buffered Saline with Calcium and Magnesium*
 PBSA= Tampão fosfato salino ou *Phosphate Buffered Saline*
 PC12= células feocromocitoma de rato
 PCR.= Reação de polimerase em cadeia
 PDGF= Platelet-derived growth factor
 PKA= proteína quinase A
 PMSF= fenilmetilsulfonil fluorido
 PPADS= piridoxal fosfato 6-azofenil-2', 4'-ácido dissulfônico ou *Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate*
 PSA-NCAM= forma polisialilada da molécula de adesão celular neural ou *polysialylated form of the neural cell adhesion molecule*
 PTPase= proteína tirosina fosfatase
 RAR= receptores de ácido retinóico
 RARE= elementos responsivos ao ácido retinóico ou *acid responsive element*
 Ras/Raf/MEK/
 RECK= *reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*
 RNAi= RNA de interferência ou *interference RNA*
 RT-PCR- reação de transcrição reversa seguida da reação de polimerase em cadeia
 RXR= receptores de ácido retinóico
 SDS= dodecil sulfato de sódio
 SELEX= evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial ou *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*
 SFB= soro fetal bovino
 Shh= sonic hedgehog

SNARE= N-etilmaleimida fator sensível ou *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*, SNARE)
Subregulação= *down regulation*
subunidades do receptor de NMDA N1R e N2D
TAE- tampão ácido acético EDTA
taps.=Tapsigargina
TBE-tampão Tris EDTA ácido bórico
TE-tampão EDTA pH=8,0
TFO= oligonucleotídeos que formam tríplexes ou *Triplex-Forming Oligonucleotide*
TH= tirosina hidroxilase
TLCK= N-alfa-tosil-L-lisil-clorometil cetona
TNAP= tissue-nonspecific alkaline phosphatase
TNF- β .= *Tumor necrosis factor*
trans.= transmissão
VAMP-2= sinaptobrevina-2 ou vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin-2
VEGF= vascular endothelial growth factor (VEGF)
X-gal= 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-galactopiranosídeo
 ΔF = variação de fluorescência.
 ΔG = variação de energia livre

RESUMO

(Majumder, P). Análise dos receptores P2X₂ e P2X₄ durante a diferenciação neuronal. 2007. 189 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, as oscilações da concentração de cálcio intracelular livre resultam na proliferação celular, migração e diferenciação neuronal. Nesta tese foram investigadas a participação dos receptores ionotrópicos purinérgicos dos tipos P2X₂ e P2X₄ seletivos ao influxo de cálcio durante a diferenciação neuronal *in vitro* das células de carcinoma embrionário murino P19. Identificamos o padrão diferencial de expressão de receptores purinérgicos nas células indiferenciadas e neurônios P19. O receptor P2X₄ é expresso durante toda a diferenciação neuronal e o receptor P2X₂ é detectado na fase tardia da diferenciação em neurônios. Através de ensaios farmacológicos, foi possível identificar a participação dos receptores metabotrópicos P2Y e do receptor P2X₄ na formação dos corpos embrionários, na proliferação celular e ou na determinação do fenótipo de progenitor neural. Durante a maturação neuronal os receptores P2X₂ e P2Y₁ participam da determinação do fenótipo neuronal glutamatérgico NMDA e os receptores P2X₂ e P2Y₂ no fenótipo neuronal colinérgico. A ausência de inibidores específicos e seletivos aos receptores purinérgicos levou-nos a empregar a técnica SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) a fim de identificar inibidores seletivos aos receptores P2X₂ e P2X₄. A técnica envolve a utilização da biblioteca combinatória randômica de RNA 2'-F pirimidina modificadas resistentes a nucleases. Após 9 ciclos de seleção *in vitro* de SELEX (ciclo 9-P2X₄), as seqüências selecionadas mostraram-se seletivas a ligação somente ao receptor P2X₄ e não aos receptores P2X₂ ou P2X₇ através de ensaios de ligação radioligante-receptor. Por *patch clamping* na configuração *whole cell recording* identificou-se que além de seletividade ao receptor, que a aplicação do RNA ciclo 9-P2X₄ promoveu inibição da corrente ativada pelo ATP somente nos receptores P2X₄ e não em P2X₂ em células 1321N1 astrocitoma transfectadas.

A incubação do RNA ciclo 9-P2X₄ na concentração de 200 nM com as células no estágio indiferenciado inibiu a formação dos corpos embrionários. Já utilização de 25 nM, resultou em mudanças morfológicas nas células diferenciadas. Estes dados

corroboram com os dados farmacológicos que identificaram a participação do receptor P2X₄ na diferenciação precoce. Após 11 ciclos P2X₂ de seleção, identificou-se seqüências com especificidade de ligação aos receptores P2X₂. Aptâmeros, moléculas de RNA com seqüência identificada e com alta afinidade ao alvo da seleção, foram isolados de ambas as bibliotecas, ciclo 9 P2X₄ e ciclo 11 P2X₂. A co-aplicação destes aptâmeros e ATP em ensaios de *whole-cell recording* resultou na inibição de 30 a 80% da corrente ativada pelo ATP nos receptores P2X₂ ou P2X₄. Estes testes em células PC12 de rato, que expressa os receptores endógenos, resultou em inibição da corrente ativada pelo ATP de modo semelhante.

Além de termos desenvolvido aptâmeros como ferramentas para elucidar as funções dos receptores P2X₂ e P2X₄ durante o desenvolvimento, diferenciação, em processos fisiológicos e patológicos, estas moléculas resistentes a nucleases são as primeiras identificadas capazes de reconhecer, discernir e inibir dois subtipos de receptores purinérgicos sendo promissores para utilização terapêutica.

Palavras-chave: Receptores purinérgicos, receptores ionotrópicos, P2X, SELEX, aptâmeros, inibidores, células de carcinoma embrionário murino P19, diferenciação neuronal, Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment.

ABSTRACT

(Majumder, P.) Analysis of P2X₂ e P2X₄ receptors during neuronal differentiation. 2007. 189 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

During the development of the nervous system, oscillations of intracellular calcium concentrations activate programs of gene expression resulting in proliferation, migration and neuronal differentiation of embryonic cells. In this thesis, the participation of ionotropic P2X₂ and P2X₄ receptor subtypes, whose receptor channels are highly permeable for calcium influx in the cells, was studied during the process of neuronal differentiation. We have identified differential gene expression of purinergic receptors in undifferentiated and neuronal-differentiated P19 cells. P2X₄ receptor expression was present along neuronal differentiation of P19 cells, whereas P2X₂ receptor expression was only detected when P19 cells became neurons. Based on purinergic receptor pharmacology we have determined the participation of P2X₄ receptors in addition to metabotropic P2Y₂ receptors in the formation of embryonic bodies as prerequisites for phenotype determination of P19 neural progenitor cells. Final neuronal maturation of P19 cells in the presence or absence of agonists or antagonists of purinergic receptors implicated the involvement of P2X₂, P2Y₁, and P2Y₂ in the determination of the final neuronal phenotype, such as expression of NMDA-glutamate and cholinergic receptors. In order to further evaluate the functions of these P2X receptors and due to the absence of specific inhibitors for these receptor subtypes, we have used the SELEX technique (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) to select for specific inhibitors for P2X₂ and P2X₄ receptors. The 2'-F-pyrimidine modified, nuclease-resistant combinatorial SELEX RNA pool enriched with inhibitors of P2X₄ receptors following nine cycles of *in vitro* selection (cycle 9-P2X₄) specifically interacted with P2X₄ receptors and not with P2X₂ or P2X₇ receptors as verified in radioligand-receptor binding studies. Moreover, whole-cell recording measurements using astrocytoma cells expressing recombinant rat P2X₂ or P2X₄ receptors showed inhibition of P2X₄ but not of P2X₂ receptors by the selected RNA molecules. RNA molecules selected *in vitro* in 11 reiterative SELEX cycles using the P2X₂ receptor as target specifically bound to membrane extracts containing recombinant P2X₂ receptors.

From both selected RNA libraries (against P2X₄ and P2X₂ receptors) aptamers, as RNA molecules with identified sequences and high-affinity binding, were identified by cloning and DNA sequencing. The presence of these aptamers in whole-cell recording experiments resulted in 30-80% inhibition of ATP-induced receptor activity and did not provoke any inhibitory effects on P2X receptors which had not been used as selection target. The activity of the aptamers selected using recombinant receptors as targets in inhibiting wild-type P2X₄ or P2X₂ receptors was verified in whole-cell recording experiments with PC12 cells which endogenously express both receptor subtypes. In addition of having developed aptamers as tools to elucidate P2X₂ and P2X₄ receptor functions during neuronal differentiation, these nuclease-resistant aptamers are suitable for *in vivo* use and may turn into therapeutics in the inhibition of purinergic receptor participation in pathophysiological conditions.

Keywords: Purinergic receptors, P2X, SELEX, aptamers, inhibitors, P19 embryonal carcinoma cells, Neuronal differentiation, Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment, ionotropic receptor.

Prefácio

Oscilações da concentração de cálcio intracelular livre estão envolvidas com diversos processos celulares como a diferenciação neuronal. No início da diferenciação neuronal, ativada por fatores extrínsecos, ocorre ativação de um novo repertório gênico resultando na expressão de receptores ionotrópicos e metabotrópicos que participam da progressão no processo.

Nosso grupo tem se dedicado a compreender a participação de receptores de neurotransmissores no desenvolvimento e diferenciação neuronal utilizando modelos de diferenciação *in vitro*, PC12, NH15-CA2 e P19, que quando induzidas a diferenciação resultam em neurônios funcionais. Nestas células são investigadas a expressão gênica, identificação protéica e atividade do receptor no estágio da diferenciação que é correlacionado com o estágio da diferenciação.

Neste presente trabalho, foram apresentados somente os dados gerados sob minha responsabilidade que abrangem: a identificação da atividade dos receptores de NMDA, endotelina-B, B2 de cininas, acetilcolina e purinérgicos em células NH15-CA2 e P19 (longo da diferenciação neuronal), expressão gênica de alguns dos receptores e subunidades purinérgicas, de inibição de receptores purinérgicos no estágio de determinação do estágio do progenitor neural e durante a maturação neuronal, análise funcional da atividade de receptores purinérgicos, de NMDA e acetilcolina das células diferenciadas resultantes, identificação de aptâmeros com alta afinidade e especificidade aos subtipos de receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₄ através da técnica SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*), transcrição *in vitro* destes aptâmeros em testes eletrofisiológicos e de ensaio radioligante-competidor, inibição dos receptores purinérgicos P2X₄ na diferenciação neuronal na formação do progenitor neuronal utilizando os aptâmeros. Parte destes dados fazem parte de algumas publicações do laboratório que estão em anexo a este trabalho.

Neste período de doutorado, tive a oportunidade de estagiar no laboratório do Dr. George P. Hess aprendendo a técnica de *patch clamping* em *whole cell configuration* com a Dra. Armanda Gameiro em julho de 2002. Em 2004 após participar do congresso da Biophysical Society, estagiei por duas semanas no laboratório do Dr.

Manfred Lindau e realizei alguns experimentos de RNA de interferência em células cromafins decromafins de camundongo. Já em 2006, no laboratório da Dra. Vasanthi Jayaraman tentei expressar o domínio extracelular do receptor P2X₂ para iniciar estudos estruturais com esta porção. Pudemos identificar uma região hidrofóbica neste domínio que dificultou a expressão desta porção e no mesmo período, no laboratório do Dr. Roger O'Neil iniciei o procedimento de SELEX em receptores TRPV4 chegando ao sexto ciclo de seleção passando o trabalho a aluna de pós doutorado do professor.

Introdução

1.Introdução

1.1 Purinas no desenvolvimento neuronal

O desenvolvimento embrionário inicia-se após a fusão do óvulo e do espermatozóide originando a célula-ovo a qual é totipotente, capaz de originar o organismo. Durante o processo, esta célula sofre sucessivas clivagens passando aos estágios de mórula, blástula, gástrula e nêurula quando neste estágio inicia-se formação do sistema nervoso. Durante este processo, as células recebem sinais extrínsecos (fatores solúveis indutíveis) que agem de modo endócrino, parácrino e autócrino. Há ativação de vias intracelulares que modulam a atividade de fatores de transcrição que resulta na modulação do padrão gênico, com ativação da expressão de proteínas importantes para a diferenciação celular. As células ectodérmicas presentes linha central dorsal na fase de gástrula adquirem propriedades de epitélio colunar estruturam para a formação do tubo neural durante o processo de neurulação. A habilidade destas células competentes em responder a sinalização é dependente do padrão gênico e do repertório preciso de expressão de receptores, moléculas de transdução de sinal e fatores de transcrição expressos no momento da sinalização (Kandel e cols., 2000).

A diferenciação dos progenitores neuronais e gliais é iniciada na blástula (Fig.1), pela secreção de fatores indutíveis da região organizadora presente no lábio dorsal do blastóporo, composta de células não neurais. A liberação de fatores como folistatina, nogina e chodina em conjunto levam ao bloqueio da sinalização da proteína morfogenética do osso-4 (*bone morphogenetic protein-4*, BMP-4) nas células competentes ectodérmicas resultando na formação do tecido anterior da placa neural. A exposição das células ao ácido retinóico leva a formação do tecido da placa neural posterior (Kandel e cols., 2000). O ácido retinóico interage com seus receptores RAR e RXR que atuam nos elementos responsivos ao ácido retinóico (*acid responsive element*, RARE), presentes no núcleo. Nas células de carcinoma embrionário, após aplicação de *all trans* ácido retinóico, as células perdem as características de carcinoma. Há regulação negativa dos fatores de domínio-POU como Oct-3 e genes responsivos AP-1 (Puga e cols., 2005). O complexo RAR/RXR reconhece elementos específicos do

promotor ao ácido retinóico (RARE) desencadeando a regulação de transcrição de genes alvo como AP-2 que leva ativação da diferenciação neuronal (Puga e cols., 2005).

A ativação destes receptores *in vivo* resulta na expressão das primeiras proteínas relevantes ao desenvolvimento como os fatores de transcrição básico hélice-alça-hélice (*Basic Helix-Loop-Helix*, bHLH), *Sonic Hedgehog*, Pax 6, Mash-1 (*mammalian achaete-scute homolog-1*), Math1 ou Neuro D e Wnt-1. Tais fatores foram também identificados durante a diferenciação *in vitro* de células de carcinoma embrionário e células-tronco embrionários (Guan e cols., 2001). Ocorre também no interior da célula eventos permissivos de sinalização de transientes de cálcio intracelular livre os quais resultam na ativação de genes primordiais (Duprat, 1996). O íon cálcio está envolvido nos processos de proliferação, migração, motilidade, diferenciação celular, atividade de proteínas quinases e de fatores de transcrição (Lauder, 1993; Berridge, 1993).

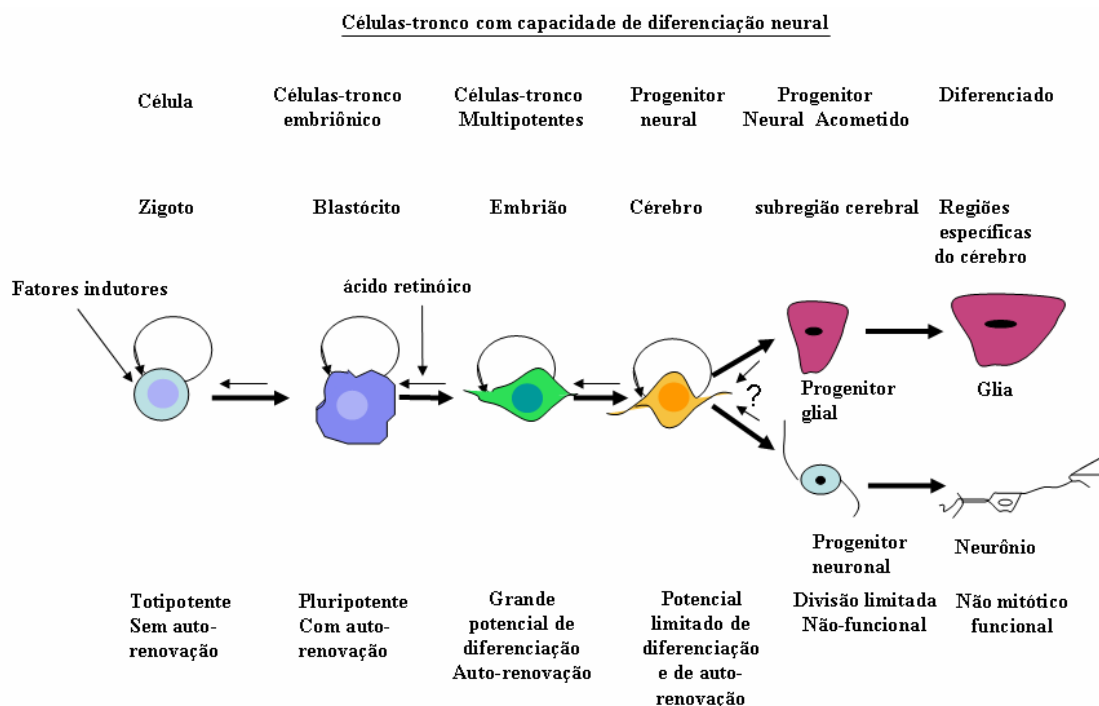


Figura.1. Padrão de desenvolvimento do sistema nervoso central e da diferenciação neuronal e neural *in vitro*. O esquema compara os estágios de diferenciação das células *in vivo* e *in vitro* e a capacidade de proliferação e diferenciação celular em cada estágio.

Simultâneo a finalização da formação do tubo neural, as primeiras células iniciam sua diferenciação em neurônios. As células progenitoras expressam proteínas neuronais tais como neurofilamentos, receptores ionotrópicos, canais voltagem-dependentes de sódio e cálcio (Dietzel, 1995) e fatores de transcrição como da família SOX (Pevny e Placzek, 2005) e Notch (Kageyama e cols., 2005) (Fig.2). A estrutura expande-se de modo diferencial iniciando a formação de estruturas especializadas do sistema nervoso. A região caudal origina a medula espinhal e a rostral, o encéfalo.

As células do tubo neural migram das zonas de proliferação celular para sua posição permanente no sistema nervoso adulto (O'Rourke e cols., 1992; Gotz e Huttner, 2005) quando ocorre o término da diferenciação neuronal e há a maturação das sinapses. Neste período, metade das células neuronais sofre morte programada no córtex cerebral. Os axônios das células remanescentes já formaram sinapses funcionais com as células alvo. O neurônio funcional transmite sinais químicos (neurotransmissores) e elétricos a outros neurônios e células alvos, possui receptores metabotrópicos e ionotrópicos funcionais e canais iônicos voltagem-dependentes específicos que permitem a célula responder sinapses aferentes.

Durante a maturação das células progenitoras, fase anterior ao estabelecimento de sinapses corticais e subcorticais, as células ficam em contato com neurotransmissores, que agem semelhantes a fatores de crescimento como glutamato, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (*alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPA), N-metil-D-aspartato (*N-methyl-D-aspartic acid*, NMDA), kainato, ácido aminobutírico do tipo A (*gamma amino butyric acid*, GABA_A), glicina, serotonina e acetilcolina entre outros. Neste estágio ocorre a ativação de receptores que resultam no aumento de cálcio intracelular.

Os diversos tipos de oscilação da concentração de cálcio intracelular que estão envolvidos no controle dos diversos aspectos da diferenciação, como na expressão de enzimas responsáveis pela síntese do neurotransmissor GABA (picos de cálcio) ou extensão de neuritos (ondas de cálcio) (Webb e Miller, 2003). No estágio inicial do desenvolvimento de embriões de *Xenopus*, Gu e Spitzer, (1997) identificaram a ocorrência de picos e ondas de cálcio nas células. Os picos possuem cinética rápida,

através da entrada de cálcio intracelular pelos canais de cálcio voltagem-dependente que resulta na liberação dos estoques intracelulares de cálcio (*Calcium-induced Ca²⁺ release-CICR*) através dos receptores de rianodina. Já as ondas de cálcio intracelular, de cinética lenta, ocorrem no potencial de repouso celular e são amplificadas pela liberação do estoque intracelular de cálcio.

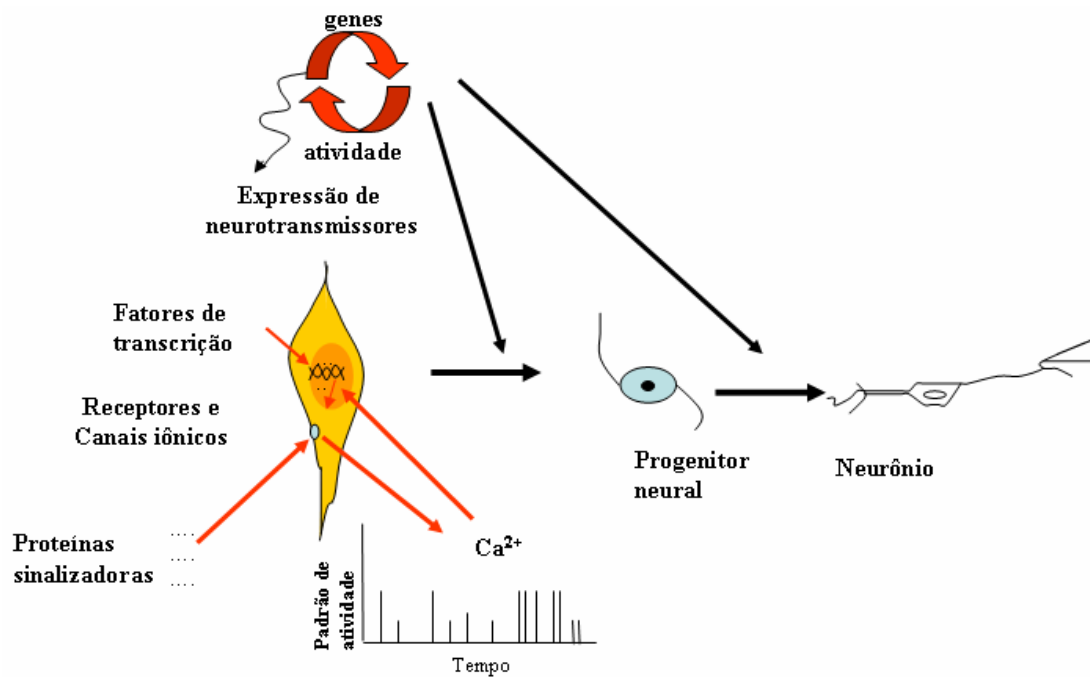


Figura.2. Receptores de neurotransmissores e neuropeptídeos participam da progressão da diferenciação neuronal. Os fatores solúveis ativam o programa epigenético para início da diferenciação das células competentes. O padrão de fatores de transcrição ativados ou reprimidos coordena o padrão do repertório gênico a ser ativado que inclui a expressão de receptores metabotrópicos e ionotrópicos. Os neuropeptídeos e neurotransmissores liberados no microambiente celular regulam o padrão de atividade de picos e ondas da concentração de cálcio livre no citossol. As vias de sinalização ativam a expressão de enzimas responsáveis pela síntese de neurotransmissores e neuropeptídeos, transportadores e receptores os quais determinam o fenótipo final dos neurônios. Esquema modificado de Spitzer e cols, 2004.

A sinalização de cálcio intracelular na diferenciação neuronal pode ser mediada pela ativação de receptores P2 purinérgicos os quais podem ser acoplados a proteína

denominada P2Y (metabotrópicos) ou a canais, P2X (ionotrópicos). A variação da concentração de cálcio intracelular livre mediada pelas purinas foi verificada inicialmente durante o desenvolvimento embrionário em astrócitos na coluna espinal de rato (Salter e Hicks, 1995), na cultura neuronal de cérebro de rato (Miranov, 1994) e durante o desenvolvimento de *Xenopus* (Bogdanov e cols, 1997).

As purinas atuam como neuromoduladores, agentes mitogênicos (Rathbone e cols, 1999), em processos embrionários relacionados à proliferação (Ryu e cols., 2003), migração (Scemes e cols., 2003), diferenciação (D'Ambrosi e cols., 2000) e crescimento do axônio em neurônios (D'Ambrosi e cols., 2001). A expressão de seus receptores foi identificada durante o desenvolvimento do ouvido do rato (Brandle e cols., 1999), na diferenciação de células HL60 mielóides (Adrian e cols., 2000), na maturação de osteoblastos (Orriss e cols., 2006), células dendríticas (Berchtold e cols., 1999) e na linhagem hematopoiética e de células progenitoras CD34+ (Wang e cols, 2004).

A importância de purinas e seus receptores foi identificada nos modelos de diferenciação neuronal *in vitro* de células progenitoras neurais (*neural progenitors cells*, NPCs) embrionárias e adultas (células-tronco neurais). As NPCs no animal adulto são isoladas na região subventricular, localizadas nos ventrículos laterais; na zona subgranular do giro dentado do hipocampo e no parênquima subcortical do córtex cerebral (Gage e cols., 1995, Song e cols., 2002). Estas células são capazes de se diferenciar células do bulbo olfatório, cerebelo e retina pela indução por fatores de crescimento, de neurotransmissores, esteróides e de peptídeos vasoativos *in vivo* (Cameron e cols., 1998) como os fatores de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*, EGF), fator de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factor-2*, FGF-2) e o fator inibitório da leucemia (*leukemia inhibitory factor*, LIF). As células cultivadas na presença de FGF em alta concentração desprendem-se e formam as neuroesferas, estruturas tridimensionais com expressão proteínas neurais β -tubulina-3, proteína associada ao microtúbulo (*microtubule-associated protein*, MAP-2) e sinaptofisina (Svendsen e cols., 1998).

Os receptores purinérgicos poderiam mediar o processo de diferenciação nas NPCs. Hogg e cols. (2004) sugeriram que nas células NPC originárias do hipocampo adulto de rato, a variação da concentração de cálcio intracelular livre que ativaria o

processo de diferenciação neuronal seria medeada pela atividade dos receptores P2 P2X₃ e P2X₇ e resultam em neurônios com sinapses funcionais a glicina, GABA, glutamato e ATP.

Nas NPC provenientes da zona subventricular murino, a inibição do receptor P2 P2Y₁ pelo MRS2179 resultou na menor proliferação celular nas neuroesferas formadas pela redução da oscilação transiente de cálcio intracelular. Fato semelhante foi verificado em neuroesferas de animais com deleção para o gene P2Y₁ (*knock-out*). Acredita-se que sinalização medeada de ATP pelos seus receptores seja do tipo autócrina ou parácrina (Mishra e cols., 2006; Lin e cols., 2007). Foi identificado também a atividade de receptores do tipo P1, a adição do agonista adenosina levou ao aumento do efeito proliferativo, contudo numa alta concentração resultou em apoptose celular (Mishra e cols., 2006).

Outros membros da via de purinas foram identificadas deste modelo de diferenciação como de enzimas relacionadas à hidrólise de ATP ou de UTP a dinucleotídeos ou ainda a mononucleotídeos. A presença destas enzimas modula a concentração e disponibilidade dos diferentes agonistas purinérgicos ATP/UTP, ADP/UDP, AMP, adenosina que atuam nos diversos receptores purinérgicos de modo seletivo (Fig.3). Pelo padrão de agonistas purinérgicos presentes em cultura de neuroesferas, identificou-se a ação da enzima fosfatase alcalina tecido não específica (*tissue-nonspecific alkaline phosphatase*, TNAP), membro da família de fosfatase alcalina. Esta enzima possui atividade de hidrólise de nucleotídeos trifosfato a di e a monofosfato e foi previamente identificada em células-tronco embriônicas e atualmente é utilizada como marcador de indiferenciação celular (Mishra e cols., 2006). Foi identificada também a enzima ecto-nucleosidase trifosfato defosfohidrolase (*ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*, NTPDase) que resulta na maior disponibilidade de ADP e UDP que são agonistas do receptor P2Y₁ (Mishra e cols., 2006; Braun e cols., 2003). *In vivo*, esta enzima é utilizada como marcador do desenvolvimento hipocampal de rato a partir do dia 17.

Acredita-se que o padrão da expressão de receptores do tipo P2 esteja variando conforme a progressão da diferenciação neuronal das células NPCs e a expressão de enzimas ecto-nucleases em fases distintas da diferenciação a fim de disponibilizar

outros agonistas purinérgicos os quais ativam seletivamente os receptores (Fig.3) (Shukla e cols., 2005).

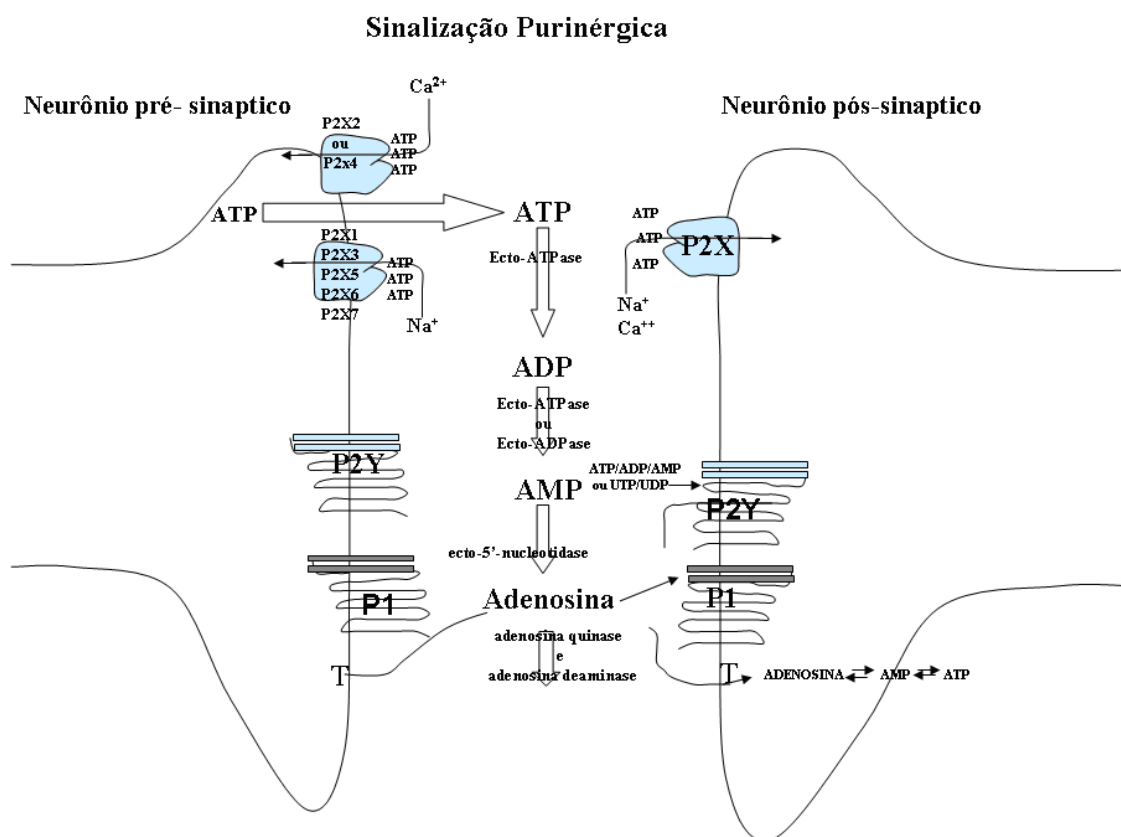


Figura.3. Esquema de sinalização purinérgica presente na fenda sináptica. ATP é liberado pelo neurônio pré-sináptico e ativa os receptores purinérgicos do tipo metabotrópico (P2Y) e ionotrópico (P2X) na pré e pós sinapses ou pode sofrer ação de ectonucleases e ser degradado a ADP/UDP, AMP ou adenosina, produtos que ativam outros subtipos de receptores P2Y e receptores P1 (ver ítem 1.3).

1.2 Modelos *in vitro* de diferenciação neuronal

Em adição a utilização das NPCs do hipocampo, da zona subventricular ou do córtex as quais possuem capacidade limitada de diferenciação a neurônios e glias

(denominadas de células-tronco neurais -multipotentes), as células-tronco embriônicas (ES) de camundongo são outro modelo promissor pela capacidade de originar células dos três folhetos embrionários após a indução. Estas células são derivadas da massa celular interna da blástula pré-implantada (Evans e Kaufman, 1981, McWhir e cols, 1996) e retêm habilidade de se diferenciarem em todos os tipos celulares, incluindo células germinativas. Têm capacidade ilimitada de replicação e baixa quantidade de metilação do DNA genômico.

A partir destas células ES, duas linhagens celulares foram estabelecidas; as embriônicas germinativas (EG) originárias da pós fecundação (Stewart e cols., 1994) e carcinoma embrionário (EC) derivada de embriões pós-implantados irradiados (Martin, 1980). Ambas as células possuem característica semelhantes às células-tronco embrionárias e sua diferenciação em neurônios e células musculares.

As células ES e EC proliferam-se rapidamente. São cultivadas em suspensão de 2 a 8 dias e neste período agregam-se de modo irregular formando estruturas tridimensionais denominadas os corpos embriônicos ou corpos embrióides (CE). Estas estruturas são semelhantes aos de primórdios embriônicos, sendo subdividida em endoderma interior, mesoderma e ectoderma exterior envolto pelo saco vitelínico (Itskovitz-Eldor e cols., 2000). Nos corpos embriônicos há variações espontâneas da concentração de cálcio intracelular livre (Sauer e cols., 1998). Após a indução por fatores externos como dimetil sulfoxido (DMSO), dibutilil AMP cíclico ou ácido retinóico (AR) nos CE pode-se direcionar a diferenciação ao tipo celular desejado (Rathjen, 1998). A formação de CE promove maior eficiência na diferenciação pela maior interação célula-célula. Contudo, os CE muito grandes podem sofrer de necrose no centro pela limitação no transporte de nutrientes e oxigênio (Gerecht-Nri e cols, 2004).

A indução a formação de CE é dependente do estágio de diferenciação da célula. A utilização de células em estágio avançado de diferenciação para formação de CE resulta em efeitos contrários a proliferação e na diferenciação (Dang e Zandstra, 2005). As células provenientes de CE, estão agora no estágio de progenitores e são utilizadas como modelo de estudo *in vitro* do processo de diferenciação hematopoiética, de cardiomiócitos e neuronal. Durante o término da diferenciação neuronal, monitora-se a

expressão de proteínas específicas do neurofilamento e de dendritos como microtúbulo-associado-proteína 2 (MAP2), Tau, neurocan, *enolase específica de neurônio (neuron-specific enolase, NSE)*, proteína ácida fibrilar da glia (*glial fibrillary acid protein, GFAP*), β -3 tubulina e receptores de neurotransmissores (O'Shea, 1999).

1.2.1 Células carcinoma embrionárias P19

Diversas linhagens de células de EC murino são utilizadas como modelo de diferenciação neural *in vitro* tais como F9, PCC7-Mz1, BLC6, PC13, PCC3 e P19. A diferenciação neuronal das células P19 é bem caracterizadas quando a expressão de marcadores e obtenção de neurônios funcionais semelhante ao que ocorre no neuroectoderma embrionário e do epitélio neural (Staines e cols., 1994, Bain e cols., 1994) (Fig.3). Estas células possuem 40 cromossomos e semelhantes as células-tronco embrionárias murinas; as células originam após a adição de dimetil sulfóxido(DMSO) em células do mesoderma e endoderma como cardiomiócitos e células musculares esqueléticas ou com ácido retinóico, as células diferenciam-se em neurônios e astroglias funcionais com expressão de receptores EGF durante o processo (Edwards e cols, 1983; Edwards e McBurney, 1983, McBurney e cols, 1982, Jones-Villeneuve e cols., 1982, McBurney, 1993, Jones-Villeneuve e cols, 1982; Jones-Villeneuve e cols, 1983, Joh e cols, 1992).

Diversos fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação no tubo neural *in vivo* foram identificados nas células P19 como bHLH, Mash-1 e Ngn-1 (Tang e cols., 2002). As células P19 neuronais formam sinapses de acetilcolina, GABA, L-glutamato, somatostatina e neuropeptídeo Y, semelhantes ao córtex cerebral (Lin e cols, 1996; MacPherson e cols, 1997; Parnas e Linial, 1997; McBurney e cols., 1988, Staines e cols., 1996). Os marcadores de astrócitos nesta cultura somente são identificados após 10 dias (Edwards e cols, 1983, Edwards e McBurney, 1993).

Diversos receptores e seus ligantes são expressos ao longo do processo em fases específicas da diferenciação e participam da progressão do processo, o neuropeptídeo fator de crescimento encefálico (*head activator, HA*) quando liberado, regula o ciclo celular da passagem do estágio do ciclo celular G2 a M promovendo variação da

concentração de cálcio intracelular livre (Niemann e Schaller, 1996); o nosso grupo demonstrou que o influxo de cálcio mediado pelos receptores nicotínicos influi na diferenciação das células P19 em neurônios (Resende e cols., 2006a) e que há expressão do receptor P2 purinérgico P2X₆ na fase tardia do processo (Da Silva e cols., 2007) semelhante em carcinoma embrionário humano NTERA-2 (Moore e cols, 2002).

Diversos canais iônicos voltagem-dependente, receptores de neurotransmissão ionotrópicos e metabotrópicos são expressos durante a diferenciação neuronal das células P19 e estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Expressão de receptores de neurotransmissores e canais iônicos voltagem-dependente na diferenciação neural e neuronal das células P19. A presença (+) ou ausência (-) da proteína do receptor ou atividade do receptor ou do canal iônico voltagem-dependente foi averiguada pela expressão gênica ou atividade. A tabela apresentada é modificada de Ulrich e Majumder, 2006.

RECEPTORES IONOTRÓPICOS	CÉLULAS DE CARCINOMA EMBRIONÁRIO P19	NEURÔNIOS P19	REFERÊNCIAS
NMDA AMPA/kainato	R2A/2B GluR5/6/7	R1/R2A/2B GluR2/3/4/5/6/7	Morley e cols., (1995) MacPherson e cols., (1997) Turetsky e cols., (1993) Canzoniero e cols., (1996) Lee e cols., (2003b) Ray e Gottlieb (1993) Cauley e cols., (1996) Resende e cols., (2007a)
Nicotínicos	+	-	Reynolds e cols., (1994, 1996)
GABA	-	GABA _A	Heck e cols., (1997a)
Glicina	-	α1, α2	Da Silva e cols., (2007)
Purinérgico	-	P2X ₆ e sugere-se a presença de outros	
RECEPTORES METABOTRÓPICOS			
Glutamato	mGlu 2/4	mGlu1/2/3/4/5/6/7/8	Heck e cols., (1997b)
Muscarínicos	m3	M1,m2,m3,m5	Parnas e cols., (1998)
Cinina	B2 de cinina não funcional	B2 de cinina	Martins e cols., (2005)
Endotelina	-	ET-B	Monge e cols., (1995)
Opióide	K, δ	K, δ, μ	Chen e cols., (1999)
Fator de crescimento encefálico (Head activator)	-	+	Niemann e Schaller (1996)
CANAIS VOLTAGEM DEPENDENTES E RECEPTORES MECANO-SENSÍVEIS			
Cálcio	-	+	Sugere-se sua presença para ativação do processo de diferenciação
Potássio	-	+	Cheun e Yeh (1991)
Sódio	-	+	Cheun e Yeh (1991)
Cátion mecano-sensível	-	+	Tarnok e Ulrich (2001)

1.2.2 Células de feocromocitoma de rato PC12

As células feocromocitoma de rato (PC12) foram estabelecidas em 1976 (Greene e Tishler, 1976) e são utilizadas amplamente utilizadas como modelo de diferenciação neuronal. É uma linhagem celular diplóide com 40 cromossomos e homogênea que quando tratadas com fator de crescimento de nervo (*nerve growth factor*, NGF), cessa a divisão celular e apresenta morfologia semelhante à de neurônios simpáticos em cultura primária. As células neuronais simpáticas e cromafins adrenais estocam e secretam adrenalina são derivadas da célula progenitora primitiva originária da crista neural semelhante às células PC12 (Weston, 1970, Burnstock e Costa, 1973).

In vivo identificou-se que o NGF participa da diferenciação das células que migram da crista neural (Bjerre e Bjorklund, 1973). As células PC12 são semelhante a células progenitoras neuronais simpático (Fig.4) mas após a adição de NGF, células tornam-se mais sensíveis à acetilcolina com sinapses funcionais, sintetiza, estoca e libera acetilcolina, catecolaminas, dopamina e noradrenalina em níveis semelhantes a de células de glândula adrenal de rato.

Durante a diferenciação das células PC12 induzido pelo NGF (fator de crescimento de nervo, *nerve growth factor*) ou FGF (fator de crescimento de fibroblasto, *fibroblast growth factor*), a célula expressa um repertório de receptores purinérgicos a cada estágio que inclui os receptores P2X₂ e P2X₄ (Arslan e cols, 2000; Hur e cols, 2001; Fujita e cols, 2000). O receptor P2X₄ é ativo no estágio indiferenciado, contudo após o tratamento de 7 dias com NGF, os receptores purinérgicos ativos e expressos são mais sensíveis a PPADS (piridoxal fosfato 6-azofenil-2', 4'-ácido dissulfônico *Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate*) (Arslan e cols., 2000). A inibição dos receptores purinérgicos resultou em menor desenvolvimento do axônio (D'Ambrosi e cols, 2001) e acredita-se que haja um efeito citoprotetor mediado pelo receptor P2X₂ (Fujita e cols 2000).

ATP leva a despolarização da membrana nas células PC12 (Inoue e cols., 1989; Soltoff e cols., 1998) e resulta no aumento na concentração de cálcio intracelular livre (Sela e cols.,1991; Michel e cols., 1996) e de trifosfato inositol (InsP₃) (Barry e Cheek, 1994) levando a liberação de catecolaminas (Inoue e cols., 1989; Sela e cols., 1994). O

efeito de ATP é medeado pelos receptores P2Y pela ativação de MAP kinases. Swanson e cols. (1998) demonstraram a participação do receptor P2X₂ no processo.

1.2.3 Células NH15-CA2

Dentre as células com propriedades de diferenciação neuronal, NH15-CA2 é o resultado da fusão da linhagem neuroblastoma de camundongo N115-BU-8 e de 108CC5 híbrida originada também da fusão de neuroblastoma N18GT-2 de camundongo e do glioma C6-BU-1 de rato (Heumann e cols., 1977). Seu estabelecimento foi anterior as células-tronco embrionárias e carcinoma embrionárias e foi muito utilizada como modelo de diferenciação neuronal. Possui 250 cromossomos (Heumann e cols., 1977). Pelas suas características neuronais (Daniels e Hamprecht, 1974) foi utilizada como modelo para avaliação da atividade opiácea, de acetilcolina, de noradrenalina, de prostaglandina E1, de adenosina e de neuropeptídeos como HA (Hamprecht, 1976; Ulrich e cols., 1996). As células NH15-CA2 expressam marcadores neuronais como a enzima colina acetiltransferase (CAT; EC. 2.3.1.6) que envolvida na síntese de acetilcolina a partir de acetyl-CoA e colina (Hamprecht e Amano, 1973). Após tratamento com dibutilil AMP cíclico (Daniels e Hamprecht, 1974), estas células diferenciam-se em neurônios funcionais (Reiser e cols., 1977).

Células-tronco com capacidade de diferenciação neural

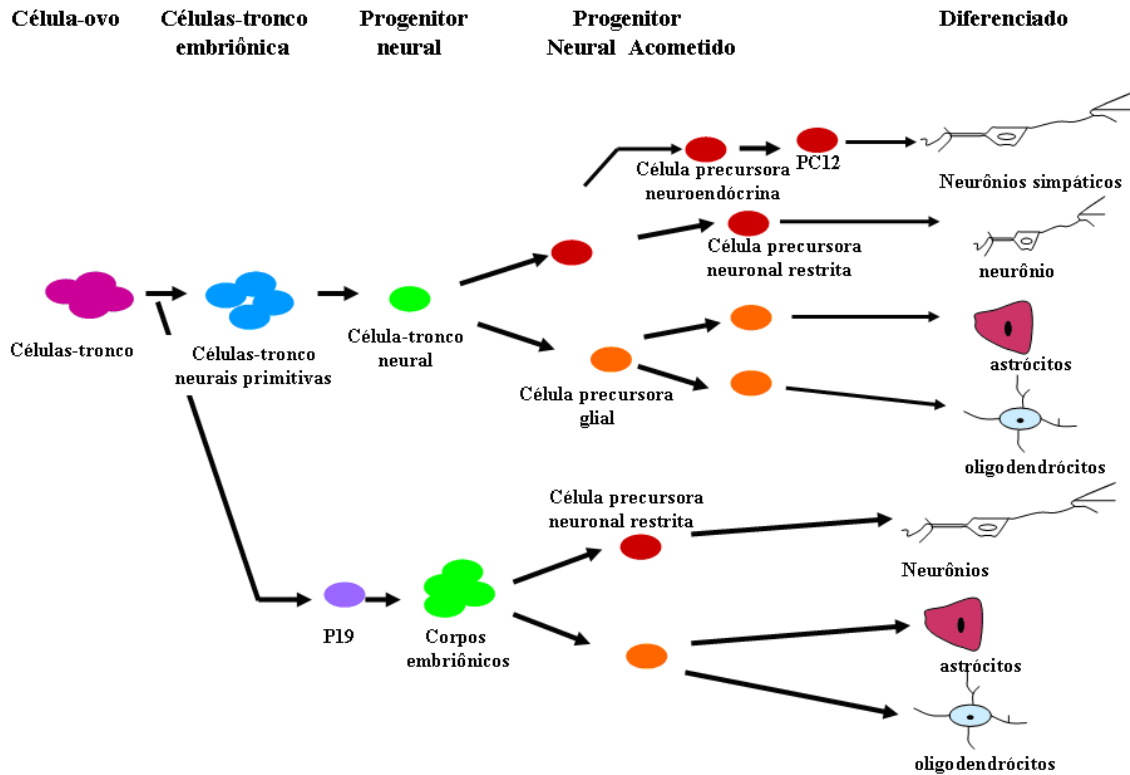


Figura.4. Processo de diferenciação neural. Modificação fenotípica durante o processo desde a célula-ovo (totipotente), tronco-embriônicas e das células murinas teratocarcinoma P19 (pluripotente) a neurônios e glia funcionais. A célula competente ativa um novo repertório gênico de expressão após sinalização de fatores solúveis e inicia o processo de diferenciação neuronal. As células-tronco embrionárias e P19 (pluripotentes) são induzidas pelo ácido retinóico em suspensão (corpos embrionários) ao acometimento ao progenitor neural (multipotente). Neste estágio, há contínua alteração no padrão de expressão gênica até a diferenciação em neurônios e glia funcionais.

1.3 Receptores purinérgicos

Karl Lohman, Cyrus Hartwell Fiske e Yellagaprada SubbaRow descobriram a adenosina 5'-trifosfato, o ATP em 1929 (Lohman, 1929, Fiske e SubbaRow, 1929). No mesmo ano, Drury e Szent-Gyorgyi identificaram a ação de purinas na ativação negative cronotrópico no coração, mediando a dilatação dos vasos coronários e inibindo a musculature lisa intestinal (1929). Em 1950 Pamela Holton verificou a liberação de ATP da região terminal de neurônios sensoriais primários (Holton, 1959).

No sistema nervoso adulto central, foi identificado que os receptores purinérgicos medeiam a liberação de neurotransmissores da célula pré-sináptica (Ginsborg e Hirst, 1972) e regula a resposta de receptores de neurotransmissão presentes na célula pós-sináptica através da co-transmissão sugerida inicialmente por Burnstock em neurônios de gânglios celíacos (Burnstock, 1976). Em 1992, os grupos de Surprenant e Vanner identificaram a co-transmissão purinérgica em sinapses entre neurônios do gânglio coelíaco (Evans e cols., 1992; Silinsky e cols., 1992). Foi identificado a co-transmissão ocorre entre ATP e os neurotransmissores e neuropeptídeos; acetilcolina, noradrenalina, 5-hidroxitriptamina (serotonina), dopamina, GABA e glutamato e vasopressina e ocitocina (Nieber e cols, 1997; Jo e Schlichter, 1999; Rubio e Soto, 2001; Sun e Stanley, 1996; Deuchars e cols, 2001; Burnstock, 2001). Em algumas regiões, a atividade sinérgica de glutamato e ATP estão envolvidas com a potenciação de longa duração em neurônios da região hipocampal CA1, região associada a aprendizado e memória (Pankratov e cols., 2002).

Os receptores purinérgicos foram inicialmente divididos por estudos farmacológicos em receptores de adenosina, que são acoplados a proteína G (P1) e de ATP e ADP (P2) (Burnstock, 1978). Através de estudos de transdução de sinal e pela clonagem dos receptores P2, os receptores P2 foram novamente classificados em P2Y₁₋₁₄, acoplados a proteína G e P2X₁₋₇, ionotrópicos (Burnstock e Kennedy, 1985, Abbracchio e Burnstock, 1994). Alguns dos receptores purinérgicos do tipo metabotrópico P2 são ativados também por UTP e UDP. Contudo, a ativação pelo ATP ou UTP desencadeia na maioria dos receptores P2 aumento de cálcio no interior da célula (Edwards e Gibb, 1993).

In vivo a participação dos receptores do tipo P1 e P2 são reguladas juntamente com a atividade de ectonucleases no sistema nervoso central (Kato e cols., 2004) semelhante a regulação descrita nas células NPC (item 1.1). ATP possui atividade dual, isto é, coordena a atividade sináptica dos receptores metabotrópicos e ionotrópicos associado a atividade de ectonucleases na pré e pós sinapse (Kato e cols., 2004; Shukla e cols., 2005, Mishra e cols., 2006) (Fig.4).

Oito receptores metabotrópicos identificados em mamíferos e são acoplados à fosfolipase. Os mais estudados são P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆. O receptor P2Y₁ é ativado por ATP e ADP. Já os receptores P2Y₂ e P2Y₄ pelo UTP e ATP e o receptor P2Y₆ somente pelo UDP. Já os receptores ionotrópicos quando ativados são permeáveis ao sódio (cátion monovalente) ou ao cálcio (cátion bivalente). Contudo, há subtipos de receptores purinérgicos P2X com 100 vezes maior permeabilidade ao cálcio que ao sódio, como o P2X₂ (Egan e Khakh, 2004). Sete subunidades destes receptores foram clonadas (P2X₁₋₇) e apresentam de 30 a 50 % de identidade em seqüência protéica (Lynch e cols, 1999). As subunidades P2X possuem estrutura semelhante, as regiões N- e C-terminal são intracelulares, com dois domínios transmembrânicos e uma porção extracelular que contém 10 cisteínas conservadas que formam 5 pontes de dissulfeto. A maior variação entre as subunidades ocorre na região C-terminal que varia na subunidade P2X₆ de 30 a 240 aminoácidos na subunidade P2X₇ (Buell e cols, 1996; MacKenzie e cols, 1999). Os subtipos de receptores P2X funcionais são constituídos de pelo menos 3 subunidades resultando na formação de subtipos de receptores homoméricos (homomultímeros) ou heteroméricos (heteromultímeros) (Nicke e cols, 1998; Stoop e cols, 1999; Kim e cols, 1997; Ding e Sachs, 2000). Os subtipos de receptores heteroméricos identificados foram P2X₁/P2X₅, P2X₂/P2X₃ e P2X₄/P2X₆ (North e Suprenant, 2000), contudo ainda há ocorrência de associação alternativa de RNA mensageiro (variantes de *splicing*) nas subunidades P2X₂, P2X₄ e P2X₅. Estes variantes de *splicing* alternativo resultam em subtipos de receptores com propriedades farmacológicas modificadas (Brandle e cols, 1997; Dhulipala e cols, 1998; Housley e cols, 1995; Le e cols, 1997; Simon e cols, 1996).

Os subtipos de receptores P2X possuem distinta afinidade ao ATP, a cinética de abertura e fechamento do canal, quanto seletividade iônica e quanto a regulação e

acoplamento específico entre vias de sinalização (Stojilkovic e cols., 2005). Entretanto não há drogas disponíveis capazes de atuarem de modo seletivo em um subtipo de receptor P2X sem afetar outro receptor P2 ou ainda somente com atividade aos subtipos purinérgicos P2. Inclusive, alguns inibidores purinérgicos atuam em outras proteínas de membrana e a outros receptores metabotrópicos como no caso da suramina (Harris e cols., 1996).

Ainda assim, identificou-se o envolvimento da expressão de receptores purinérgicos na neuroproteção e diferenciação. Através de experimentos de privação de oxigênio e nutrientes em fatias cerebrais do hipocampo, identificaram-se aumento da expressão dos receptores P2X₂ e P2X₄ os quais resultaram na perda neuronal na região do hipocampo, cortical e estriatal (Cavaliere e cols., 2003; Ashour e Deuchars, 2004). Já no desenvolvimento do hipocampo, o estímulo dos receptores P2 resultou em crescimento de axônios (Heine e cols., 2006). Identificou-se a participação do receptor P2X₅ na diferenciação de células progenitoras a musculares esqueléticas humana pela ativação da via de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*, MAPKs) e de principalmente p38. Houve ainda identificação da expressão dos subtipos de receptores P2X₆ e P2X₂ na fase tardia da diferenciação muscular (Ryten e cols, 2002). Na diferenciação neuronal de NPC foi identificada a expressão de diversos componentes da sinalização purinérgica (item 1.1) com importante participação dos receptores P2Y₁ e P2Y₂ (Mishra e cols., 2006; Lin e cols., 2007). Pela distribuição ampla dos subtipos de receptores P2X₂ e P2X₄ no sistema nervoso central adulto e pela seletividade ao influxo de cálcio, estes receptores tornam se candidatos potenciais na participação da diferenciação.

1.3.1 O receptor P2X₂

A seqüência codificante do receptor P2X₂ foi identificada na biblioteca de cDNA de células PC12 onde se isolou um clone que ativado pelo ATP conduzia corrente nos oócitos de *Xenopus* (Brake e cols., 1994). O receptor foi identificado em neurônios, no tecido sensorial, no pâncreas e na glândula pituitária (Lynch e cols, 1999). Há descritos três variantes de *splicing* alternativos funcionais da subunidade presentes

na cóclea de cobaia e cerebelo de rato (Chen e cols, 2000; Simon e cols.; 1997). A variante de *splicing* presente no cerebelo possui uma porção do segmento C-terminal deletada e o outro variante possui uma deleção na segunda região transmembrânica da subunidade. A resposta ao agonista deste subtipo de receptor composto pelos *splicings* se mantém, todavia há variação quanto à sensibilidade ao antagonista e à dessensibilização (Simon e cols., 1997). Uma das subunidades da variante de *splicing* não interage com β -III tubulina por não ter a porção de interação (Gendreau e cols., 2002).

Através de experimentos de duplo-híbrido, identificou-se que a região C-terminal P2X₂ interage *in vivo* com o precursor de β -amilóide FE65 presente nas sinapses colaterais de Shaffer no hipocampo CA1, o que não ocorre com subtipos de receptores que contêm subunidades provenientes de *splicing* alternativo. Acredita-se que tal interação possa resultar na alteração da permeabilidade do receptor à íons e na redução de *cross-talking* com outros receptores, sendo um novo processo regulatório funcional da transmissão sináptica (Masin e cols., 2005).

Através de ensaios farmacológicos com inibição do receptores com os diversos antagonistas purinérgicos, não é possível distingui-lo dos demais subtipos de receptores purinérgicos. O receptor P2X₂ é inibido pelos antagonistas purinérgicos suramina, profobol e PPDAS. (Tomioka e cols, 2000; Barajas-Lopez e cols, 1996).

A distribuição do receptor pode estar relacionada à interação com outros receptores, por exemplo, o efeito sinérgico entre o receptor P2X₂ e $\alpha_3\beta_4$, nicotínico de acetilcolina. A aplicação conjunta de ambos os agonistas resulta num menor influxo de íons quando comparado à aplicação separada de cada agonista. Sugere-se que ocorra uma via compartilhada de sinalização entre os receptores purinérgicos e nicotínicos (Khakh e cols., 2000). Há evidências que a variação de cálcio intracelular mediada pelo receptor resulta na ativação da via de sinalização de MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno ou *mitogen-activated protein kinase*) em células PC12 (Swanson e cols., 1998) (item 1.2.2)

1.3.2 Receptor P2X₄

O DNA codificante do receptor P2X₄ foi isolado do cérebro de rato e humano (Séguéla e cols, 1996; Soto e cols, 1996; Garcia-Guzman e cols, 1997) e de ilhotas pancreáticas de ratos (Wang e cols, 1996). O receptor foi identificado nos terminais dos axônios no bulbo olfatório, no septo lateral, no cerebelo, no córtex cerebral, nas células de Purkinje, no hipocampo, no hipotálamo, na substância gelatinosa do núcleo caudal e na dorsal da medula sugerindo a importância da sinalização purinérgica do receptor P2X₄ no sistema nervoso. Além disso, foi identificado no sistema vascular presente na aorta ascendente, na veia cava, veias umbilicais, artéria pulmonar, aorta e no sistema vascular epidérmico, locais onde está envolvido com influxo de cálcio mediada pelo ATP (Yamamoto e cols., 2000 a,b). Através de estudos com animal com deleção para o gene (*knock-outs*) confirmou-se o envolvimento deste subtipo de receptor purinérgico com o mecanismo de contratilidade vascular (Yamamoto e cols., 2006).

Quando presente na região pré-sináptica, o receptor modula a liberação de neurotransmissores (Soto e cols., 1996; Lê e cols, 1998; Tomioka e cols., 2000). Está presente nas especializações pré- e pós-sinápticas e acredita-se que esteja envolvido com processos de transferência de moléculas de alto peso molecular para dentro e fora do terminal neuronal (Virginio e cols, 1999). Sua concentração na superfície celular é modulada pelo equilíbrio entre receptores não ativados, ativados pelo agonista os quais são internalizados pela via da clatrina e pela inserção de novos receptores (Royle e cols., 2002).

Ligantes específicos a receptores purinérgicos como suramina, $\alpha\beta$ -metileno ATP ou PPADS têm pouco ou nenhum efeito na atividade do receptor P2X₄. De modo semelhante ao receptor P2X₂, P2X₄ possui um variante de *splicing* alternativo murino descrito e pode originar subtipos de receptores heteroméricos (Townsend-Nicholson e cols, 1999). Possui 94% de identidade protéica do receptor de rato e camundongo e de 87% com a de humana (Townsend-Nicholson e cols, 1999).

Sua atividade pode ser modulada pela proteína quinase A (PKA) através da fosforilação, após verificação de que a inibição não específica de proteínas quinase

acelera a atividade do receptor. Contudo, Brown e cols., (2004) mostraram que a defosforilação leva o receptor ao estado com maior atividade (Brown e cols., 2004, Tenneti e cols., 1998). Uma possibilidade postulada pelo grupo seria que a potenciação da sinalização purinérgica seguida da elevação de cAMP (AMP cíclico) é independente a atividade da PKA. Após investigar os eventos de aumento da concentração de cálcio intracelular livre e o posterior aumento da concentração de cAMP, identificou-se que há fosforegulação de InsP₃P (fosfatidil-inositolfosfato) nas células acinares da parótica (Bruce e cols, 2002) e que a liberação de cálcio é estimulada por qualquer agonista de InsP₃ (trifosfato de inositol) pois potenciava o mecanismo. Identificou-se que aumento na variação da concentração de cálcio ocorria pelo influxo promovido pela ativação do receptor P2X₄. Na presença de forskolina, o receptor P2X₄ teve um aumento de 5 vezes no influxo de corrente (Brown e cols., 2004). Este estudo sugere um mecanismo de regulação direta no aumento da sinalização de cálcio. O receptor P2X₄ é fosforilado pela PKA. Esta fosforilação pode modular a atividade do receptor em inúmeros modos, como por exemplo, aumentando a afinidade do receptor ao ATP, pode alterar as características de ativação (*gating*) do canal ou modular o tráfego intracelular ou quando ao subtipo de receptor formado (Brown e cols., 2004).

1.4 SELEX- *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*

1.4.1 Técnica SELEX

Bibliotecas combinatórias de moléculas naturais, artificiais, de peptídeos e de oligonucleotídeos são empregadas principalmente pela indústria farmacêutica para identificação de moléculas específicas ao alvo, em fins terapêuticos. A utilização de bibliotecas combinatórias de oligonucleotídeos dentre estas citadas, é fácil de manipular e de ser utilizada em ciclos reiterativos de seleção *in vitro* não requerendo processos de síntese química dispendiosa antes da repetição do ciclo (bibliotecas naturais ou químicas artificiais) ou passagem em bacteriófagos como em bibliotecas de peptídeos (*phage display*) (Majumder e cols., 2005). Os processos podem levar a perda da diversidade durante os ciclos de seleção nos passos de síntese ou o aparecimento de um

códon de terminação dentro do peptídeo que resultar na deleção da seqüência no caso do *phage display*.

A técnica evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*, SELEX) foi simultaneamente descrita por Tuerk e Gold (1990), Ellington e Szostak (1990) e Robertson e Joyce (1990).

Ellington e Szostack (1990) estudavam a probabilidade de uma dada seqüência randômica de polinucleotídeo ou peptídeo de adquirir uma conformação tridimensional estável, de se ligar ao alvo ou ainda de exercer atividade catalítica que no geral é muito baixa mas desconhecida. Estavam tentando estimar o número de diferentes classes estruturais capazes de se ligarem ou exercerem atividade catalítica, pois por exemplo de centenas de diferentes proteases identificadas as quais são classificadas somente em 5 classes estruturais. São questões que interessavam de serem respondidas pelos pesquisadores pois eram importantes nas teorias da origem e evolução da vida e acredita-se que as primeiras moléculas catalíticas eram provenientes de polímeros randômicos.

Já Turek e Gold (1990) tentavam compreender a interação do sítio de reconhecimento de um ácido nucléico e uma proteína que envolve uma população de moléculas e uma diversidade de sítios de ligação como ocorre na interação do complexo protéico na transcrição gênica.

Quando há apenas um sítio de ligação no genoma, como no alvo de nucleação da proteína de capsídeo do bacteriófago de RNA R17, a análise de quais os nucleotídeos necessários para a ligação podem ser endereçadas para criar e testar um número de mutantes. Contudo o número de ácidos nucléicos a serem analisados seria tão grande que inviabilizaria tal estudo. Foi utilizado o bacteriófago T4 DNA polimerase (gp43) e o ribossomo no sítio de ligação ao RNA mensageiro que codifica-o. Este sítio sobrepõe a seqüência Shine Dalgarno prevenindo o início da tradução e é autoregulado. O alvo mínimo foi de 36 nucleotídeos que inclui 5 nucleotídeos em hélice com 8 nucleotídeos em giros (*loops*). A fim de elucidar qual a responsabilidade do *loop* de nucleotídeos na interação do operador na tradução, os pesquisadores desenvolveram um método rápido para selecionar somente seqüências as quais ligavam ao alvo numa população

seqüências randômicas, que foi denominada SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).

1.4.2 Método de seleção de aptâmeros pelo SELEX

O processo de seleção mimetiza a seleção natural. Os pesquisadores Ellington e Szostak (1990) sintetizaram através de síntese química em fase sólida de fosforamídeos uma larga quantidade de moléculas de DNA com 100 posições randômicas flanqueadas com adição equimolar da mistura dos quatro nucleotídeos. Estas seqüências possuíam também regiões definidas nas porções 5' e 3' para hibridização dos iniciadores (*primers*), as quais continham sítios de enzima de restrição para posterior clonagem das seqüências identificadas e o promotor T7 RNA polimerase. Estas seqüências de 155 nucleotídeos em 100 µg correspondiam a 10^{15} seqüências diferentes.

Verificaram prontamente que a biblioteca de DNA não era transcrita eficientemente em RNA, o que levou-os a amplificar primeiramente por PCR 20 vezes a biblioteca inicial resultante da incompleta deproteção na síntese. Foi identificada 14 seqüências para comprovar sua randomicidade. Contudo a reação de PCR resulta em redução da complexidade da biblioteca pela inabilidade da Taq polimerase em amplificar regiões ricas em CG especialmente na porção 5' e devido a problemas de síntese per se. Foi realizado um ensaio de *primer extension* para avaliar a capacidade da síntese da fita complementar a simples fita de DNA e comprovou-se que somente 4 a 5 % das simples fita tiveram a integral síntese da fita complementar. Isso resultou numa redução do tamanho da biblioteca de 20 a 25 vezes. Além disso, 2/3 das seqüências amplificadas continham mutações na região constante rica em CG após o PCR o que levou a redução da diversidade de seqüências a 10^{13} seqüências. Os alvos utilizados na seleção foram diversos corantes que mimetizam cofatores metabólitos como Cibacron Blue que se liga ao sítio de ligação de diversas desidrogenases da NAD, Reactive Red 20, Reactive Yellow 86, Reactive Brown 10, Reactive green 19 e Reactive Blue 4. No primeiro ciclo de seleção, apenas 1% da biblioteca de RNA foi recuperada contudo no segundo ciclo, recuperou-se 70% das moléculas de RNA. As seqüências identificadas após a seleção receberam o nome de aptâmero, do latim *aptus* que significa ligar.

Tuerk e Gold (1990) partiram de uma população randômica de 65536 seqüências e identificaram uma região de 8 nucleotídeos que interagem com a T4 DNA polimerase e duas seqüências, uma idêntica presente no bacteriófago e a outra variante desta seqüência em 4 posições. A utilização de oligonucleotídeos como ligantes ou inibidores de proteínas baseia-se na propriedade de reconhecimento específico de epítomos protéicos pelas moléculas de RNA ou DNA, semelhante à interação RNA-proteína e DNA-proteína existente na célula. Tais ligações ocorrem pela interação de cargas entre o aptâmero e o alvo de seleção. As ligações ocorrem pela formação de pontes de hidrogênio entre os aminoácidos do alvo e a cadeia do aptâmero ou ligação de van der Waals entre as cadeias de açúcar e grupamentos fosfato (Gold., 1999).

Uma nova contribuição foi dada em 1990 por Robertson e Joyce quanto a identificação de RNAs com atividade catalítica pela seleção *in vitro* sendo denominados aptazimas (Hesselberth e cols., 2003). Em 1998, Ulrich e cols. selecionaram aptâmeros capazes de inibir a atividade do receptor ionotrópico nicotínico, atuando como antagonistas. Demonstrou-se que além da alta capacidade de reconhecimento e de afinidade, o aptâmero pode modular funções protéicas de conformações do canal do receptor, isto é, atuar como antagonista ou de proteger o sítio específico de ligação, modulando, portanto o estado conformacional protéico, a atividade do receptor. A utilização de aptâmeros com tais características contribuíram na compreensão da cinética de funcionamento de uma diversidade de receptores ionotrópicos como de nicotínicos e de GABAA (Hess e cols., 2000, Krivoshein e Hess, 2004; Cui e cols., 2004a; Cui e cols., 2004b).

Após ciclos reiterativos de enriquecimento, associados ao aumento de stringência com emprego inicial da biblioteca combinatória constituída de 10^{13} a 10^{15} moléculas de oligonucleotídeos de RNA ou DNA, há seleção do aptâmero com estrutura adequada e capacidade de interação à molécula alvo. A amplificação da biblioteca de cDNA é realizada através de PCR e obtenção da biblioteca de RNA, por transcrição *in vitro* utilizando a enzima T7 RNA polimerase. Durante os ciclos de seleção *in vitro* de aptâmeros com alta afinidade, recupera-se o RNA ligado ao receptor no sítio específico do alvo. Este é purificado e utilizado como molde nas reações de RT-PCR.

Para utilização do aptâmero como produto intracelular com expressão no interior da célula, utiliza-se bibliotecas de RNA não modificados que resulta na seleção de intrâmeros. Caso o alvo da seleção seja a extracelular e o aptâmero possa ser um candidato à droga em potencial, utiliza-se a biblioteca com RNA-resistente a nucleases que consiste na utilização de ribonucleotídeos de pirimidinas modificadas que aumentam a estabilidade do RNA em meios fisiológicos. Se for necessário identificar aptâmeros que serão acoplados a coluna de cromatografia de afinidade para purificar a proteína, por exemplo, utiliza-se a biblioteca de aptâmeros de DNA que pode ser reutilizado após lavagens alcalinas (Gold, 1999).

A fim de aumentar a estabilidade das moléculas selecionadas têm se realizado seleções utilizando enantiômeros, conhecidos como spiegelmers, que não são reconhecidos pelas nucleases (Klussmann e cols., 1996). Entretanto, a utilização de tais ribonucleotídeos tem encarecido o processo de seleção, pois se requer modificações nos 4 ribonucleotídeos para síntese de aptâmeros. O emprego de ribonucleotídeos de pirimidina modificados no anel da ribose na posição 2'OH por 2'F ou 2'NH₂ resulta em moléculas com maior estabilidade e menor custo. A meia-vida da molécula de RNA passa de 8 segundos a 86 horas com modificação 2'F e a 174 horas com modificação 2'NH₂ (Pagratis e cols., 1997). Contudo as moléculas de RNA selecionadas modificadas com 2'F têm maior rigidez em sua estrutura e afinidade ao alvo comparado a aptâmeros com 2'NH₂ (Pagratis e cols., 1997). O intuito é adicionar nucleotídeos modificados tanto no processo de seleção de DNA ou de RNA que possam ser incorporadas pelas enzimas Taq polimerase, T7 RNA polimerase e enzimas de transcriptase reversa, que resultam em aptâmeros mais estáveis a fluídos biológicos além de não interferirem no pareamento de Watson-Crick. Todas estas modificações são necessárias a fim de sintetizar-se o aptâmero em escala industrial para aplicação terapêutica. Outras modificações têm sido introduzidas para aumentar o tempo de meia-vida e de distribuição dos aptâmeros em sistemas fisiológicos como a adição de um grupamento lipídico inserido no aptâmero para ancoragem em lipossomos (Willis e cols., 1998).

1.4.3 SELEX e as técnicas de modulação gênica e protéica

Diversas técnicas são utilizadas para modular a expressão gênica como oligonucleotídeos que formam tríplexes (*Triplex-Forming Oligonucleotide*, TFO) (Le Doan e cols., 1987), RNA antisense (Paternson e cols., 1977) e RNA de interferência (*interference RNA*, RNAi) (Fire cols., 1998). Em receptores purinérgicos, a metodologia antisense foi empregada nos receptores P2X₃ e P2X₄ (Dorn e cols., 2001; Yamamoto e cols., 2000a,b) e RNA de interferência no receptor P2X₃ (Hemmings-Mieszczak e cols., 2003), mas apenas a combinação das duas estratégias resultaram em subregulação (*down regulation*) efetiva do receptor P2X₃ (Fig.5).

Para inibir a atividade específica de receptores heteromultímeros ou homomultímeros como de receptores purinérgicos do tipo P2X, SELEX possivelmente é o melhor método. Ao contrário de TFO, RNAi ou da técnica antisense, os quais resultam no *knock down* gênico de uma subunidade, os aptâmeros selecionados por SELEX contra um determinado receptor composto de três subunidades atuará somente no receptor. Aptâmeros provenientes de SELEX não interferirão na expressão e atividade de subunidades, e não alterarão a expressão de outros receptores provenientes de combinações do subtipo alvo com outros subtipos para a formação do receptor heteromultímeros como por exemplo, o aptâmero selecionado ao receptor P2X₄ não afetará na expressão ou atividade do receptor P2X₄/P2X₆ o que ocorre nas outras técnicas de modulação gênica (Fig.5) (Le e cols., 1998). Aptâmeros com atividade inibitória podem ser empregados em *knock-down* da atividade da proteína.

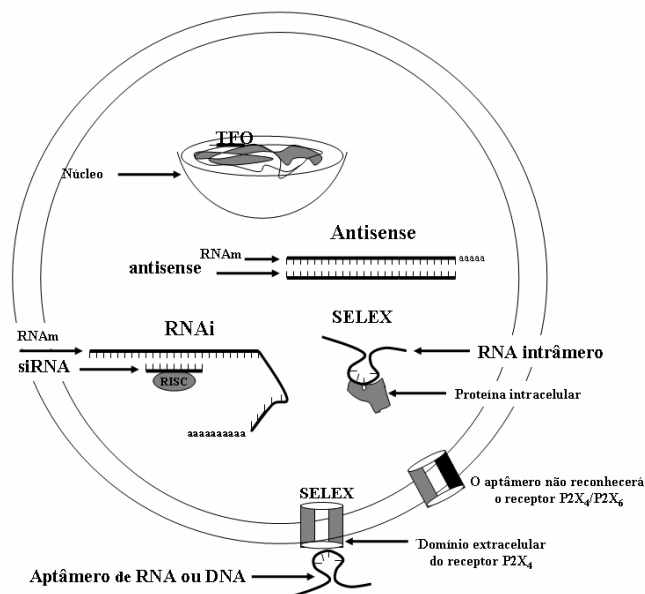


Figura.5. Esquema de atuação das moléculas provenientes das técnicas de modulação gênica: *triplex-forming oligonucleotide* (TFO), RNA antisense e RNA de interferência (RNAi) e atividade protéica por SELEX. A utilização das técnicas TFO, antisense e RNA de interferência modulam em nível transcripcional reduzindo a expressão de RNA mensageiro do alvo. A técnica SELEX modula a atividade protéica do alvo no interior da célula (intrâmero) ou exterior (aptâmero) não interferindo na atividade e formação de heretomultímeros.

1.4.4 Propriedades dos aptâmeros

Os aptâmeros são pouco imunogênicos. Ao contrário da produção de anticorpos monoclonais, a produção em larga escala do aptâmero é menos dispendiosa e sua área de atuação é versátil, isto é, o aptâmero pode discernir domínios extracelulares ou intracelulares, alcançar epítomos pequenos e protegidos de vírus, os quais não podem ser distinguidos por anticorpos (Gopinath e cols., 2006) como pode ser utilizado em terapias celulares de DNA através da inserção em plasmídeos.

Os aptâmeros identificados da seleção de SELEX possuem afinidade e especificidade de ligação aos seus alvos de forma semelhante ao anticorpo monoclonal

com constantes de dissociação da ordem de nanomolar a picomolar (Jayasena, 1999); de discernir aminoácidos e oligonucleotídeos como ATP e dATP (Sassanfar e Szostak, 1993), inclusive estereoisômeros e proteínas com conformações diferentes resultantes de variantes de *splicing* alternativo como de proteína quinase C (PKC) (Conrad e cols., 1994), estados conformacionais de uma mesma proteína (Hess e cols., 2000), diferenciar entre vasculatura tumoral e normal (Blank e cols., 2001) ou de diferenciar células em dois estágios distintos de diferenciação no caso de células PC12 (Wang e cols., 2003). O aptâmero selecionado pode ser empregado como ferramenta diagnóstica em técnicas de citometria de fluxo, arranjos (*arrays*), imunofluorescência, testes fluorescentes e testes em placas de Elisa (Majumder e cols., 2005; Ulrich e cols., 2006). O aptâmero pode ser expressos intracelularmente sendo denominado intrâmero e interagir em proteínas envolvidas com regulação de vias intracelulares de transdução de sinal (Famulok e cols., 2001) ou ainda atuar como sensores, aptasensores (Minunni e cols., 2004).

1.4.5 Utilização como fármacos

Tal a especificidade e afinidade de ligação dos aptâmeros selecionados, este pode ser utilizado como agente terapêutico contra moléculas de imunoglobulina E (IgE), interferon gama (γ IFN), α -trombina, PTPase (proteína tirosina fosfatase) demonstrando grande eficácia em testes em cultura de células e em animais (Lee e cols., 2006). Em 2004 a empresa Pfizer-Eyetech Pharmaceuticals iniciou a comercialização do primeiro aptâmero para o tratamento de coroidal neovascularização (AMD) e melhora da acuidade visual (Ng e cols., 2006) conhecido como Macugen. O aptâmero desenvolvido reconhece a isoforma específica VEGF₁₆₅ (*vascular endothelial growth factor*). Outros aptâmeros que estão em fase I selecionados pela companhia Gilead são promissores em terapias de coagulação, como o aptâmeros análogo de heparina (Bock e cols., 1992). Contudo, já há aptâmeros de segunda geração com o mesmo efeito do análogo e que demandam menor concentração para obtenção do mesmo efeito. O grupo do pesquisador Sullenger desenvolveu aptâmeros contra o fator de coagulação IXa que conjugados com a cadeia de colesterol aumentam o tempo de vida do aptâmero de 5-10

minutos a 1-1,5 horas (Rusconi cols., 2002) e este aptâmero há inclusive um antídoto para inativar o efeito (Rusconi e cols., 2004).

Os intrâmeros são utilizados como mecanismos de inativação de proteínas relacionadas ao desenvolvimento, de sinalizações intracelulares ou mesmo com fins terapêuticos para inibir a replicação de viral. Por exemplo, no desenvolvimento a expressão intracelular de aptâmeros pode ser regulada através do promotor utilizado que controla sua expressão em quantidade e temporal. O promotor pode ser do tipo indutível neste caso. Intrâmeros contra kanamicina e tobramicina foram posicionados na porção 5' não transcrita de genes. Na adição de drogas, inibiu-se a expressão gênica (Werstuck e Green, 1998).

O intrâmero permite compreender o papel de proteínas envolvidas em vias intracelulares de transdução de sinal. A proteína B52 é expressa em drosófila durante o desenvolvimento envolvido em processos de *splicing* gênico, entretanto sua importância não estava definida. O intrâmero desenvolvido foi expresso na forma pentamérica durante o desenvolvimento e a inibição de B52 resultou na drástica redução de sobrevivência. (Shi e cols., 1997). A utilização do intrâmero a proteína *rev* envolvida com ciclo de replicação do HIV resultou na inibição da replicação do vírus em cultura de células (Good e cols., 1997). Em células humanas de linfócito, houve drástica atividade anti-viral na presença dos intrâmeros (Chaloin e cols., 2002). Há intrâmeros capazes de inibir ligações na porção intracelular do domínio humano na beta 2 integrina linfócito função-antígeno associada-1 ($\alpha\beta 2$ integrin adhesion molecule, LFA) que bloqueia a ativação de vias intracelulares. Tais aptâmeros foram expressos em leucócitos para sistema de desenvolvimento de vacinas (Blind e cols., 1999).

Aptâmeros podem ser utilizados para investigar vias de transdução de sinal. Theis e colegas (2004) identificaram intrâmeros que ligam e inibem o trocador nucleotídeo guanina fator citoesina-2, mas não seu homólogo que funcionalmente é uma proteína diferente, a citoesina-1. Após seis horas de transfecção em células HeLa ainda identificou-se aptâmeros transfectados presentes nas células (Theis e cols., 2004, Lee e cols., 2006).

Para estes estudos, os alvos também podem ser o ligante ou o receptor de membrana. O aptâmero contra o VEGF inibe a interação deste com o seu receptor na

superfície celular (Jellinek e cols., 1994). Aptâmeros contra o receptor de tirosina quinase RET foram selecionados após ciclos de enriquecimento e retirados de ligantes não específicos pela utilização de células que expressavam o receptor mutado; identificaram-se dois aptâmeros com representatividade de mais de 50% nas 67 sequências identificadas. Através de testes de atividade biológica em células normais as quais ocorria a ativação de RET e iniciava a sinalização para a fosforilação de ERK(*extracellular signal regulated kinase*), os aptâmeros identificados não ativaram tal sinalização intracelular. Contudo, o aptâmero identificado reconhece apenas o receptor a membrana e não RET purificado e é um potencial candidato a ser utilizado em testes pré-clínicos (Cerchia e cols., 2005).

Aptâmeros com propriedade de discernir proteínas de uma mesma família, de inibir receptores e suas vias de transdução se sinal tornam-se ferramentas promissoras no estudo de famílias de receptores de neurotransmissão, as quais não possuem ligantes seletivos para compreender o seu exato papel fisiológico, fisiopatológico e no desenvolvimento. Para compreender se há algum papel desempenhado dos receptores purinérgicos e especialmente dos receptores PX_2 e $P2X_4$ durante a diferenciação neuronal, a identificação de aptâmeros específicos torna-se interessante, podendo se interferir com a atividade em dois momentos da diferenciação neuronal das células P19, na passagem das células pluripotentes a progenitoras neurais e durante a maturação neuronal das células progenitoras a neurônios maduros.

Objetivos

2. Objetivos

- Identificação dos receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₄ nas células neuronais NH15-CA2 (neuroblastoma murina X glioma de rato) e carcinoma embrionário murino P19.
- Inibição da atividade purinérgica durante a fase precoce e tardia da diferenciação neuronal de células P19 utilizando inibidores purinérgicos disponíveis.
- Geração e identificação de aptâmeros específicos de RNA resistentes a atividade de nuclease com ação inibitória aos receptores P2X₂ e P2X₄.
- Estimativa dos efeitos de inibição do receptor P2X₄ por aptâmeros na diferenciação.

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Linhagens celulares

As seguintes células foram doadas pela Professora Dra H. Chica Schaller, Center for Molecular Neurobiology, Hamburgo, Alemanha:

- P19 carcinoma embrionário murino (Jones-Villeneuve e cols., 1982)
- NH15-CA2 (di-híbrido neuroblastoma X glioma) rato e camundongo (Heumann e cols., 1979).

As células de feocromocitoma de rato PC12 (Greene e Tischler, 1976) foram doadas pela Professora Dra Irene Yan, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

As seguintes células foram doadas pelo Professor Dr. Fernando A. González, University of Puerto Rico, EUA, provenientes do laboratório do Professor Dr Weisman (University of Missouri, EUA)

- 1321N1 selvagens
- 1321N1 transfectadas com o vetor PLSXN (Clontech)
- 1321N1 transfectadas com o vetor PLSXN (Clontech) com o receptor P2X₂ de rato
- 1321N1 transfectadas com o vetor PLSXN (Clontech) com o receptor P2X₄ de rato
- 1321N1 transfectadas com o vetor PLSXN (Clontech) com o receptor P2X₇ de rato

3.1.2 Anticorpos e corantes

Anti- β -tubulina- Santa Cruz Biotechnologies

Anti- β -actina- Santa Cruz Biotechnologies

Anticorpo secundário Anti-goat- FITC AbCAM

Anticorpo secundário-Anti-rabbit-FITC- AbCAM
Cabra Anti-receptor de B2 de cininas- Santa Cruz Biotechnologies
Coelho Anti receptor P2X₄-Alomone
Coelho Anti-receptor P2X₂-Chemicon International
DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol)-Sigma Aldrich
Fluo 3 AM-Sigma-Aldrich
Ionóforo de cálcio -4-Br-A23187 (Sigma-Aldrich)

3.1.3 Fatores de indução a diferenciação

All trans ácido retinóico-Sigma-Aldrich
Dibutilil cAMP- Sigma-Aldrich
Fibroblast Growth Factor-basic (FGF-b) Doado pelo Professor Dr. Hugo A. Armelin, Instituto de Química, USP
Meio definido: insulina; transferina; etalonamina; selenato de sódio; aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich)

3.1.4 Enzimas e reagentes de Biologia Molecular

DNase I-Ambion
dNTPs- Invitrogen ou Fermentas
EcoRI- Invitrogen
Enzima de transcriptase reversa -*Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase* (MMLV) - Fermentas
Enzima de transcriptase reversa-*Avian Myeloblastosis Virus* (AMV)-Promega ou Sigma Aldrich
HindIII- Invitrogen
MgCl₂- Fermentas
Random hexamers- Invitrogen
RNase inhibitor- Fermentas
ScaI- Invitrogen

T4 ligase-Invitrogen

T4 polinucleotideo quinase-Invitrogen

T7 RNA polimerase-Ambion, Invitrogen ou Sigma-Aldrich

Taq polimerase- Fermentas ou Invitrogen

Transcriptase reversa-Fermentas

3.1.5 Inibidores de atividade de proteases

Aprotinina- Sigma Aldrich

Fenilmetilsulfonil Fluorídeo (PMSF)-Sigma Aldrich

Leupeptina-Sigma Aldrich

N-alfa-tosil-L-lisil-clorometil cetona (TLCK)- Sigma Aldrich

3.1.6 Kits e reagentes para extração de RNA

Dosagem de proteínas (BCA)- Pierce

Maxiscript and Megascript *in vitro* transcription kits-Ambion

Miniprep- Promega

pGEM T easy- Promega

Sequenciamento big dye- Applied Biosciences

TRIZOL-Invitrogen

Wizard SV gel and PCR clean-up system-Promega

3.1.7 Meios de cultura e soros

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) high glucose suplementado com 10 % soro fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamato, 100 U/ml penicilina e 100 mg/ml estreptomicina tamponado com 10 mM HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico), 2.4 mg/ml de bicarbonato de sódio em pH 7.4 (Invitrogen)

LB ágar- LB + 3% agar- Sigma Aldrich

LB- Luria-Bertani- Em 500 ml de meio: Bacto-triptona 5 g, extrato de levedura 2,5 g, cloreto de sódio 5 g e 500 ml de água destilada.

Meio definido- meio DMEM tamponado com HEPES em pH 7,4 suplementado com 5 µg/ml de insulina; 30 µg/ml de transferina; 20 µM de etalonamina; 30 nM de selenato de sódio; 1 % de aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich)

SOB- 0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgSO₄

SOC- adição no meio SOB de 20 mM de glicose e 10 mM de MgCl₂

Soro de Cavalo-Invitrogen

Soro Fetal Bovino- Cultilab, Campinas

3.1.8 Nucleotídeos e oligonucleotídeos

2'-fluoro citosina trifosfato- 2'-F'dCTP (Trilink)

2'-fluoro uridina trifosfato-2'-F' dUTP (Trilink)

Nas reações de ligação com ATP radiomarcado foram utilizados tanto ³²P γ-ATP ou ³²P α-ATP.

Ribonucleotídeos- AMBION

Ribonucleotídeos radiomarcados-³²P α-ATP atividade específica de 3.000 Ci/nmol (GE Healthcare) utilizado nas reações de transcrição *in vitro*.

Ribonucleotídeos radiomarcados-³²P γ-ATP atividade específica de 3.000 Ci/nmol (GE Healthcare) utilizado na reação *primer labeling* 5'.

3.1.9 Plasmídeos

pGEM 3Z (Promega)

pGEM Teasy (Promega)

3.1.10 Drogas, antibióticos e reagentes diversos

Ampicilina (Invitrogen) estoque de 100 mg/ml

Estreptomicina (Sigma-Aldrich) 100 µg/ml de estreptomicina em meio de cultivo celular

Geneticina (Sigma-Aldrich) estoque de 500 mg/ml

Penicilina (Sigma-Aldrich). 100 U/ml de penicilina em meio de cultivo celular

Piruvato de sódio (Lab Synth) estoque de 200 mM

3.1.11 Solventes

24 Fenol: 23 Clorofórmio: 1 álcool isoamílico- Invitrogen

Álcool isoamílico- Sigma Aldrich

Clorofórmio- Merck

Etanol absoluto- LabSynth

Isopropanol- Lab Synth

3.1.12 Soluções e tampões

5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal)- solução estoque 20 mg/ml a -20°C em dimetilformamida

Brometo de etídeo-solução estoque de 1000X- 50 mg de brometo de etídeo em 100 ml de H₂O

Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG)- 400 mg/ml em H₂O

RFI-100 mM de KCl, 50 mM MnCl₂ X 2 H₂O, 30 mM de acetado de potássio, 10 mM de glicerol com pH 5,8 ajustado com ácido acético.

RFII-10 mM de Na-MOPS (ácido 3-N-Morfolino propanesulfônico de sódio), 75 mM de KCl, 75 mM de CaCl₂ x 2 H₂O, 15% de glicerol, 10 mM de MgCl₂ ou MgSO₄ em pH de 6,8 ajustado com NaOH.

TAE- 40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA (*EthyleneDiamineTetrAcetic acid*).

Tampão de amostra 6X DNA- 20% de glicerol, 1 mg/ml bromofenol blue, 1 mg/ml de xileno cianol.

Tampão de amostra de Proteína- Fermentas

Tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline with Calcium and Magnesium*, PBS) 3X- 390 mM Na₂HPO₄, 390 mM NaCl, 30 mM NaH₂PO₄ pH=7,4

Tampão fosfato salino- (*Phosphate Buffered Saline*, PBSA) 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na₂HPO₄.7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄ pH=7,3

TBE- 98 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA.

Tampão de amostra 2X RNA- em formamida, 0,2% azul de bromofenol, 0,2% xileno cianol- Ambion

Tripsina diluído em solução de Hank's- 5,4 mM KCl, 0,3 mM Na₂HPO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 4,2 mM NaHCO₃, 0,5 mM MgCl₂, 0,6 mM MgSO₄, 137 mM NaCl, 5,6 mM D-glicose pH=7,4.

Acrilamida 40%(peso/volume) e 2,5% de bisacrilamida (peso/volume)

Acetato de sódio 3M pH 4,2

TE- 10 mM Tris-Cl pH=8,0, 1 mM EDTA pH=8,0

Acetato de sódio 3M pH 5,2

3.2 Métodos

3.2.1 Diferenciação celular das células murinas P19 em células neuronais

As células P19 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2 mM de piruvato de sódio até atingirem confluência de 70 a 80 % em 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, as células foram soltas com aplicação de tripsina quando foram plaqueadas suspensão em placas de Petri cobertas com 0,5% de agarose em PBSA na densidade de 500.000 células por ml de meio definido (meio DMEM suplementado com 2 mM glutamina, 2 mM piruvato de sódio, 2.4 mg/ml de bicarbonato de sódio, 5 µg/ml de insulina, 30 µg/ml apo-transferrina humana, 20 µM etanolamina, 30 nM de selenato de sódio, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 mM de HEPES, pH 7.4) (Bottenstein e Sato, 1979; Darmon e cols, 1981) com adição de 1 µM de ácido retinóico *all trans* para a indução da formação de corpos embriônicos. Após 48 horas de tratamento, as células retornaram para a garrafa de cultura celular em meio DMEM 10% soro fetal bovino por 36 horas para adesão, e após este período, as células foram novamente cultivadas em meio definido para finalização da diferenciação neuronal, tendo o meio celular trocado a cada dois dias. No dia 8, as células expressam proteínas específicas a neurônios como NF200 e β III-tubulina e no dia 10, marcadores gliais como GFAP (proteína fibrilar ácida da glia) (Ulrich e cols., 1996, Niemann & Schaller, 1996). A atividade sináptica foi identificada por ensaios de *calcium imaging*.

3.2.2 Diferenciação neuronal de células feocromocitomas de rato- PC12

As células PC12 foram cultivadas em DMEM com alta concentração de glicose e 10% de SFB + 5% de soro de cavalo (HS). Na concentração de 2,5 X 10⁴ células/ ml foram adicionados 45 ng/ml FGF-b + dibutilil cAMP 250 µM para a diferenciação

neuronal. O meio com estes agentes de diferenciação foram adicionados a cada 2 dias. A partir do dia 2 pode ser identificados neurônios funcionais em cultura. Os neurônios originados possuem marcadores neuronais NF-200 e β -3 tubulina. As sinapses funcionais foram identificadas por *patch clamping* em *whole cell recording configuration* e *calcium imaging*.

3.2.3 Cultivo das células de astrocitoma humano 1321N1 e da célula neural (dihíbrido neuroblastoma e glioma)- NH15-CA2

As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de piruvato de sódio no meio de cultura até atingirem confluência de 70 a 80%, a 37 C e 5% de CO₂ quando então estas células são subcultivadas. As células transfectadas foram mantidas na presença de geneticina (G418) na concentração de 500 μ g/ml).

3.2.4 Imunofluorescência.

As células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% diluído em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e em seguida permeabilizadas com Triton X-100 0,05% (v/v) diluído em PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS quando foram submetidas a incubação com o anticorpo primário na diluição de 1/250 com 2% de leite desnatado por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS por três vezes e incubadas com o anticorpo secundário na diluição de 1/100 com 2% de leite desnatado por uma hora. As lâminas foram lavadas com PBS novamente e adicionou-se DAPI diluído 1:10.000 para a coloração do material genômico. Os anticorpos utilizados com os respectivos anticorpos secundários conjugados com FITC (Fluorescêina isotiocianato) foram gerados contra β -actina, β -tubulina, receptor B2 de cininas ou os receptores P2X₄ e P2X₂. Como controles, foram utilizadas marcação somente com anticorpo secundário.

3.2.5 Reação de transcrição reversa e reação de PCR

A reação de transcrição reversa foi realizada seguindo-se o seguinte protocolo: 5 µg de RNA extraído pelo TRizol reagent foi tratado por 20 minutos com DNase I (2U/ µl) com seu respectivo tampão e em seguida a enzima foi inativada a 72^o C por 10 minutos. A esta reação foi adicionada 1 µl de 50 ng de random hexamers + 1 µl da enzima de transcrição reversa Moloney Murine Leukemia Virus (20U/ µl) + 1 µl de RNase inhibitor (40U/ µl) + 1 µl dNTPs (10 mM de cada uma dos desoxiribonucleotídeos dATP, dCTP, dGTP, dTTP) + 2 µl MgCl₂ (25 mM) + 2 µl tampão de Taq polimerase (10 X) num volume final de 20 µl. Esta reação foi incubada por 10 minutos a 20 °C e em seguida por 42 °C por 50 minutos. Para inativação da enzima, a reação foi submetida a 95°C por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a reação de PCR: 5 µl da reação de RT + 1 µl de dNTP (10 mM) + 1 µl do primer F (10 pmol/ µl) + 1 µl do primer R (10 pmol/µl) + 5 µl do tampão taq polimerase (10X) + 3 µl de MgCl₂ (50 mM) + 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µl) + H₂O num volume final de 50 µl. Os transcritos identificados foram: reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK), os receptores P2X₂, P2X₄, P2X₇, P2Y₂, P2Y₆, e o receptor muscarínico de acetilcolina M1 e β-actina ou GADHP gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) normalizador e controle interno da reação (*house keeping gene*).

Tabela 2: Lista de primers e condição para reação de PCR para análise de expressão gênica

PRIMER E TAMANHO	TAMANHO	CICLAGEM PARA AMPLIFICAÇÃO	PRIMER SENSO	PRIMER ANTISENSO
RECK	529 PB	94°C 30'' 55°C 30'' 72°C 45'' 35X	5' CCA ATG AGA AAC CCA ACT GA 3'	5' TCT CCC ACA GCT TCA TGT CA 3'
β-ACTINA	535 PB	DE ACORDO COM O PCR	5' AGG AAG AGG ATG CGG CAG TGG 3'	5' CGA GGC CCA GAG CAA GAG AG 3'
B2 DE CININAS (BK2R)	627 PB	95 °C 45'' 56 °C 45'' 72 °C 105'' 35X s	5' ATC CTC ACT CCT CTT TGT C- 3'	5' GGT CCT GAA CAC CAA CAT GG-3'
VAMP-2	323 PB	94°C 30'' 53°C 30'' 72°C 30'' 35X	5' CTA CCG CTG CCA CCG TC 3'	5' GAT GAT GAT GAG GAT GAT GG 3'
P2X ₂ R TODO	1450 PB	94°C 1' 60°C 1' 72°C 1' 35X	5' CAC CAT GGT CCG GCG CTT GGC CCG GGG C 3'	5' TCA AAG TTG GGC CAA ACC TTT GGG GTC CG 3'
P2X ₂ R	765 PB	94°C 30'' 57°C 30'' 72°C 30'' 35X	5' - CAA GAA TTC ATC GTG CAG AAA AGC TAC CAG - 3'	5' - CAA CTC GAG TCG AGT GGT GGT AGT GCC GTT - 3'
P2X ₄ R	600PB	94°C 1' 60°C 1' 72°C 1' 35X	5' TAC GAC ACG CCG GCG ATC 3'	5' TGC ACG ATT TGA GGT AGG ACG 3'
P2X ₇ R	777 PB	94°C 30'' 53°C 30'' 72°C 30'' 35X	5' - CAT GAA TTC GGC ACC ATC AAG TGG ATC TTG CAC - 3'	5' - CAT CTC GAG TGT CCG CTT TTC CAT GCC ATT TTC-3'
P2Y ₂ R	217pb	94°C 30'' 57°C 30'' 72°C 30'' 35X	5' ACC CGC ACC CTC TAC TAC T 3'	5' GCT TGG CAT CTC GGG CAA A 3'
P2Y ₆ R	231 pb	94°C 30'' 50°C 30'' 72°C 30'' 35X	5' GTT TAC TCA GTG GTG CTG 3'	5' GGC ATA GAA GAG GAA GCG 3'
M1 AchR	441 PB	94°C 30'' 62°C 20'' 73°C 30'' 35X	5'-CAG TCC CAA CAT CAC CGT CTT-3'	5'-GAG AAC GAA GGA AAC CAA CCA C-3'
GAPDH	451PB	94°C 1' 60°C 1' 72°C 1' 35X	5' - ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC - 3'	5' - TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA - 3'
NR1	1033 PB	94°C 1' 55°C 1' 72°C 1' 35X	5' - ACG GAA TGA TGG GCG AGC - 3'	5' - GGC ATC CTT GTG TCG CTT GTA G - 3'
NR2D	465 PB	94°C 1' 53°C 1' 72°C 1' 35X	5' - CGA TGG CGT CTG GAA TGG - 3'	5' - CTG GCA AGA AAG ATG ACC GC - 3'

3.2.6 *Calcium imaging* utilizando microscopia confocal para avaliar a $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ após aplicação de neuropeptídeos e neurotransmissores nas células P19, PC12 e NH15-CA2 e 1321N1-PLSXN, PLSXN P2X₂ e PLSXN P2X₄

Para estes experimentos foi utilizado o fluoróforo sensível cálcio, Fluo 3 AM que aumenta a fluorescência na emissão de 520 nm quando ligado ao cálcio (Grynkiewicz e cols, 1985). Nas células cultivadas em placas de 35 mm foram adicionados meio DMEM 10% SFB, 0,5% de DMSO (Invitrogen), 0,1 % de ácido pluorônico (para facilitar a entrada do fluoróforo) e 8 μM de fluo-3 AM (Sigma ou Molecular Probes). As esterases intracelulares clivam a molécula de Fluo3-AM em Fluo 3 o qual impede a saída da molécula da célula. Após incubação de 30 minutos a 37°C, as células foram lavadas e mantidas em pH 7,4 de meio DMEM 10% SFB ou de meio definido. Os experimentos foram realizados no Departamento de Biofísica no Instituto de Ciências Biomédicas I-USP utilizando o microscópio confocal da Zeiss LSM 510 nos comprimentos de onda de Fluo 3 AM de 488 nanômetros de absorção e de *long pass* 510-540 nanômetros de emissão, na temperatura de 18°C. Entre as medidas, houve um intervalo de 15 minutos, as células foram lavadas duas vezes com meio de cultura celular. A ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$) foi determinada pela seguinte fórmula:

$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \text{ do fluoróforo } (F - F_{\text{mim}}) / (F_{\text{máx}} - F)$ (Siddle, K e Hutton, J.C., 1990), onde K_d é a constante de dissociação do fluoróforo do cálcio; que no caso de Fluo 3AM é de 450 nM; F é a fluorescência obtida durante o experimento, $F_{\text{mín}}$ é a fluorescência mínima obtida após adição de 10 mM de EGTA (ácido tetracético etileno glicol- *ethylene glycol tetraacetic acid*), pH 8,0 e $F_{\text{máx}}$ é a fluorescência máxima obtida após aplicação de 5 μM de ionóforo (4-Br-A23187).

3.2.7 Ensaios de diferenciação neuronal na presença de ligantes purinérgicos

3.2.7.1 Ensaios de determinação de progenitores P19 neuronais na presença de ligantes purinérgicos

As células na concentração de 500.000 células/ml foram ressuspensas em meio definido com adição de 1 μ M de ácido retinóico *all trans* em placas de Petri tratadas com 0,5% de agarose-PBS. Adicionaram-se também os aptâmeros selecionados ou ligantes purinérgicos como brilliant blue, PPADS, suramina, $\alpha\beta$ metileno ATP ou reactive blue-2 na concentração de 1 a 100 μ M. As células foram mantidas nestas condições por dois dias em cultura em 5% CO₂, 37°C e com umidade controlada. Os corpos embriônicos formados foram fotografados em posições randômicas no microscópio Zeiss Axiovert 200 em aumento de objetiva de 20 X com câmera digital Sony-Zeiss. O diâmetro dos corpos embriônicos foi medido seguindo os critérios de que os corpos embriônicos deveriam estar refringentes e compactos, o maior diâmetro foi escolhido no caso de formato irregular. Corpos embriônicos que não tivessem 50% da imagem no campo foram descartados da contagem.

O tratamento de dois dias foi mantido para evitar manipulações desnecessárias que alterassem a formação dos corpos embriônicos formados e levando-se em conta os estudos de renovação (*turn-over*) protéico de receptores nicotínicos são de 48 horas (Listerud e cols., 1991; Brussaard, 1997) e foram extrapolados aos receptores purinérgicos.

3.2.7.2 Ensaios de diferenciação neuronal de células P19 com ligantes de receptores purinérgicos- da passagem de progenitores neurais P19 (dia 3) a neurônios P19 (dia 8 e 9)

O tratamento a fim de identificar a participação de receptores purinérgicos ao longo da diferenciação neuronal foi iniciado no dia 3, após indução a diferenciação com as células em suspensão na presença de meio definido acrescido de *all trans* ácido retinóico 1 μ M. Paterno e cols. (1997) e Pyle e cols. (2001) demonstraram a expressão

de neurofilamentos de cadeia leve e médio após a indução da diferenciação nas células P19; já no dia 3 nas células progenitoras P19 neurais. Neste tratamento com inibidores purinérgicos foi adicionado 1 μ M de $\alpha\beta$ metileno ATP, PPADS, reactive blue-2 ou suramina os quais foram adicionados a cada dois dias com a troca do meio definido até o dia 8 ou 9. Duas horas antes do experimento em microscopia confocal a fim de avaliar a funcionalidade de receptores de NMDA, muscarínicos de acetilcolina e de ATP, o meio foi trocado sem nova adição dos inibidores.

3.2.8 Medições de correntes de *whole-cell* induzidas por ATP em células 1321N1 PLSXN-P2X₂R, PLSXN P2X₄ e PC12

As medições foram realizadas em células 1321N1 transfectadas com os receptores purinérgicos de rato P2X₄ ou P2X₂ ou nas células PC12 as quais expressam receptores P2X₂ e P2X₄ selvagem. As medidas de corrente em *whole cell* (Hamill e cols, 1981) foram realizadas a 22°C, -60 mV em pH 7,4. A solução na pipeta captadora do sinal era composta de 140 mM de KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA e 25 mM de HEPES em pH 7,4. A solução do banho extracelular era composta de 145 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 10 mM glicose em pH 7,4. As soluções foram trocadas de acordo com Udgaonkar e Hess (1987); Hess e cols (1987) e Krishtal e Pidoplichko (1980) utilizando-se o tubo em U. A resistência do eletrodo de captação do sinal preenchido pelo tampão intracelular descrito acima foi de 3-5 M Ω e a resistência em série era de 5-6 M Ω . Para as medidas de receptores purinérgicos, as células foram mantidas a uma voltagem transmembrânica de corrente de -60 mV durante todo o experimento. ATP + aptâmero foi aplicado por 2 segundos e houve 5 minutos de intervalo entre as medidas a fim de permitir o re-estabelecimento do receptor ao estado nativo do seu estado dessensitivado. As correntes de *whole cell* foram amplificadas utilizando-se o Axopatch 200B (Axon instruments) software Axon PCLAMP software. O sinal do filtro foi digitalizado usando Digidata 1320 (Axon instruments) controlado pelo software Axon. As frequências típicas de digitalização foram de 1-5 kHz para experimentos de *cell flow*. A análise foi realizada no programa MicroCal Origin.

3.2.9 Protocolo de extração de membrana celular

O extrato de membrana celular das células de astrocitoma 1321N1 PLSXN, PLSXN-P2X₂R ou PLSXN-P2X₄R foi preparado a partir de 9 garrafas de 225 cm² confluentes de células selecionadas com o marcador de seleção G418 (marcador de resistência do plasmídeo PLSXN). As células foram lavadas com PBSA, ressuspensas em PBS-2 mM EDTA e centrifugadas a 300 g por 5 minutos, quando foram lavadas com o tampão sacarose (250 mM de sacarose, 20 mM de HEPES, 1 mM de EDTA) e novamente centrifugadas a 300 g. Em um tubo cônico de 15 ml, as células foram ressuspensas em 1 ml de tampão sacarose o qual é composto de 250 mM de sacarose, 20 mM de HEPES, 1 mM de EDTA, 2,8 ug/ml de aprotinina, 1 mM de fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF), 1 mM de N-alfa-tosil-L-lisil-clorometil cetona (TLCK) e leupeptina na concentração de 100 µM onde foram mantidas no gelo até o início do processo de sonicação. O material foi sonicado 3 x 10 pulsos de 30% com intervalos de 1 minuto entre os ciclos. Os ciclos continuaram até se obter no máximo 5% de células íntegras no processo. O material foi centrifugado a 600g por 10 minutos a 4° C e se recuperou o sobrenadante. O *pellet* foi novamente lavado, sofreu os ciclos de sonicação e foi centrifugado a 600 g 10 minutos a 4° C. Os sobrenadantes recuperados após o processo de sonicação e centrifugação foram unidos e novamente centrifugados a 10.000 g por 15 minutos, onde se recuperou o sobrenadante. E este foi submetido a uma ultra centrifugação de 100.000 g por 1 hora. Após este passo, lavou-se o *pellet* que foi ressuspendido no tampão B (20 mM de HEPES, 1mM de EDTA, 0,0058 g de NaCl/ ml e 0,005g de MgSO₄/ ml). O processo de ultra-centrifugação foi realizado mais duas vezes e o *pellet* recuperado foi ressuspendido em 1 ml de PBS estéril e aliqotado em frações de 50 µl, sendo estocado a -20° C. A concentração de proteína foi dosada pelo método BCA para experimentos posteriores (Smith e cols., 1985).

3.2.10 Ensaio de ligação radioligante-receptor

Os ensaios de ligação utilizando ATP marcado com ³²P na posição α ou γ como radioligante foram modificados dos protocolos de Michel e cols., 1996 a fim de

melhorar a especificidade de ligação aos receptores purinérgicos P2X₂, P2X₄ ou P2X₇ expressos nas células 1321N1 –PLSXN. As células na concentração de 1 X 10⁴ plaquedas em placas aderentes de 24 poços foram incubadas em PBS pH 7,4 por 40 minutos com ATP radiomarcado (100.000 cpm, 65 pM) na presença ou ausência de concentrações crescentes de suramina ou $\alpha\beta$ metileno ATP a fim de determinar se estes ligam-se ao mesmo sítio de ligação a ³²P ATP. A porcentagem de ligação não específica foi determinada na presença de 100 μ M ATP não radioligado.

Após a incubação, as células foram lavadas com 2 volumes de PBS (do volume inicial de 200 μ l) e solubilizadas na presença de 1% SDS (dodecil sulfato de sódio) e 100 mM citrato de sódio por 30 minutos, o extrato foi agitado com líquido de cintilação de 9 a 12 horas e quantificado em contador de cintilação.

Para determinação da quantidade de sítios de ligação do receptor P2X₄, foram utilizadas diversas concentrações de ³²P-ATP como ligante e como competidor, a concentração de 100 μ M de $\alpha\beta$ metileno ATP. A reação foi incubada com 20 μ g de proteína por 40 minutos a temperatura ambiente e separadas por filtração sobre filtros de fibra de vidro (GFF, Whatman).

3.2.11 Protocolo de SELEX

3.2.11.1 Preparação da biblioteca

A biblioteca de DNA foi sintetizada e purificada em gel pela Biosources International, CA, EUA para iniciarmos a seleção de aptâmeros aos receptores P2X₄ ou P2X₂. A biblioteca contém 10¹³ moléculas diferentes com duas regiões constantes de 22 e 40 bases as quais contêm sítios de restrição EcoRI e HindIII, que flanqueiam a região randômica de 40 bases. As seqüências de enzima de restrição são utilizadas na clonagem dos aptâmeros no vetor pGEM 3Z (Promega). (Shi e cols., 1997, Ulrich e cols., 1998, 2002, 2004).

Biblioteca: 5' ACC GAG TCC AGA AGC TTG TAG TAC TNN NNN NNN NNN NNN NNN

EcoRI ScaI

NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNG CCT AGA TGG CAG TTG AAT TCT CCC TAT

HindIII

AGT GAG TCG TAT TAC 3' onde N é igual a qualquer base nucleotídica. Os traços indicam as seqüências de restrição EcoRI, Sca I e HindIII respectivamente.

(40 pb, T7 univ) 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA ATT CAA CTG CCA TCT A 3'

Promotor da T7 RNA polimerase

(22 pb, rev univ) 5' ACC GAG TCC AGA AGC TTG TAG T 3'

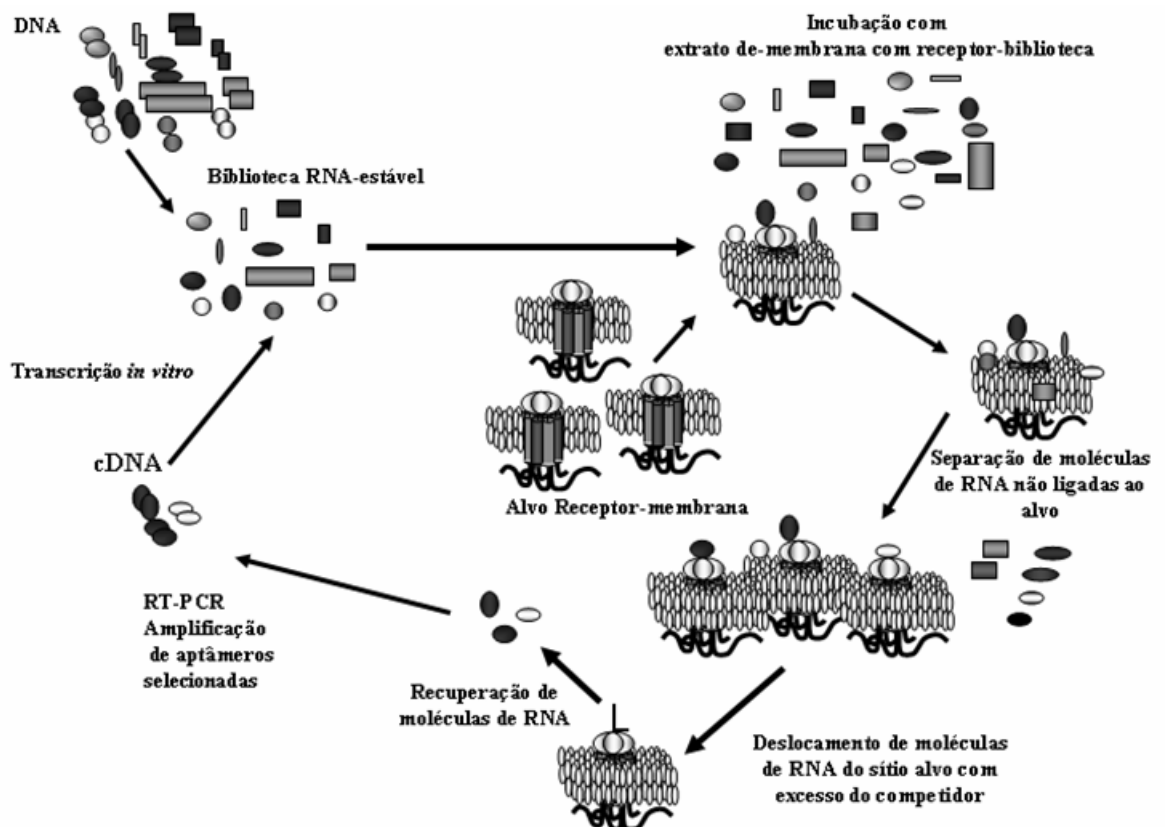


Figura.6.- Esquema de seleção de aptâmeros com atividade inibitória aos receptores de membrana. A biblioteca de DNA simples fita é adquirida e foi sintetizada a fita complementar para em seguida realização da transcrição *in vitro* (biblioteca de RNA resistente a nucleases) que é apresentada ao alvo, o receptor na membrana. Retira-se as ligações inespecíficas através de lavagens e em seguida o complexo-extrato protéico-moléculas de RNA é incubada com solução de 1 mM do ligante do receptor. Recuperam-se moléculas de RNA específicas ao receptor. Este é precipitado e recuperado para ser utilizado como molde na reação de RT-PCR para início de novo ciclo de enriquecimento ligantes P2X. Abreviações: L= ligante, cDNA=DNA complementar, RT-PCR=reação de transcrição reversa sucedida de PCR.

3.2.11.2 *Primer extension*

A fim de se averiguar a integridade e o tamanho da síntese da biblioteca simples-fita, foi realizada a reação de síntese da fita de DNA complementar com o iniciador (*primer*) marcado radioativamente na porção 5' com [³²P] γ ATP e em seguida realizou-se a reação de síntese da fita complementar da biblioteca (Ruano e cols., 1993). As reações estão descritas a seguir.

Para a marcação da região 5' do *primer* complementar, a reação foi de: 10 pmol *primer* P40, 10U T4 quinase, 50 μCi [³²P] γ ATP [atividade de 8000 Ci/mmol], 1 X tampão marcação à frente (*forward labeling*). A reação foi incubada a 37°C por duas horas e purificada em coluna S-10 spin (Sigma-Aldrich) com corte (*cutoff*) de 26 nucleotídeos e submetida à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida PAGE 16% denaturante. Confirmada a marcação positiva do *primer* após análise da imagem gerada pelo imageamento de fósforo (*phosphor imaging*), iniciou-se a extensão do iniciador (*primer extension*).

A síntese da segunda fita foi realizada na reação de: 60 pmol da biblioteca simples fita, 9 pmol do *primer* P40 5' proveniente da reação anterior, 1X tampão *Taq* DNA polimerase, 3 mM MgCl₂, 0,6 mM de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase e H₂O Milli-Q para completar 25 μl de volume final. A reação foi submetida nos seguintes ciclos no termociclador: 94°C por 1 minuto, 50°C por 5 minutos e 72°C por 60 minutos. Parte do produto da reação foi aplicada em gel de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida nativo 8%. O gel foi analisado pela imagem de autoradiografia pelo aparelho *phosphor imaging*. O objetivo deste passo foi de verificar se houve síntese da segunda fita completa e não de fragmentos menores e se havia necessidade da purificação da biblioteca dupla-fita para obtenção do tamanho esperado de 108 pares de base.

3.2.11.3 Amplificação da biblioteca e reação de *Error Prone PCR*

Para se manter a diversidade biblioteca, esta foi amplificada utilizando-se o *error prone* PCR (Zhao e cols., 1998). Para a realização de 32 reações simultaneamente

foram adicionadas um total de 360 pmol da biblioteca simples-fita, 330 μM de dGTP, 330 μM de dATP, 830 μM de dCTP, 830 μM de dTTP, 1 X tampão *Taq* DNA polimerase, 0,5 mM de MnCl_2 , 7 mM de MgCl_2 , 4500 pmol de *primer* P40 e 145 U *Taq* DNA polimerase.

As condições para a amplificação da biblioteca, como temperatura de anelamento dos *primers* e o número de ciclagens, foram padronizadas. As condições empregadas foram 1 ciclo de 94°C por 2 minutos, 49°C por 5 minutos, 72°C por 30 minutos e em seguida adição de 150 pmol do *primer* P22 em cada reação com mais 8 ciclos de 94°C por 1 minuto, 49°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Uma pequena porção foi analisada em gel de poliacrilamida nativo 8% corado com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídeo e clonada utilizando o *kit* pGEM T easy Vector (Promega) para ser seqüenciada a fim de verificar a randomicidade da biblioteca utilizada.

3.2.11.4 Análise da randomicidade da biblioteca de SELEX

Foi analisada a distribuição entre as seqüências identificadas após a clonagem de: AA, AC, AG, AT os quais devem ter distribuição próxima de 25%, a biblioteca deve ser novamente sintetizada com freqüência maior de 30% de um dos *motifs* (seqüência consenso ou *consensus*) (Ulrich e cols., 2004).

3.2.11.5 Precipitação de *error-prone* PCR

A biblioteca dupla fita foi precipitada de acordo com o seguinte protocolo: a 1 volume da reação de PCR foi acrescido por 1 volume da solução fenol 24: clorofórmio 23: álcool isoamílico 1 (pH 8 para precipitação de DNA e pH 5,2 para RNA). Os tubos contendo o produto de precipitação foram agitados no vórtex e colocados na centrífuga a 16.000 g por 3 minutos; o sobrenadante foi recolhido e colocado em novo tubo onde se adicionou 1 volume de clorofórmio o qual foi novamente agitado no vórtex e submetido à centrifugação nas mesmas condições anteriores. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado 1 μl de acrilamida linear (3% acrilamida polimerizado na ausencia de bis-acrilamida), 10% NaOAc 3M, pH 4,8 com etanol absoluto numa

concentração final de 80% final. O tubo foi mantido na temperatura de -20°C por 1 hora. E em seguida, este submetida a centrifugação a 16.000 g por trinta minutos na temperatura de 4°C . O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 ml de etanol 80%. O material foi novamente submetido a centrifugação por 15 minutos a 16.000g e a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) foi seco em temperatura ambiente ou no aparelho Speed vac (Eppendorf) em temperatura ambiente de 5 a 10 minutos a vácuo. Em seguida, o material foi ressuscitado em água estéril autoclavada ou em TE (tampão Tris-EDTA pH 8,0) e quantificado nas seguintes densidades ópticas: a 230 nm para verificar se houve contaminação com fenol, a 260 nm para aferir o DNA ou RNA e a 280 nm para a aferir proteína.

3.2.11.6 Transcrição *in vitro*

Na primeira reação de transcrição *in vitro* utilizou-s utilizar 3 nmols da biblioteca dupla-fita de cDNA após precipitação com etanol nas seguintes condições: 1X tampão T7 RNA polimerase, 0,2 mM ATP, 0,2 mM GTP, 0,6 mM 2'-F-dUTP, 0,6 mM 2'-F-dCTP, 50 μCi (^{32}P) α -ATP, 900 U T7 RNA polimerase. A reação foi incubada a 37°C por 12 horas. O volume total de 20 μl de reação de transcrição foi tratada 2U RNase-free DNase por 15- 20 minutos a 37°C . A reação foi submetida em gel de poliacrilamida 8% denaturante em gel pré-aquecido 250V a 60°C e a amostra foi aquecida a 65°C 10 minutos em tampão de corrida de formamida 2X, submetido a eletroforese e em seguida analisado no *phosphor image*. Caso se tenha obtido a biblioteca transcrita, toda a reação foi tratada nas mesmas condições e precipitada como descrito anteriormente ou purificada por gel filtração utilizando a coluna Spin column 30 (Sigma-Aldrich).

3.2.11.7 Seleção *in vitro*

A biblioteca foi aquecida a 65°C 10 minutos na presença de 1 μl de MgCl_2 (10 mM) em tampão PBS e mantida em temperatura ambiente por 20-30 minutos a fim de

propiciar que as moléculas adquiram conformação secundária estável. Em seguida, a esta solução foi adicionado o extrato de membrana contendo os receptores P2X₂ ou P2X₄ por 40 minutos. Em recipiente separado, membranas de nitrocelulose foram mantidas em solução de PBS. Após a incubação, o filtro de nitrocelulose foi colocado no sistema de filtração a vácuo minifold (Schleicher & Schuell) onde foi adicionado o complexo RNA-proteína alvo. O complexo foi lavado duas vezes com PBS a fim de se retirar ligações inespecíficas de RNA. Em seguida o filtro contendo o complexo RNA-proteína alvo foi colocado em solução contendo 0,3 µg/ml de RNA transportador de levedura (carreador) com os competidores αβ metileno ATP (1 mM) nas seleções que envolviam o receptor P2X₄ ou suramina (1 mM) no caso do P2X₂. O recipiente foi agitado por 20 minutos em temperatura ambiente e a solução foi precipitada e purificada a fim de se recuperar moléculas de RNA deslocados dos seus sítios de ligação no receptor para a síntese de cDNA para o próximo ciclo de seleção.

3.2.11.8 Transcrição reversa do RNA recuperado seguido de amplificação por PCR (RT-PCR)

O RNA precipitado foi utilizado para transcrição reversa. Foi adicionado 100 pmol de *primer* reverso, 5 µl de RNA precipitado (de 10 µl) e 1X tampão da enzima de transcrição reversa AMV e a reação foi incubada a 70°C por 10 minutos e se seguida foi adicionado 200 µM de cada dNTP e 50 U AMV em 50 µl. A reação de síntese do cDNA (DNA complementar) foi de 25°C por 10 minutos, 46°C por 50 minutos. A reação foi tratada com 10 U de RNase H por 15 minutos a 37°C para remoção do molde de RNA.

Para a reação de PCR, 25 µl do produto de RT foram adicionados em 1,5 µl do *primer* P40 (100 pmol/µl), 5 U de enzima *Taq* Polimerase, 1X tampão *Taq* DNA polimerase, 6 µl de MgCl₂ (50 mM) em 100 µl de volume final. A reação foi submetida as seguintes ciclagens no termociclador: 94°C por 5 minutos e 10 ciclos de 94°C por 1 minuto, 49°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Uma alíquota do produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 8% a fim de verificar a amplificação do DNA dupla fita no tamanho de 108 pares de base. Em seguida, o restante do material proveniente da reação de transcrição reversa foi amplificado por

PCR para ser em seguida precipitado e o material ser submetido a transcrito *in vitro* para início de novo ciclo de seleção (Fig.6). Vinte a vinte cinco % das reações foram armazenadas para ensaios funcionais.

3.2.11.9 Estringência durante os ciclos de seleções de SELEX

A estringência de seleção foi modificada conforme a progressão das seleções. Iniciou-se com 1 molécula de receptor para uma molécula do aptâmero. A concentração do receptor foi identificada por ensaios de saturação, na qual foi possível determinar que haviam 120 pmol/mg de proteína total de sítios de ligação de ATP e cada receptor possui 3 sítios de ligação. E nos ciclos seguintes, a estringência aumentou na proporção de 1:10, 1:100 e 1:1000.

Inicialmente, utilizou-se 3 nmols da biblioteca de RNA estável que foi incubada com extrato de membrana celular contendo o receptor P2X₂ ou P2X₄ na proporção 1:1 para não se perder a diversidade de seqüências únicas nos primeiros ciclos. Após o terceiro ciclo, a proporção de RNA e a concentração da proteína do receptor foram alteradas a fim de aumentar a competição de ligação e selecionar moléculas de RNA com maior afinidade ao alvo.

3.2.12 Clonagem antes para determinar o grau de randomicidade e posteriormente para identificação de aptâmeros selecionados

3.2.12.1 Preparação de bactérias competentes para clonagem dos insertos:

A cepa bacteriana de *E. coli* DH 5 α foi espalhada em placas LB-ágar (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) contendo 10 mM de MgCl₂ ou MgSO₄. A placa foi incubada a 37^oC por 12 horas. Uma colônia foi inoculada em 2 ml de meio líquido SOB pré-aquecido onde foi incubado a 37^oC em suspensão sob agitação por duas horas até atingir a densidade óptica a 600 nm de 0,5. Em seguida, o pré-inóculo foi transferido em 50 ml de meio SOB sob agitação a 37^oC até a D.O.de 600 nm de 0,6. A cultura foi transferida num banho de gelo por 15 minutos com adição

de 0,5 ml de 1 mM de MgCl₂. Em seguida, submetida a centrifugação por 15 minutos a 4.000 g a 4^oC. O sobrenadante foi descartado e a cultura bacteriana foi ressuspensa em 10 ml de solução RFI (100 mM de KCl, 50 mM MnCl₂ X 2 H₂O, 30 mM de acetado de potássio, 10 mM de glicerol com pH 5,8 ajustado com ácido acético). A cultura foi mantida nesta solução 15 minutos e submetida novamente a centrifugação a 2.000 g por 15 minutos a 4^oC, por duas vezes. A cultura foi centrifugada por 15 minutos, 2.000 g a 4^oC. O sobrenadante foi descartado e a cultura foi ressuspensa em 2 ml da solução RFII (10 mM de Na-MOPS (ácido 3-N-Morfolino propanesulfônico de sódio), 75 mM de KCl, 75 mM de CaCl₂ x 2 H₂O, 15% de glicerol, 10 mM de MgCl₂ ou MgSO₄ em pH de 6,8 ajustado com NaOH) e armazenada no freezer -80^oC até sua utilização.

3.2.12.2 Clonagem da biblioteca combinatória

Foi observado que após 9 ciclos de enriquecimento reiterativo que houve significativa inibição sendo este o último ciclo de SELEX para obtenção de ligantes ao receptor P2X₄ e o ciclo 11 a P2X₂.

Para a identificação dos aptâmeros selecionados, o produto da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose-TAE 2%. A banda com massa molecular de aproximadamente 100 pares de base foi recuperada do gel e purificada utilizando o kit de purificação de banda em gel (Promega). O produto recuperado foi ressuspensa em água estéril autoclavada e submetido a uma reação de ligação utilizando-se o *kit* p-GEM- T easy Vector seguindo-se as orientações do fabricante quanto às concentrações do produto de purificação e plasmídeo a serem utilizados. A reação de ligação foi mantida a 4^oC, 12 horas e utilizada na reação de transformação em bactérias competentes. Cinquenta µl de bactérias receberam 5 µl da reação de ligação. A mistura foi incubada por 30 minutos no gelo e em seguida o tubo contendo as bactérias foi colocado a 42^oC por 1 minuto. O tubo foi novamente colocado no gelo por 3 minutos e em seguida, após adição de 950 µl de LB aquecido, foi transferido ao agitador (*shaker*) sob agitação constante por 1 hora a 37^oC. As bactérias foram plaqueadas em placas LB-ágar contendo o marcador de seleção contido no plasmídeo (com 100 µg/ml de ampicilina) e os agentes para o teste colorimétrico com a enzima β-galactosidase para

averiguar a entrada do inserto no plasmídeo 20 mg/ml de X-gal (5-bromo 4-cloro 3-indolil β -D-galactopiranosídeo) e 20 mg/ml de IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo). A placa foi incubada a 37°C por 12 horas. As colônias brancas obtidas foram crescidas em meio LB líquido com 50-100 mg/ml de ampicilina sob agitação por 12 horas e submetidas a extração do DNA plasmidial utilizando-se o kit de mini prep (Promega). Posteriormente 2 μ l do DNA plasmidial foram submetidos a reação com enzima de restrição ScaI (10U/ μ l) a fim de averiguar a presença do aptâmero no interior do plasmídeo. O Vetor pGEM contém um sítio ScaI na posição 1875 pares de base e o aptâmero na sua porção constante (cDNA) 18 pares de base. A presença de aptâmeros no vetor foi confirmada após a digestão com o aparecimento de duas bandas de tamanhos 1965 e 1143 pares de base na eletroforese em gel de agarose TBE 1,5%.

3.2.12.3 Sequenciamento

Utilizou-se 100 a 400 ng de plasmídeo obtido pela mini prep em 10 pmol de *primer* M13 senso (5` GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3`) ou anti-senso (5`GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG 3`), 2 μ l de Big Dye, 4 μ l do tampão Save Money composta de 200 mM de Tris-HCl, 5 mM de MgCl₂ pH 9,0. As condições de ciclagem no termociclador foram de 35 X: 94°C 30 segundos, 50°C 30 segundos e 60°C 3 minutos. A reação foi precipitada adicionando 1 μ l de glicogênio (1g/l), 1 μ l de NaOAC 3M pH 4,6 e 25 μ l de etanol absoluto e incubada por 15 minutos em gelo. A solução foi submetida a centrifugação a 14.000g por trinta minutos 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 50 μ l de etanol 75% e a mistura foi novamente submetida a centrifugação por 15 minutos a 14.000g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o *pellet* foi mantida a temperatura ambiente protegido da luz. A reação foi ressuspensa em formamida, fornecido pelo fabricante, e aplicado no sequenciador ABI localizado no Instituto de Química, USP. As seqüências obtidas, antes previamente randômicas mostraram-se similares e foram alinhados a fim de detectar regiões conservadas.

3.2.13 Determinação da ligação específica e atividade inibitória das bibliotecas de RNA selecionados aos receptores P2X₂ e P2X₄

Diversos ensaios foram empregados a fim de se averiguar o enriquecimento da biblioteca principalmente após o segundo ciclo de seleção até o estabelecimento de ligantes com maior afinidade. Os ensaios foram *patch clamping* na técnica de *cell flow* na configuração *whole-cell recording* em cinética rápida utilizando tubo em U, *calcium imaging* para avaliar $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em microscopia confocal descrito anteriormente, os ensaios de ligação com radioligante e receptor e ensaios de *gel shift*.

3.2.13.1 Gel Shift

Cem mil a duzentos mil cpm emitidos de moléculas de RNA [³²P] α ATP 50-60 pM foram aquecidas a 65 °C por 10 minutos e em seguida mantida em temperatura ambiente por 20-30 minutos a fim de propiciar aquisição da conformação secundária estável em temperatura ambiente. Em seguida, a estes aptâmeros foi adicionado o extrato de membrana das células contendo os receptores P2X₂ ou P2X₄ em PBS os quais foram incubados por 40 minutos. O material foi aplicada juntamente com tampão de corrida em gel de poliacrilamida nativo 3% TBE em pH 7,4 em 150 V por duas horas. Após a eletroforese, o gel foi exposto no cassete do *phosphor imaging* para digitalização e posterior análise.

3.2.13.2 Testes de ligação radioligante-receptor utilizando extrato de membranas contendo o receptor

O progresso do enriquecimento da ligação proteína-moléculas de RNA durante os ciclos de seleção reiterativa de SELEX pôde ser monitorada em ensaios de ligação entre os transcritos marcados radioativamente e as moléculas alvo.

A reação foi montada segundo o protocolo: foram adicionados de 100.000 cpm de RNA marcado com α -³²P-ATP (atividade específica de 10.000 cpm/pmol) da

biblioteca selecionada contra os receptores P2X₂ ou P2X₄, ou ainda de aptâmeros individuais identificados das bibliotecas selecionadas em 20 µg de proteína na presença ou ausência de diversas concentrações do competidor suramina ou $\alpha\beta$ metileno ATP e 0,3 µg/ml de t-RNA. A reação foi incubada de 40 a 60 minutos. A amostra foi aplicada em filtros de fibra de vidro (GFF-Whatman) em aparelho de filtração a vácuo da Schleicher e Schuell (96-well minifold filtration Apparatus) como descrito por Ulrich e cols (1998). Trinta µl da reação foram passados pelos filtros e lavados com 200 µl de PBSA. O complexo receptor- ligante precipitou nos filtros e a este foi adicionado líquido de cintilação e quantificada no contador de cintilação.

3.2.13.3 Análise das regiões consenso e previsão da estrutura secundária.

Após avaliar que a afinidade dos ciclos de RNA estável não aumentavam, o cDNA das bibliotecas dos ciclos 9 P2X₄ e 11 P2X₂ foram amplificados por PCR e clonados no vetor pGEM 3Z (Promega). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% TAE e purificado. Após a quantificação, este e o vetor pGEM 3Z foram submetidos a digestão com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII por duas horas e purificadas. Em seguida, o vetor foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% TAE e o fragmento de 2683 pares de bases foi recuperado, purificado e quantificado. Noventa pares de base do cDNA da biblioteca selecionada foi purificada e dosada. Em seguida, foi realizada a reação de ligação seguindo-se o manual do fabricante. A reação de ligação foi transformada de acordo com o item 3.2.12.2 e os clones obtidos foram seqüenciados. Identificaram-se a seqüência conservada na posição randômica que foi comparada às demais seqüências obtidas e que foram divididas em famílias. Para identificar se a região conservada fazia parte da estrutura secundária *stem-loop* (grampo estrutural), a seqüência do aptâmero foi analisada no programa M-fold, o qual leva em consideração as interações entre os ribonucleotídeos e a energia livre mínima da estrutura na temperatura ambiente, disponível no endereço eletrônico: <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>. Este programa foi desenvolvido por Zuker, (1989).

Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterização da diferenciação neuronal das células de carcinoma embrionário P19

A diferenciação neuronal da célula de carcinoma embrionário P19 (EC) é muito semelhante a de células-tronco embrionárias murinas (ES) e quanto à expressão de marcadores de desenvolvimento protéicos *in vivo*. Ambas as células EC e ES possuem capacidade de originar células oriundas dos três folhetos embrionários. Na diferenciação neuronal, ambas as células permitem estudar os fatores e vias responsáveis na transição de células pluripotentes a progenitoras neurais (que originam neurônios e glias) e durante a maturação neuronal até a diferenciação celular em neurônios. Contudo, o cultivo das células P19 não requerer meio especial enriquecido, cultivo em camadas de células de fibroblasto irradiado (*feedlayers*) ou ainda adição de agentes que inibem a diferenciação espontânea em cultura *in vitro* como, por exemplo, o LIF.

A diferenciação neuronal das células P19 foi padronizada de acordo com Niemann e Schaller (1996), Tarnok e Ulrich (2001) (Fig.7).

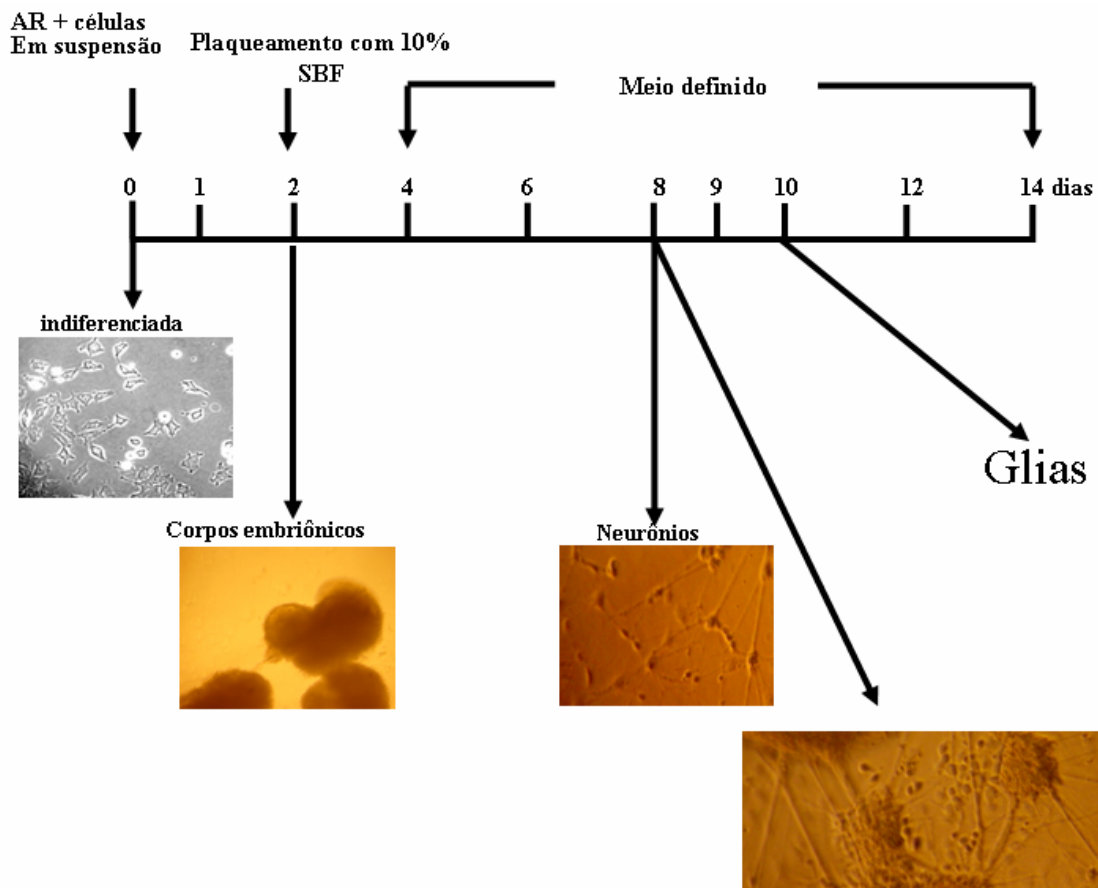


Figura.7. Esquema da diferenciação neuronal da célula de carcinoma embrionário P19. As células foram induzidas à diferenciação neuronal em suspensão na presença de 1 μ M de *all trans* ácido retinóico em meio definido quando formam os corpos embrionários (CE). Após dois dias de cultivo, os CE foram cultivados em placas aderentes em meio DMEM 10% soro fetal bovino (SFB) de 36 a 48 horas. As células, agora progenitoras neurais, sofreram maturação neuronal até que no dia 7-8 foi possível encontrar na cultura neurônios P19 com sinapses funcionais. No dia 10 foi possível identificar marcadores de glias precoces como GFAP. A figura é modificada de Ulrich e Majumder, 2006.

A expressão de alguns transcritos gênicos de interesse do nosso grupo de pesquisa foi investigada ao longo da diferenciação neuronal das células P19 como o receptor de cininas B2 e que resultou na publicação Martins e cols. (2005). A proteína com motivos kazal reversão induzida rica em cisteína (*reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*, RECK) e sinaptobrevina-2 (*vesicle-associated membrane*

protein/syntaxin-VAMP-2) foram identificadas durante a diferenciação neuronal (Fig.8). O produto gênico relacionado à proliferação celular, RECK foi identificado ao longo do processo (Fig.8). A expressão da glicoproteína ancorada a membrana é detectada em tecidos normais, contudo sua expressão é reduzida em linhagens celulares tumorais (Sasahara e cols., 2002). Esta é uma das proteínas responsáveis pela integridade da matriz em células não proliferativas. Detectou-se sua expressão durante todo o processo de diferenciação das células P19 e na linhagem neuronal NH15-CA2 (di-híbrido glioma e neuroblastoma).

Quanto a identificação de transcritos relacionados a receptores e sinapses, VAMP-2 (membro da família proteica proteína anexa ao receptor solúvel N-etilmaleimida fator sensível, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*, SNARE) participa do processo de endocitose e exocitose de vesículas para liberação de neurotransmissores. Nossos dados de imunofluorescência mostraram que expressão protéica não é detectada no estágio pluripotente P19 (dados não mostrados) concordante com os dados de expressão gênica. Contudo sua expressão é detectada em neurônios e glias (Fig.8), sugerindo que a liberação de vesículas sinápticas seja mediada pela sinaptobrevina-2 em células diferenciadas em neurônios e glias.

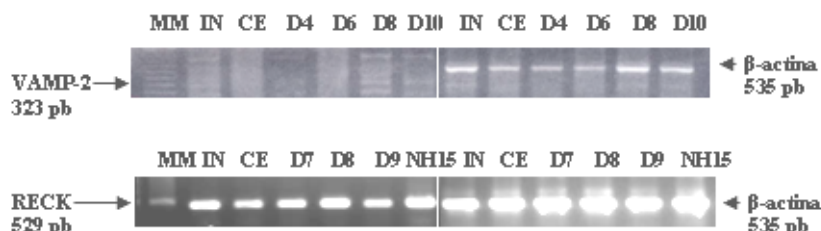


Figura.8. Expressão gênica de VAMP-2 e RECK e dos respectivos controles de β -actinas ao longo da diferenciação neuronal das células P19 e NH15-CA2. Os produtos de RT-PCR obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% TAE. VAMP-2 foi identificado em neurônios e glias P19, RECK foi detectado ao longo da diferenciação e nas células NH15-CA2. Foram realizados 25 e 35 ciclos de PCR respectivamente. Abreviações: MM= marcador de massa molecular, IN= células P19 pluripotentes indiferenciadas, CE= corpos embriônicos, D4, D6, D8 e D10 são os dias de diferenciação neuronal das células P19; RECK= *reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*

4.2. Expressão de receptores de neurotransmissores NMDA e de acetilcolina e dos neuropeptídeos endotelina-B e B2 de cininas nas linhagens neuronais NH15-CA2 e carcinoma embrionário P19.

Além dos transcritos gênicos RECK e VAMP-2; a atividade dos receptores de acetilcolina, NMDA e endotelina-2 foram investigadas ao longo da diferenciação neuronal das células P19 e em células NH15-CA2. Os receptores quando ativados, resultam em aumento da concentração de cálcio livre ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$). Como explicado na introdução, cálcio é um segundo mensageiro que coordena diversos eventos celulares e atua em processos na diferenciação celular. Postulou-se que o padrão de aparecimento e funcionalidade de receptores poderia estar relacionado ao estágio de diferenciação celular e correlacionado aos estágios de diferenciação *in vivo*. Participaria do processo receptores de neuropeptídeos e neurotransmissores, os quais teriam seu padrão de expressão tempo-dependente semelhante ao observado nos trabalhos de Ciccolini e cols.(2003).

A aplicação do análogo estável de acetilcolina, carbamoilcolina (CCh) nas células NH15-CA2 resultou em aumento de 450 nM na ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Fig 9A), indicando a presença e atividade de receptores muscarínicos e nicotínicos. Contudo, o mesmo não foi verificado após a aplicação de NMDA (Fig.9D) ou do neuropeptídeo endotelina-2 (Fig.9B). Entretanto a aplicação de endotelina-2 numa concentração dez vezes maior mostrou a atividade do receptor com $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, efeito não verificado em todas as células (Fig.9C) o que sugere haver modulação quanto a afinidade do receptor conforme o estágio de diferenciação celular e a diversidade entre a população de células. Com uma menor afinidade à endotelina-2 no estágio indiferenciado e maior afinidade do receptor ao ligante em neurônios os quais possuem atividade do receptor na presença de 50 nM de endotelina-2, efeito observado entre receptores de endotelina e outros receptores (Marrero e cols, 1999). As células NH15-CA2 expressam receptores funcionais de acetilcolina mas não de NMDA ou endotelina-B.

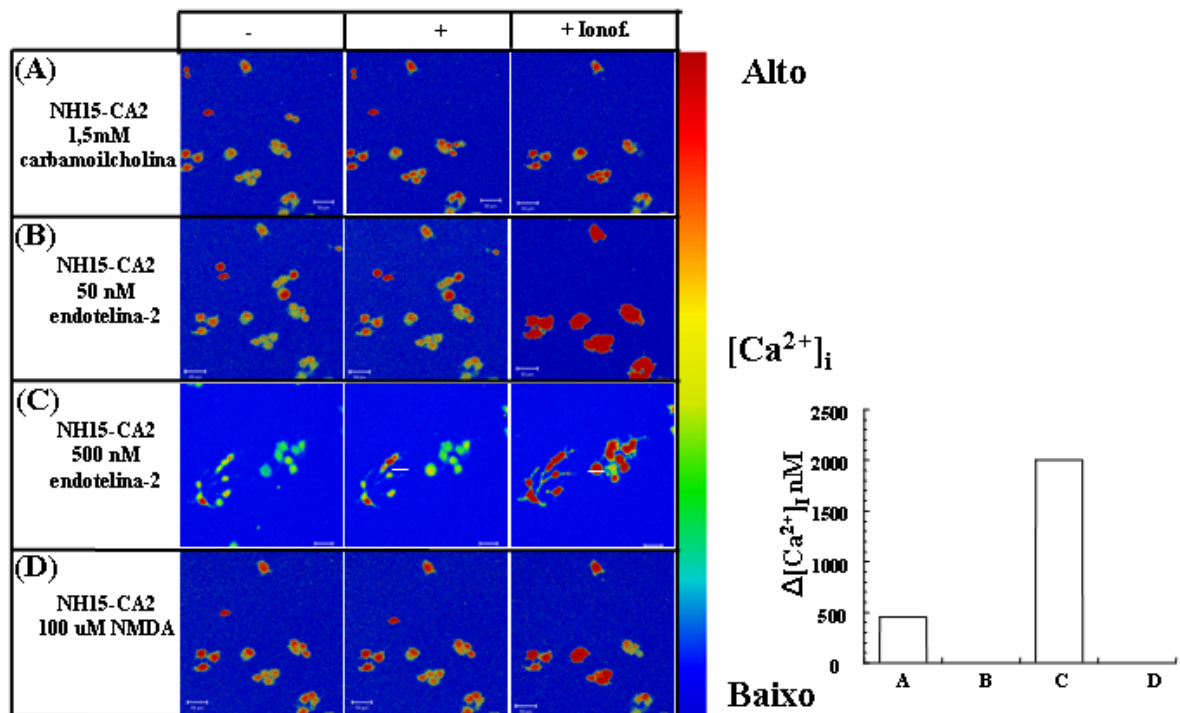


Figura.9. Imageamento de cálcio (*calcium imaging*) em células individuais NH15-CA2 após aplicação dos neurotransmissores 100 μ M de NMDA (A), 50 e 500 nM de Endotelina B (B), (C) e o análogo estável de acetilcolina (1,5 mM de carbamoilcolina) (D) mostram imagens antes de depois da estimulação. A direita está quantificado a ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) após aplicação de cada ligante com média de três células. A aplicação de 1,5 mM de CCh resultou no aumento de 450 nM de $\Delta[Ca^{2+}]_i$, de endotelina-2 ou de NMDA não resultou em $\Delta[Ca^{2+}]_i$.

O mesmo experimento foi realizado nas células P19 nos três diferentes estágios de diferenciação: indiferenciada dia 0, células P19 progenitoras neurais dia 5 e neurônios P19 do dia 8. Foi verificado que os receptores de acetilcolina são funcionais nos três estágios, entretanto houve aumento na $\Delta[Ca^{2+}]_i$ no decorrer do progresso na diferenciação neuronal sendo maior em neurônios P19 (Fig.10B, D e E). Quanto à atividade dos receptores de endotelina-B (Fig.10 C e G) e de NMDA (Fig.10A e F), não houve $\Delta[Ca^{2+}]_i$ na aplicação dos neurotransmissores nas células indiferenciadas, contudo houve aumento progressivo de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em células progenitoras neurais P19 no dia 5 e em neurônios P19. Os dados obtidos de atividade destes receptores corroboram

os dados presentes na literatura, de receptores de acetilcolina, NMDA e endotelina-B nas células P19 (Cauley e cols., 1996; Parnas e cols., 1998, Morley e cols., 1995, Monge cols., 1995).

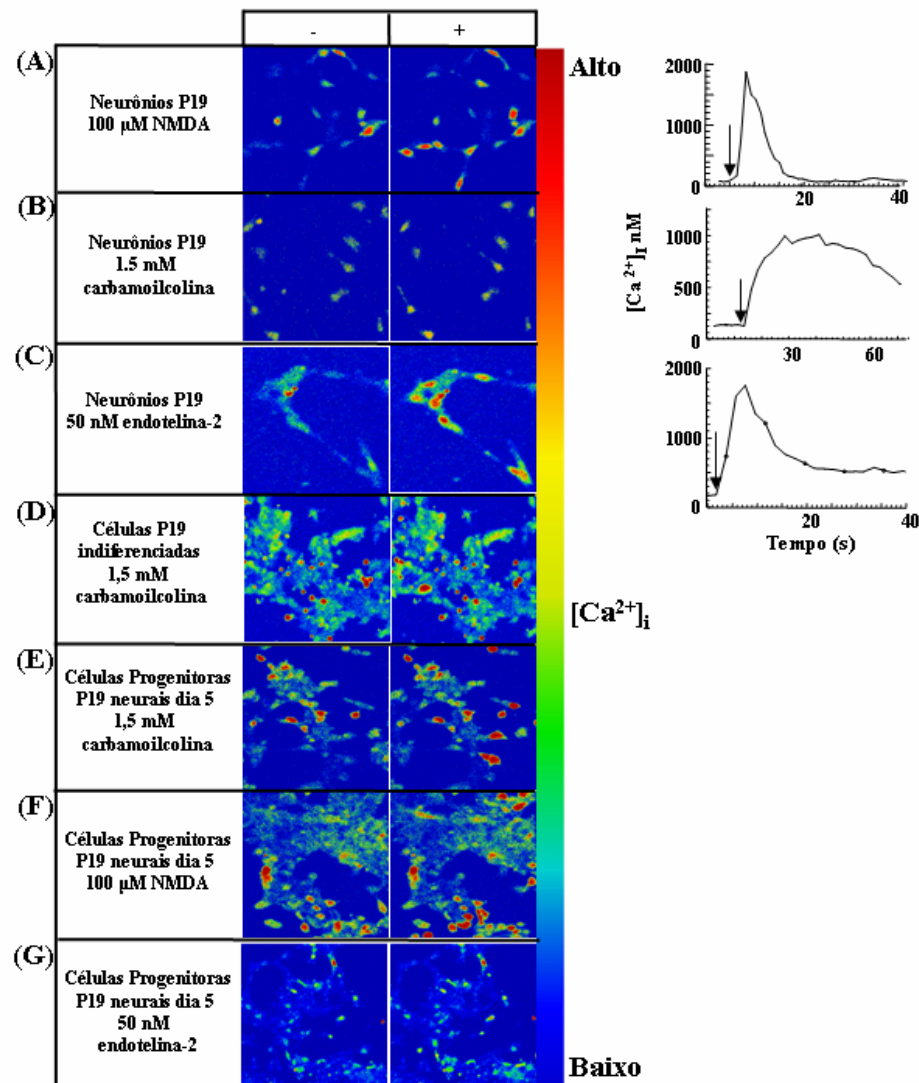


Figura. 10. *Calcium imaging* nas células P19 nos três estágios de diferenciação após aplicação de neurotransmissores 100 μ M de NMDA (A), 50 nM de endotelina-2 (B) ou o análogo estável a acetilcolina (1,5 mM de carbamoilcolina) (C) em neurônios P19. A direita, nos gráficos mostram a $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após aplicação dos ligantes, de 1.800 nM com NMDA, 700 nM com CCh e 1.500 nM com endotelina-2. (D) Imagens antes e após estimulação com 1,5 mM de CCh (D) em células indiferenciadas P19, CCh (E), NMDA (F) e endotelina-2 (G) no estágio progenitor neural dia 5. (modificado de Ulrich e Majumder, 2006).

Outro receptor estudado foi em ambos os sistemas foi o de B2 de cininas (BkR2). Sua atividade funcional foi identificada pela primeira vez durante a diferenciação neuronal das células P19 por Ulrich (1995) que utilizava bradicinina como controle positivo de viabilidade celular em seus experimentos de atividade neuropeptídeo *Head Activator*. Por não existir descrições quanto a expressão e atividade do receptor B2 de cininas, o nosso grupo caracterizou-a quanto sua expressão gênica por RT-PCR (reação de transcrição reversa seguida de reação de polimerase em cadeia); protéica por imunofluorescência e *western-blotting* e funcional através de medidas de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em células NH15-CA2 (Fig.11) e nos três estágios de diferenciação neuronal das células P19 (Fig.12). A aplicação de 1 μ M de bradicina resultou em $\Delta[Ca^{2+}]_i$ por volta de 400 nM nas células NH15-CA2 e 800 nM em neurônios P19 (Fig.12). Tais resultados foram publicados pelo nosso grupo (Martins e cols., 2005).

A inibição deste receptor a partir do quinto dia até oitavo com o inibidor específico H₂N-D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-D-Tic-Oic-Arg-COOH ou HOE-140 resultou em neurônios sem atividade colinérgica. Tal tratamento resultou na redução da expressão gênica dos receptores muscarínicos M1, M2 e M3, identificada através de RT-PCR semi-quantitativo (Martins e cols., 2005, a-Resende e cols., 2007). Estes dados sugerem haja um efeito indireto de expressão gênica de receptores B2 de cininas e subsequente de receptores muscarínicos durante a maturação neuronal das células P19 e que tal controle resulte em neurônios P19 colinérgicos.

A atividade dos receptores purinérgicos foram investigados em ambos os sistemas.

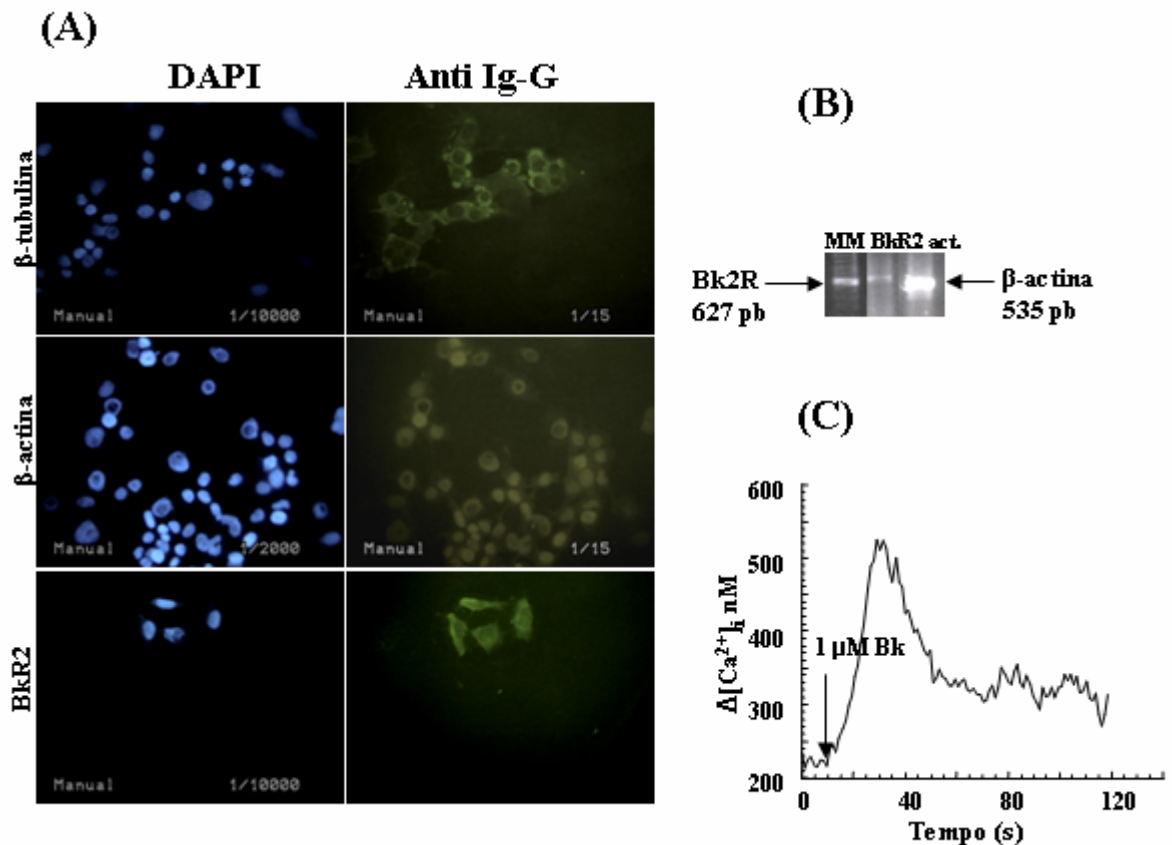


Figura.11. Detecção da expressão gênica, protéica e de atividade do receptor B2 de cininas (BkR2) nas células NH15-CA2. (A) Imunofluorescência de proteínas estruturais controles β -actina e β -tubulina, além dos receptores B2 de cininas nas células NH15-CA2 (anticorpo secundário conjugado a FITC). (B) Identificação da expressão gênica através de RT-PCR do receptor B2 de cininas e β -actina, controle positivo da reação. (C) Medidas de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ avaliados através de fluorimetria após tratamento com FLUO-3AM nas células NH15-CA2. Após aplicação de 1 μ M de bradicinina nas células NH15-CA2 houve aumento de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ de 400 nM. A seta indica o momento da aplicação de bradicinina nas células. O material nucléico foi corado com DAPI para visualização das células. Abreviações: (MM)= Marcador de massa molecular, act.= β -actina e DAPI= 4',6-Diamidino-2-fenilindoleo, FITC=fluoresceína isotiocianato.

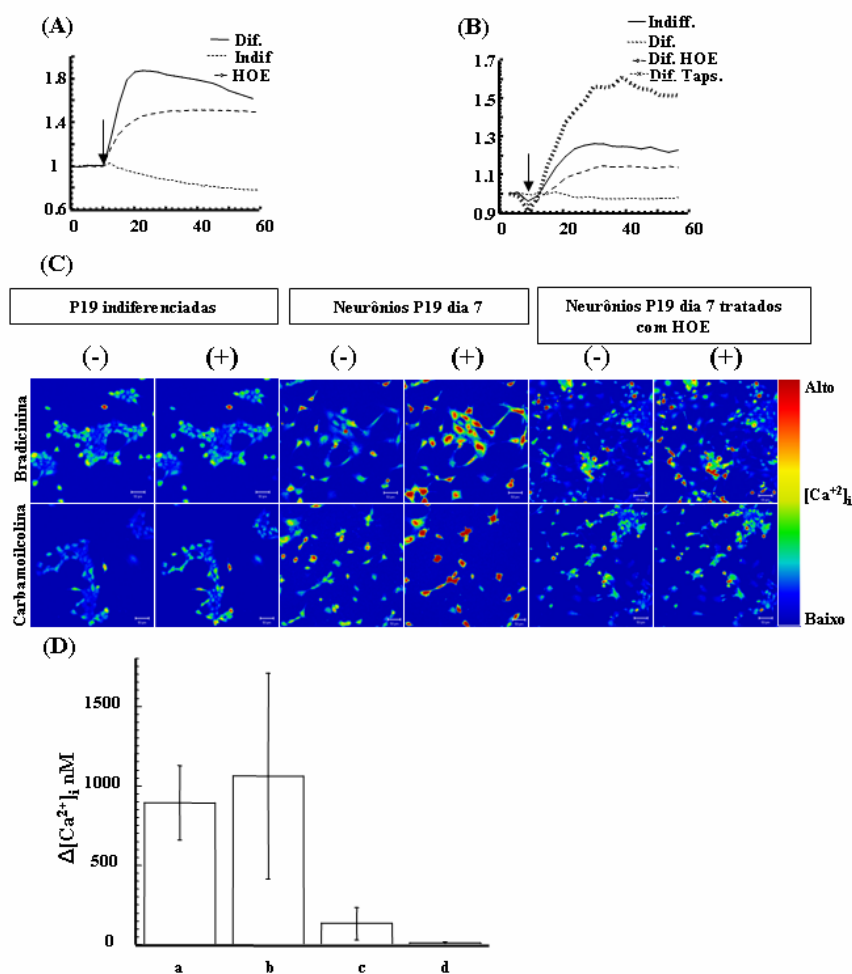


Figura.12. Imageamento de cálcio nas células P19 após estimulação com bradicinina (Bk) e carbamoilcolina (CCh) durante a diferenciação neuronal e sob tratamento com HOE-140. (A) Curva de variação de fluorescência em neurônios P19 dia 8, neurônios P19 pré-tratados com HOE-140 (1 μ M) a partir do dia 5 e células P19 indiferenciadas após aplicação de 1 μ M de bradicinina. (B) Curva de variação de fluorescência em células P19 indiferenciadas, neurônios P19, neurônios P19 pré-tratados com HOE-140 (1 μ M) a partir do dia 5 e neurônios pré-tratados 30 minutos com 180 ng/ml taspigargina (a fim de depletar o estoque intracelular de cálcio) após aplicação de carbamoilcolina (análogo estável de acetilcolina). (C) Imageamento de cálcio antes e após aplicação de 1 μ M de bradicinina ou 1,5 mM de carbamoilcolina nas células indiferenciadas, diferenciadas dia 7 e em células diferenciadas dia 7 após pré-tratamento com HOE-140 (1 μ M) desde o dia 5. (D) Variação de cálcio intracelular após aplicação de bradicinina dia 7 (1 μ M) (a) ou de CCh (1,5 mM) (b) nas células diferenciadas dia 7, de células P19 diferenciadas dia 7 na presença de com HOE-140 (1 μ M) desde o dia 5 após aplicação de 1 μ M de bradicinina (c) ou de CCh (1,5 mM) (d). Os dados mostram a média de dois experimentos diferentes com dados em triplicata. As setas indicam o tempo de adição do agonista. Abreviações: Indif.= indiferenciada, Dif.=diferenciada, taps.=taspigargina, Bk=bradicinina, $\Delta[Ca^{2+}]_i$; concentração de cálcio intracelular livre.

4.3. Identificação de receptores purinérgicos nas células neurais NH15-CA2 e P19 e durante sua diferenciação neural

Já identificado nas células PC12 e descritos anteriormente no item 1.2.2, os receptores purinérgicos foram investigados nas células neurais NH15-CA2 e P19. Inicialmente foram realizadas medidas de atividade funcional utilizando medidas de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ na diferenciação das células PC12 induzida por FGF-b (Fig.13A). A aplicação de 50 μM de ATP elevou a $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ em ambos os estágios celulares (fig.13 B e C). Identificou-se a transcrição através de RT-PCR e protéica através de imunofluorescência (dados não mostrados) dos receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₄ no estágio progenitor (Fig. 13C). Tais dados confirmam que a diferenciação induzida por NGF ou FGF-2 promovem a atividade dos receptores purinérgicos nestas células.

Tais experimentos, em seguida foram realizados nas células NH15-CA2. Foi detectada a expressão gênica e protéica dos receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₄ (Fig.14 A, B) e da atividade dos receptores purinérgicos através de medidas de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig.14C).

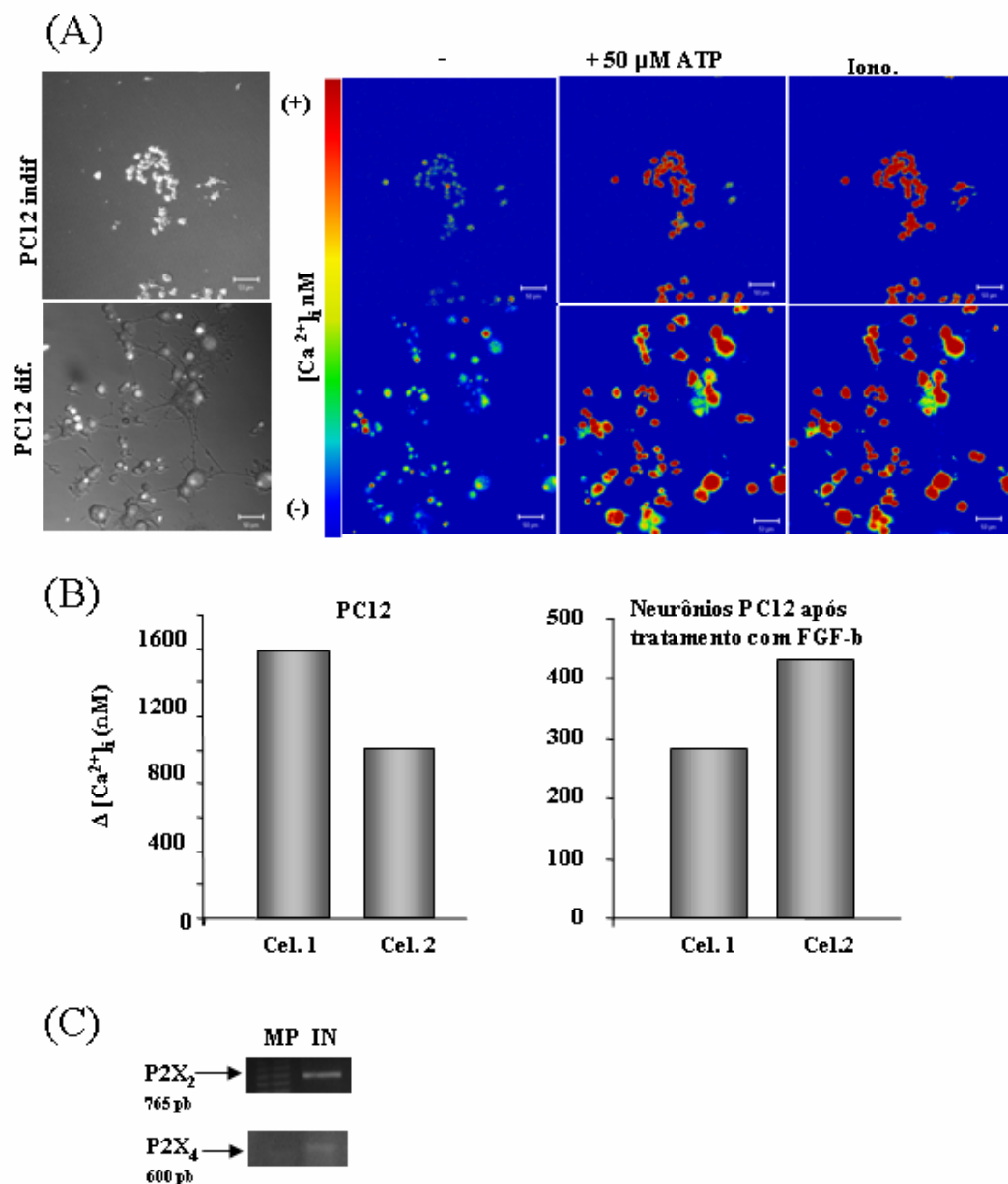


Figura.13. Medidas de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após aplicação de ATP nas células PC12 indiferenciadas ou progenitoras e neurônios PC12 diferenciadas com FGF-b. (A) A figura mostra imagens de transmissão em microscopia confocal das células coradas com Fluo-3AM; antes, após aplicação de 50 μ M de ATP e após aplicação de ionóforo. As imagens correspondem ao tamanho de 50 μ m. (B) Quantificação da $\Delta[Ca^{2+}]_i$ nas células progenitoras e neuronais. (C) Identificação da expressão gênica P2X₂ e P2X₄ através de RT-PCR nas células PC12 progenitoras. Abreviação: marcador da massa molecular =MP, Cel=célula. IN =células indiferenciadas.

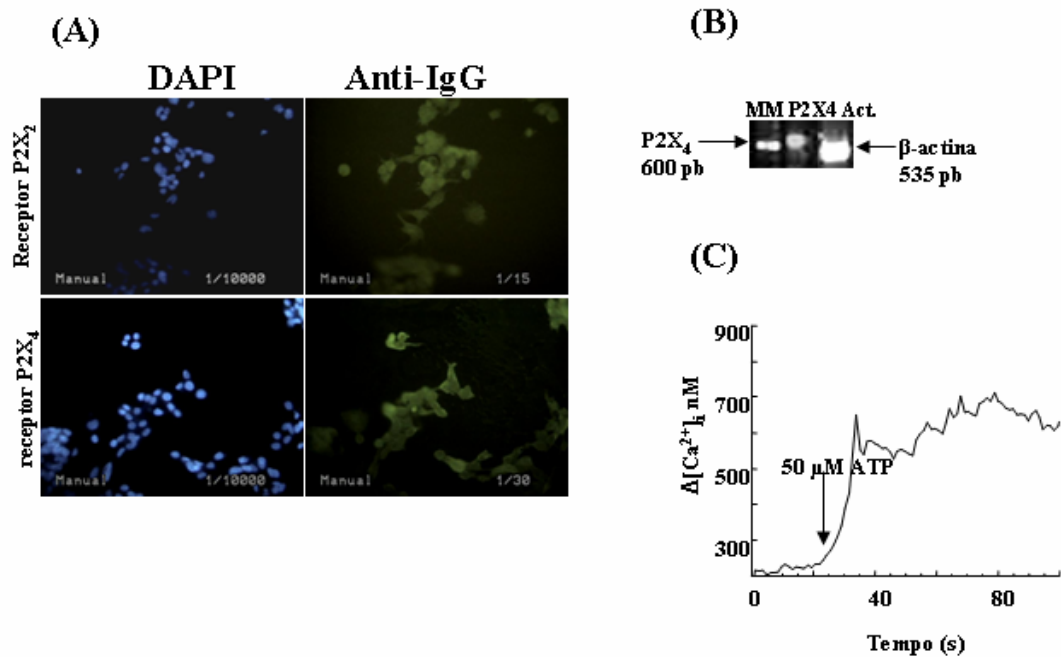


Figura.14. Identificação da expressão gênica, protéica e da atividade dos receptores purinérgicos nas células NH15-CA2. (A) Por imunofluorescência, identificou-se a expressão dos receptores P2X₂ e P2X₄ (anticorpos secundários conjugados a FITC). (B) A expressão gênica dos receptores P2X₂ e P2X₄ foi verificada através de RT-PCR. (C) Medidas de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em fluorímetro após tratamento de $1,5 \times 10^6$ células com Fluo 3AM. A aplicação 50 μ M de ATP resultou em $\Delta[Ca^{2+}]_i$ indicando a atividade de receptores purinérgicos nestas células. Abreviações: MM=marcador de massa molecular, FITC=fluorescência isotiocianato, DAPI=4',6-Diamidino-2-fenilindoleo.

A atividade dos receptores purinérgicos foi identificada em todos os estágios de diferenciação neuronal das células P19 (Fig.15), desde em células P19 pluripotentes indiferenciadas (dia 0), em neurônios dia 8 e em neurônios e glias P19 (dia 11) sob diversas concentração de aplicação de ATP. Após aplicação de 10 e 20 μM de ATP em células indiferenciadas (Fig.15) houve aumento da $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. A aplicação de 50 μM de ATP em neurônios dia 8 surtiu o mesmo efeito. Já em neurônios e glias P19 no dia 11 da diferenciação houve resposta de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ após aplicação de 100 μM de ATP (Fig.15). As células diferenciadas dia 11 responderam com variação de cálcio intracelular mesmo após 200 μM de aplicação de ATP sugerindo que o padrão de expressão dos receptores possa ser variável ao longo do processo.

Para investigar tal fato, foi realizada a análise da expressão gênica por RT-PCR nas células P19 indiferenciadas e de neuronais. Os receptores ionotrópicos P2X₂ e P2X₄ que dentre os demais receptores P2 ionotrópicos resultam em maior influxo de cálcio quando ativados foram identificados nas células P19, contudo nem sempre simultaneamente nos estágios de diferenciação. O receptor P2X₄ foi detectado em todos os estágios celulares da diferenciação celular (Fig.16A e B) com maior expressão no estágio indiferenciado pluripotente. A expressão gênica de outros receptores ionotrópico como P2X₂ e P2X₇ foram detectados apenas em neurônios e precursores glias P19. A expressão gênica do receptor metabotrópico purinérgico P2Y₂ foi identificada em todos os estágios celulares da diferenciação neuronal e o P2Y₆ apenas em neurônios P19.

Tais dados indicam um perfil de expressão de receptores purinérgicos distinta em células indiferenciadas e neurônios P19 (Fig.16A). Conjuntamente, a investigação de subunidades de receptores de NMDA foi investigada e as subunidades do receptor de NMDA N1R e N2D foram detectadas somente nos dias 7 e 8 (Fig.16A). Os dados do aluno de doutorado Rodrigo R. Resende convergiram com tais observações resultando na publicação de um manuscrito pelo nosso grupo resumizando tais dados (Resende e cols., 2007b).

Para avaliar a participação dos receptores purinérgicos no processo de diferenciação neuronal, utilizamos o sistema de diferenciação de células P19 com adição de ligantes purinérgicos em pontos chaves da diferenciação. A finalidade foi de perturbar o sistema em dois estágios definidos, na passagem do estágio pluripotente a

determinação neural aonde ocorre a formação de CE sob ação de *all trans* ácido retinóico e durante a maturação neuronal que se inicia a partir do dia 3 ao dia 8 ou 9.

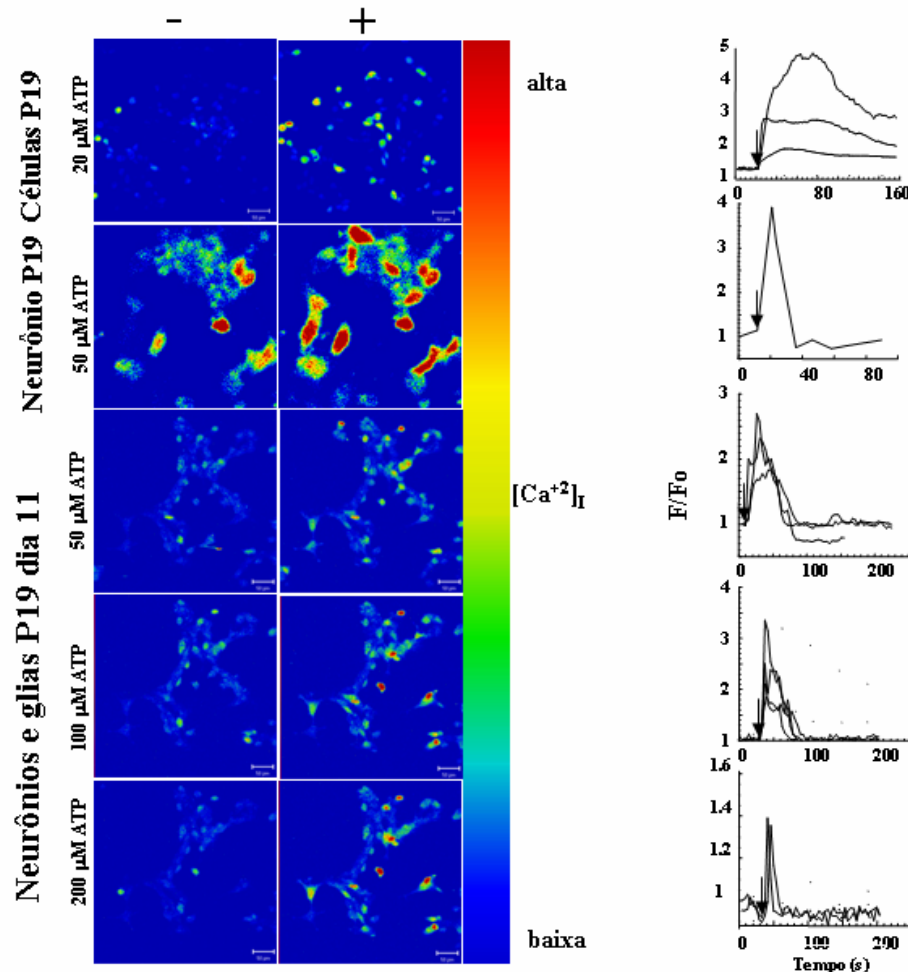


Figura.15. Análise da $(\Delta[Ca^{2+}]_i)$ após aplicação de diferentes concentrações de ATP nas células P19 pluripotentes indiferenciadas, neurônios dia 8 e neurônios e glias P19 no dia 11 da diferenciação. A aplicação de 10 ou 20 μM de ATP resultam em $\Delta[Ca^{2+}]_i$ nas célula indiferenciadas. A aplicação de 50 μM resultou em aumento da $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em neurônios P19. A aplicação de 100 ou 200 μM levaram a $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em neurônios e glias P19 do dia 11. Os traços representam as diferentes células analisadas no campo quanto a Δ de fluorescência. A relação fluorescência/fluorescência mínima (F/F_0) entre os gráficos não pode ser comparada, pois não foram realizadas nas mesmas células. O aumento é de 50 μM . As flechas indicam o momento de aplicação e as curvas correspondem a resposta de uma célula.

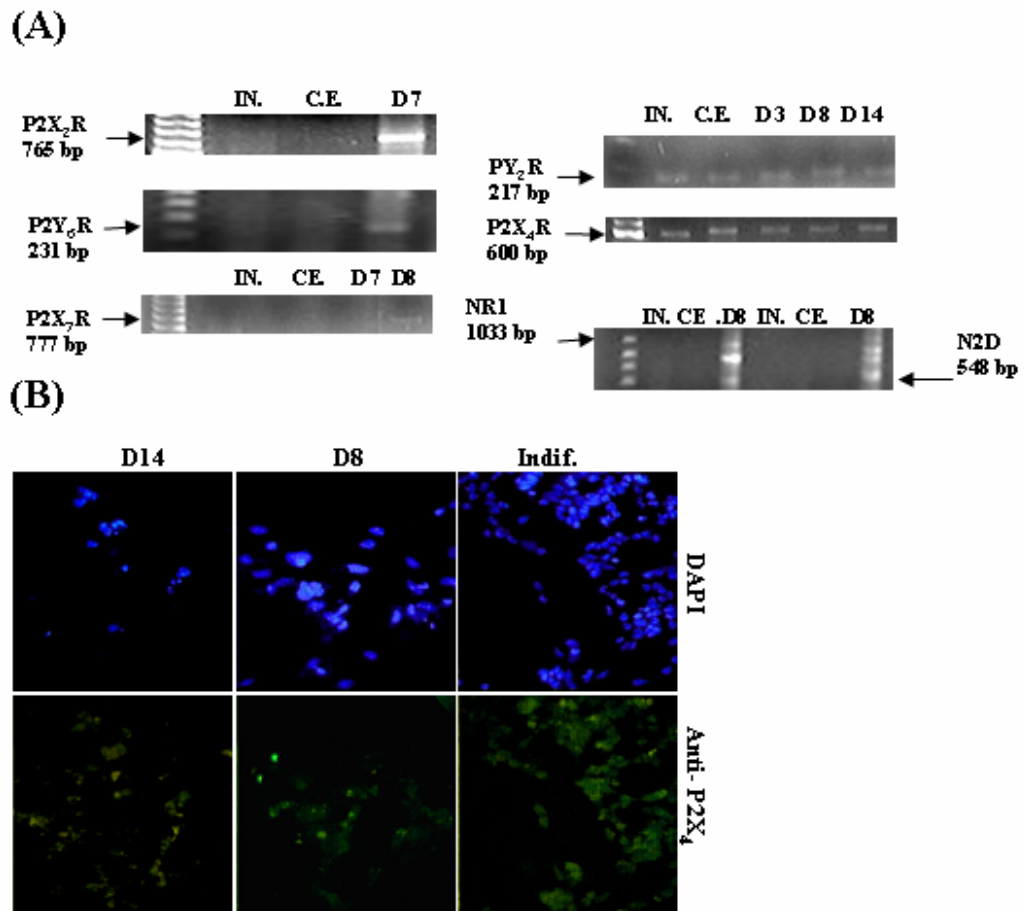


Figura.16. Expressão gênica e proteica de receptores purinérgicos em diferentes estágios celulares de diferenciação neuronal das células P19. (A) Identificação da expressão gênica P2X₂, P2X₄, P2X₇, P2Y₂ e P2Y₆ e das subunidades dos receptores de NMDA NR1 e N2D durante a diferenciação das células P19. O padrão de expressão é distinto nas células indiferenciadas e nos neurônios P19, os receptores P2X₂ e P2X₇ são expressos no dia 8 da diferenciação enquanto que os receptores P2X₄ e P2Y₂ são expressos ao longo do processo. A expressão gênica das subunidades do receptor de NMDA é detectada no dia 7 e 8. (B) Identificação proteica da expressão do receptor P2X₄. Este é amplamente expresso no estágio indiferenciado e sua expressão é reduzida conforme a progressão da diferenciação, contudo não desaparece estando presentes em alguns neurônios P19 (dia 8) e glias e neurônios (dia 14). Abreviações: CE=corpos embriônicos, Indif=células indiferenciadas, DAPI= 4',6-Diamidino-2-fenilindoleo, FITC=fluorescêina isotiocianato

4.4 Efeito da presença de ligantes de receptores purinérgicos sobre os fenótipos neuronais obtidos durante a diferenciação neuronal das células P19.

4.4.1 Efeito de ligantes de receptores purinérgicos na formação de corpos embriônicos

Para compreender a importância dos receptores purinérgicos durante a diferenciação alteramos sua funcionalidade utilizando ligantes destes receptores disponíveis. O bloqueio das oscilações de cálcio livre intracelulares ativados por estes receptores durante a diferenciação poderiam resultar em mudanças fenotípicas celulares nos neurônios originados ou mesmo na alteração da formação dos CE podendo indicar qual a participação destes receptores no processo de diferenciação.

Os tratamentos realizados inicialmente formam na formação de CE pelas células indiferenciadas P19 pluripotentes na presença ou não dos ligantes purinérgicos, de 1 e 100 μM de brilliant blue, 1 e 100 μM de PPADS, 1 μM de reactive-blue-2, 1 e 100 μM de suramina e 1, 25, 100 μM de $\alpha\beta$ -metileno ATP. Os CE resultantes do tratamento foram fotografados e analisados quanto sua distribuição por tamanho. Para avaliar quais os receptores purinérgicos envolvidos, foi utilizado a farmacologia dos receptores (tabela 3) e os dados de expressão completa de todos os receptores purinérgicos P2X e P2Y (tabela 4) elaborado do aluno de doutorado Rodrigo Ribeiro Resende.

Tabela 3: Sumário do padrão farmacológico de agonistas (EC 50%) e antagonistas (IC50%) em micromolar de receptores purinérgicos ionotrófico e metabotrófico descritos na literatura.

Receptores	P2X ₁ rato	P2X ₂ rato	P2X ₃ rato	P2X ₄ rato	P2X ₅ rato	P2X ₆ rato	P2X ₇ rato	P2Y ₁ Rato	P2Y ₂ Humano	P2Y ₄ rato	P2Y ₆ rato
$\alpha\beta$ metileno ATP agonista	1-3	>100	1	>>100	>100	-	>>300	-	-	-	-
Suramina antagonista	1	10	3	>500	4	>100	500	5,5	4,3	10% de inibição em 100	20% de inibição em 100
PPDAS Antagonista	1	1	1	>500	3	>100	50	5,5	30	100	69% de 100
Brilliant Blue Antagonista	>5	1.4	>10	>10	-	-	0,001	-	-	-	-
Reactive blue 2 Antagonista	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	6

Dados obtidos do artigo Khakh e cols., 2001, Von Kugelgen e Wetter. (2000), North e Surprenant (2000). Abreviação: PPADS= piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfônico, os traços referem-se a ligante sem efeito no receptor.

Tabela 4: Expressão de receptores purinérgicos nos diferentes estágios de diferenciação neuronal das células P19.

Estágio celular	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆
P19 Indiferenciada	-	-	X	X	-	-	-	X	X	X	X
Progenitor Neuronal P19 (dia 3 e 4)	-	X	-	X	-	X	-	X	X	X	X
Neurônios P19	X	X	-	X	-	X	-	-	X	-	X

Dados de expressão do aluno de doutorado Rodrigo R. Resende, (X)= presença do receptor nesta fase, (-) = o receptor não é expresso neste estágio de diferenciação.

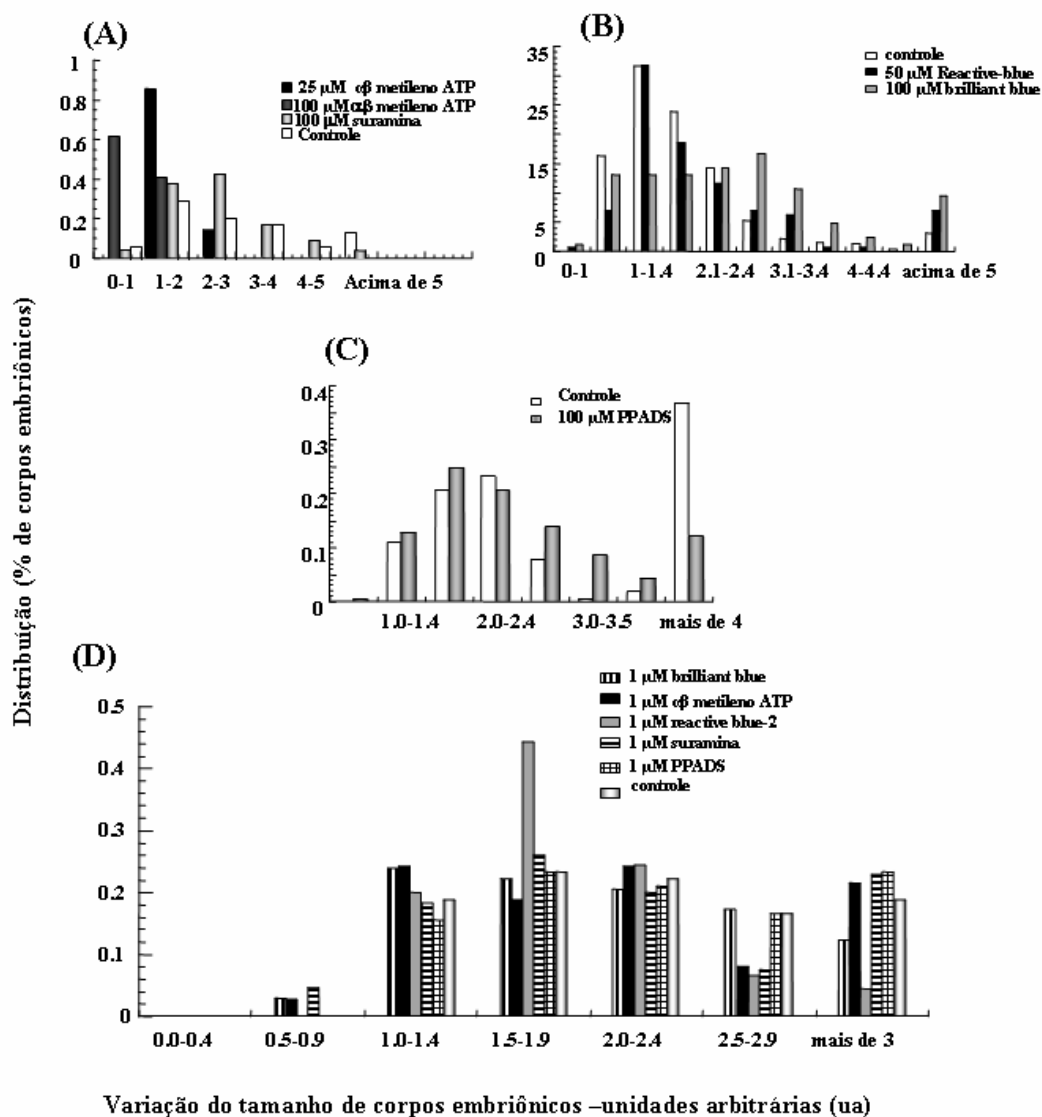


Figura.17. Distribuição do tamanho dos corpos embriônicos (CE) na presença ou ausência de ligantes de receptores purinérgicos em porcentagem total de corpos embriônicos analisados (%). Os ensaios foram realizados na presença de (A) 100 μM de suramina, 25 μM $\alpha\beta$ metileno ATP ou 100 μM $\alpha\beta$ metileno ATP além do controle sem a presença de ligantes, (B) 100 μM de brilliant blue ou 50 μM de reactive blue-2 além do controle, (C) 100 μM de PPADS além do controle, (D) 1 μM de suramina, 1 μM $\alpha\beta$ metileno ATP, 1 μM de PPADS, 1 μM de brilliant blue ou 1 μM de reactive-blue-2 além do controle. Em cada ensaio, foram fotografados e analisados 30-45 campos provenientes de três diferenciações distintas. Abreviações: CE= corpos embriônicos, PPADS= piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfônico.

O sumário dos resultados de distribuição dos CE está resumido na tabela 5.

Tabela 5: Sumário dos dados de distribuição de CE obtidos após o tratamento das células P19 induzidas a diferenciação na presença de ligantes purinérgicos.

Antagonista	tratamento [] μM	Receptores presentes e inibidos o ativados	Receptores presentes e parcialmente inibidos ou ativados	Tamanho de CE Pequenos	em relação Médios	ao controle grandes
suramina	100	P2X ₃ , P2Y ₁ , P2Y ₂ -inibição	P2Y ₄ e P2Y ₆ - inibição	Semelhante ao controle	aumento	redução
suramina	1	-	P2X ₃ , P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ -inibição	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle
Aβ metileno ATP	100	P2X ₃ -ativado, P2X ₄ -inibido	-	Aumento drástico	redução	redução
Aβ metileno ATP	25	P2X ₃ -ativado	P2X ₄ -inibido	Aumento drástico	redução	redução
Aβ metileno ATP	1	P2X ₃ -ativado	-	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle
Reactive blue	50	-	P2Y ₂ , P2Y ₄	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle
Reactive blue	1	-	-	Semelhante ao controle	Aumento	redução
Brilliant blue	100	P2X ₃ , P2X ₄	-	Redução	aumento	Semelhante ao controle
Brilliant blue	1	-	P2X ₃ , P2X ₄	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle
PPADS	100	P2X ₃ , P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄	P2Y ₆	Aumento	Aumento	Redução
PPADS	1	P2X ₃	P2Y ₁	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle	Semelhante ao controle

A adição de suramina na concentração de 100 μM (Fig.17A) levou a redução na formação de CE maiores que 5 unidades arbitrárias (ua) comparado ao controle de 10% para menos de 5% (Fig.17A). Nesta concentração, os receptores P2X₃, P2Y₁ e P2Y₂ estão inibidos. A atividade do receptor P2X₄ não foi alterada contudo, P2Y₄ e P2Y₆ tiveram a atividade parcialmente alterada. Ensaio numa concentração menor de suramina, 1 μM (Fig.17D) resultou em aumento dos CE de 15% para 20% quando comparado ao controle na distribuição de CE maiores que 3 ua. Nesta concentração, houve inibição parcial dos receptores P2X₃, P2Y₁ e P2Y₂. Estes dados sugeriram a participação dos receptores P2Y₁, P2Y₂ e P2X₃ no processo inicial da diferenciação neuronal das células P19.

O efeito mais drástico de redução de CE foi observado com ensaios na presença de $\alpha\beta$ metileno ATP. Na presença de 25 μM (Fig.17A), os CE originados na faixa de 1-2 ua foram aumentaram em 90% comparado ao controle de 30% de CE neste tamanho. Os 10% de CE restantes possuíam de 2-3 ua enquanto que no ensaio controle os CE tinham acima de 5 ua de tamanho. Ensaio na presença de 100 μM $\alpha\beta$ metileno ATP (Fig.17A) resultaram em maior redução do tamanho de CE, 60% dos CE compreendiam a faixa de 0-1 enquanto que no controle, menos de 5% compreendiam esta faixa de tamanho. Os 40% dos CE advindos do ensaio estavam distribuídos entre 1-2 ua. Nas concentrações de $\alpha\beta$ metileno ATP utilizadas, apenas o receptor P2X₃ é ativado, contudo $\alpha\beta$ metileno ATP não ativa o receptor P2X₄, pois é um agonista parcial fraco do receptor de camundongo (Jones e cols., 2000). Realizou-se ensaios com baixas concentrações de $\alpha\beta$ metileno ATP, 1 μM (Fig.17D), não resultou em redução tão drástica de tamanho observado em altas concentrações, inclusive houve ligeiro aumento da porcentagem de CE de maior tamanho maiores de 3 ua, de 15% do controle para quase 20% do ensaio. O receptor P2X₃ também foi ativado nesta e outras concentrações utilizadas de $\alpha\beta$ metileno ATP. Foi possível inferir que houve participação dos receptores P2X₄ quanto a formação e tamanho dos CE após estes tratamentos. Entretanto, os resultados da distribuição de CE nos ensaios na presença de suramina sugeriram a participação de receptores do tipo P2Y no processo, então outros ligantes foram utilizados nos tratamentos como reactive-blue -2, PPADS e brilliant blue-2 (Fig.17B,C e D).

Os ensaios na presença de brilliant blue foram realizados nas concentrações de 1 e 100 μM . Houve aumento do tamanho dos CE na presença de 100 μM deste ligante (Fig.17B) de 5% no controle para 15% da distribuição de CE acima de 5 ua. Houve redução da quantidade de CE de 1-1.4 ua e 1.5-2 ua de respectivamente 35% e 25% no controle para 13% e 13% nos ensaios com o ligante. A distribuição do tamanho do CE na presença de 1 μM de brilliant blue (Fig.17D) foi similar ao controle. Entretanto houve redução do tamanho de CE acima de 3 ua nos ensaios com o ligante de 20% contra 15% no controle. O agonista brilliant blue na concentração de 1 μM (Fig.17B) inibe os receptores P2X₃ e parcialmente o receptor P2X₄ e na concentração de 100 μM em ambos, aonde ocorreu aumento do tamanho de CE. Estes dados sugeriram a participação do receptor P2X₄ e não do receptor P2X₃ na formação e tamanho de CE. Não pudemos identificar ainda o receptor P2Y envolvido no processo utilizando estes ligantes. Os antagonistas PPADS e reactive-blue-2 agem em receptores P2Y.

Na presença de 1 μM de PPADS (Fig.17 D), os CE formados tiveram distribuição de tamanho semelhante ao controle. Na concentração de 100 μM (Fig.17C) de PPADS, houve aumento de 35% em CE acima de 4 ua comparado ao controle de 12%. Este antagonista não atua no receptor P2X₄ nas concentrações utilizadas, contudo o receptor P2X₃ foi inibido em ambas as concentrações e parcialmente P2Y₁. Os receptores P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₄ tiveram sua atividade inibida e o receptor P2Y₆ parcialmente na concentração de 100 μM . Após a análise da distribuição de tamanho de CE entre suramina e PPADS, os resultados sugeriram a participação dos receptores P2Y₄ e P2Y₆ no processo.

O reactive-blue-2 é um antagonista dos receptores metabotrópico purinérgicos essencialmente. Em ensaios utilizando-o na concentração de 1 μM de reactive blue 2 (Fig.17D), o tamanho dos CE acima de 3 ua reduziu de 15% do controle a 5% dos CE resultantes do ensaio. Houve aumento da distribuição de tamanho de 1.5-1.9 ua de 40% para 20% do controle. Em nenhuma concentração de reactive blue-2, receptor P2Y₁ teve sua atividade interferida. A utilização de 50 μM de reactive blue-2 (Fig.17B) levou ao aumento do tamanho dos CE de 3% no controle a 8% no ensaio de CE acima de 5 ua. Nesta concentração, o receptor P2Y₆ está totalmente inibido, P2Y₄ e P2Y₂ estão parcialmente afetados. Sugere-se a participação do receptor P2Y₂ na redução do

tamanho de CE e o receptor P2Y₄ no aumento da distribuição de CE de tamanhos grandes. A análise farmacológica realizada a partir dos dados de expressão (Tabela 4) levou em consideração os dados de expressão dos receptores metabotrópicos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆. O receptor P2Y₁₁ não foi investigado por não termos informações quanto sua expressão. O receptor P2X₄ não têm sua atividade interferida em ensaios com suramina, reactive blue 2 ou PPDAS e ativado por brilliant blue. Ensaios na presença dos antagonistas suramina e reactive blue 2 mostram a participação de receptores P2Y no processo de formação CE na modulação de seu tamanho.

Além deste estágio, os receptores purinérgicos foram investigados na diferenciação neuronal tardia pelo empregados de antagonistas/agonistas dos receptores purinérgicos na concentração de 1 μ M do dia 3 até o dia 8 ou 9 após o plaqueamento de CE em garrafas celulares aderentes.

4.4.2 Efeito da presença de ligantes de receptores purinérgicos sobre a diferenciação final de células P19 em neurônios

A diversidade de expressão dos diversos subtipos de receptores purinérgicos nas células progenitoras neurais P19 (tabela 4 e Fig.16) e a ausência de ligantes seletivos levou-nos a realizar a diferenciação neuronal na presença de diversos ligantes purinérgicos na concentração de 1 μ M a fim de evitar toxicidade celular. Com isso poderia se inferir se há importância na expressão de receptores purinérgicos na maturação neuronal e se atuam de modo determinante e sugerir os subtipos envolvidos no processo. As células foram induzidas a diferenciação neuronal com a formação de CE na presença de ácido retinóico e meio definido. Em seguida, os CE foram plaqueados para adesão em garrafas de cultura celular por 36 horas quando receberam meio definido com adição ou não de 1 μ M do ligante. O meio foi trocado a cada dois dias com nova adição do ligante. No dia 3 as células P19 começam a expressar proteínas neuronais de fase precoce como neurofilamentos de baixo e médio peso molecular (Paterno e cols., 1997, Pyle e cols., 2001). Este período ocorre a maturação neuronal compreende o período do dia 3 ao 7-9. As células receberam os antagonistas ou

agonistas purinérgicos brilliant blue, PPDAS, reactive blue-2 ou suramina. Foram avaliados de atividade dos neurônios advindos destes ensaios a atividade de receptores purinérgicos, de NMDA e de acetilcolina através de medidas de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. Duas horas anteriores aos ensaios, os ligantes foram removidos. As células foram inicialmente foram tratadas com Fluo-3AM por 30 minutos e então foram estimuladas com 50 μM de ATP. Após retirar-se o ligante e aguardar-se 10 minutos, as células novamente estimuladas com 1,5 mM de carbamoilcolina (CCh) ou 100 μM de NMDA. Nestes ensaios foram avaliados a capacidade de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas células nos diferentes tratamentos sob adição de ATP, NMDA ou CCh.

Para avaliar quais os subtipos de receptores envolvidos na maturação neuronal, utilizou-se a tabela 4 que sumariza o padrão de expressão dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos no estágio P19 progenitor neuronal. O padrão de expressão de receptores purinérgicos neste estágio de progenitor neural dia 3-4 é P2X₂, P2X₆, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆. Quanto à inibição farmacológica, utilizou se a tabela 3, a qual sumariza a ativação ou inibição do receptor frente ao ligante. Neurônios provenientes dos diferentes ensaios tiveram $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ avaliados após aplicação de ATP. Nenhum dos ensaios gerou neurônios com deficiência na atividade de receptores purinérgicos (Fig.18A).

Na presença de 1 μM de suramina houve inibição de todos os receptores purinérgicos presentes nas células progenitoras neurais P19 no dia 3 como P2X₂ e P2Y₁ e resultou em células semelhante a neurônios com atividade colinérgica e de NMDA reduzida quanto a $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, quando comparados aos neurônios P19 controle (Fig.18B e C). Já na presença de 1 μM de PPDAS resultou em células morfologicamente semelhantes a neurônios sem atividade de NMDA (Fig.18C), mas com preservação da atividade de receptores colinérgicos (Fig.18B). Este antagonista inibe os receptores P2X₂, P2Y₁ e P2Y₂ presentes nas células progenitoras P19. O tratamento com 1 μM de reactive-blue-2, a atividade colinérgica ou de NMDA não foi afetada (Fig.18B e C). A maturação na presença de 1 μM de brilliant blue resultou menor $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ após aplicação de carbamoilcolina ou de NMDA (Fig.18B e C), semelhante ao tratamento com suramina. Entretanto o receptor inibido neste caso foi somente o receptor P2X₂. A alteração na atividade do receptor P2X₂ tornado o menos ativo com adição dos

antagonistas suramina e PPADS resultou na alteração do fenótipo final celular diferenciado.

Estes resultados indicam que a atividade de receptores purinérgicos é preservada ao longo destes ensaios durante a maturação neuronal (diferenciação do dia 3 a 7) (Fig.18A). Mas os dados de redução de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após aplicação de CCh ou de NMDA sugerem que tais ensaios atuem em diferentes grupos de receptores purinérgicos ativando ou inibindo-os. Pela análise de inibição ou ativação dos receptores presentes nas células progenitoras P19 (Tabela 3 e 4), nossos dados sugerem que os receptores P2X₂ e P2Y₂ estejam envolvidos com a modulação da resposta colinérgica e que os receptores P2X₂ e P2Y₁, com de NMDA nas células originadas após tais ensaios.

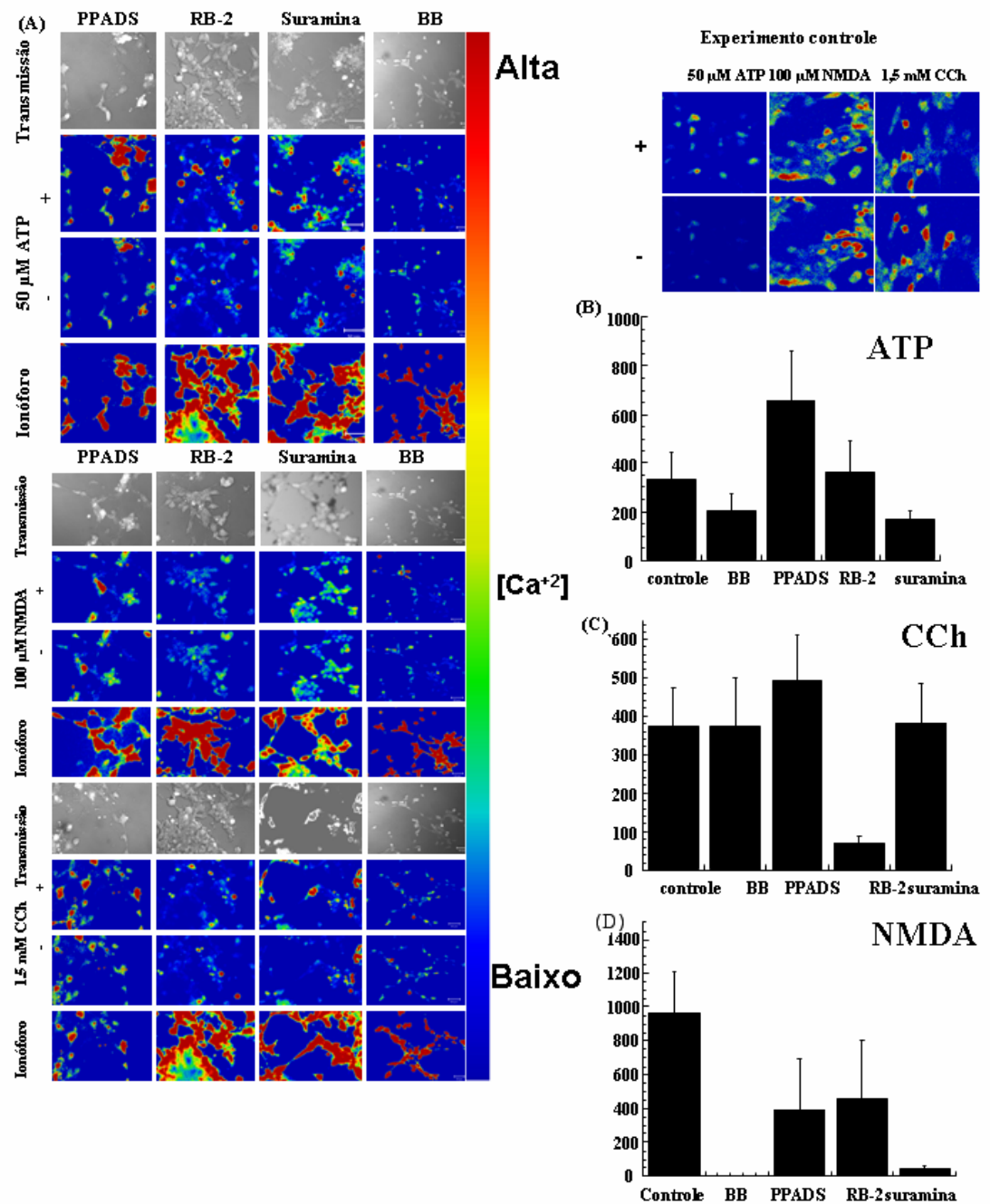


Figura.18. Efeito do pré-tratamento das células progenitoras neurais P19 (dia 3) com ligantes (agonistas/antagonistas) de receptores purinérgicos na maturação neuronal. As células progenitoras neurais P19 (dia 3) receberam os ligantes purinérgicos 1 μ M de Brilliant blue (BB), PPADS, suramina ou reactive-blue-2 (RB-2) que foram mantidos até o dia 8 ou 9 (A). No dia 8, as células foram tratadas com fluo-3 AM e submetidas ao experimento de imageamento de cálcio (*calcium imaging*) com aplicação de 50 μ M ATP (B), 1.5 mM CCh (análogo estável de acetilcolina) (C) ou 100 μ M NMDA (D). Os gráficos se referem a $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após aplicação dos ligantes, com os respectivos desvios padrões. (-) células não estimuladas. (+) estimulação máxima após ativação do receptor na presença do ligante. No fim de cada experimento, foi adicionado o ionóforo para cálculo da variação de cálcio intracelular descrito em 3.2.6. Abreviações: trans.= transmissão, iono=ionóforo, PPADS= piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfônico, Trans=Imagem de transmissão. Figura modificada de Resende e cols., 2007b

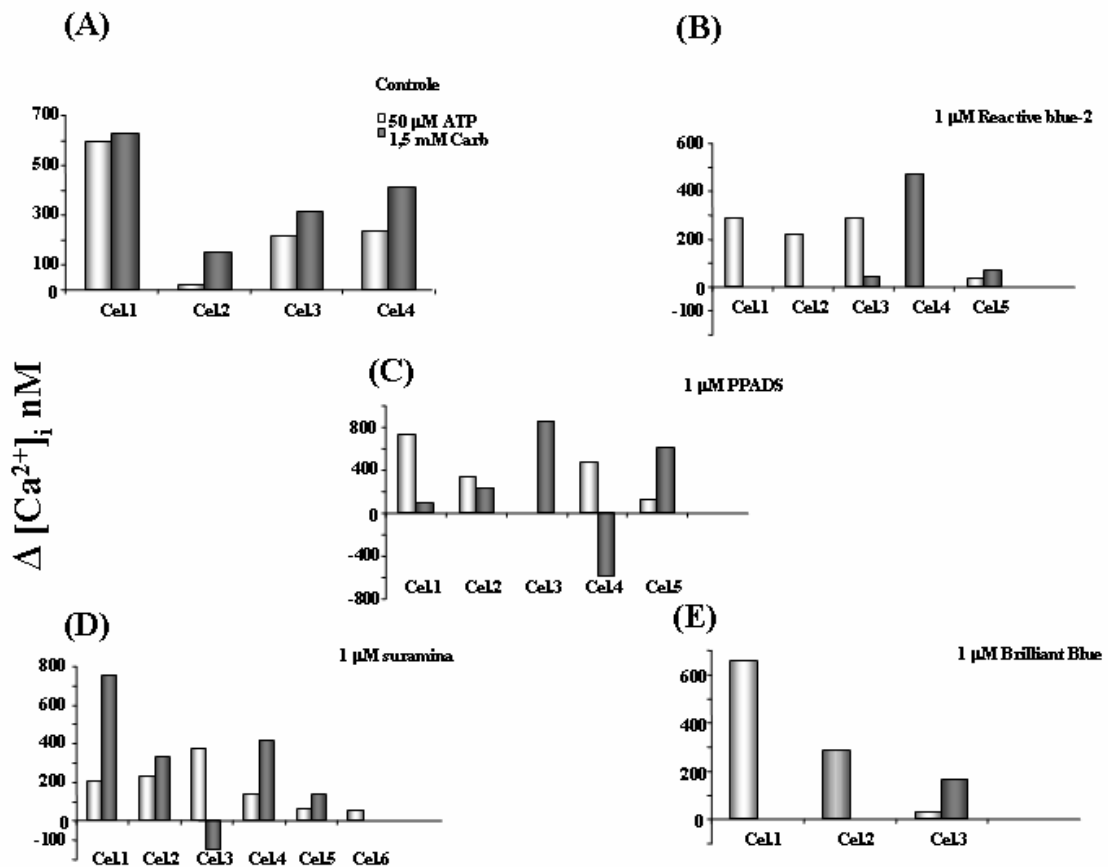


Figura.19. Padrão de atividade dos receptores purinérgicos e colinérgicos de neurônios provenientes de ensaios na presença de ligantes purinérgicos [1 μ M de brilliant blue, PPADS, reactive blue-2 (RB-2), brilliant blue (BB) ou suramina] a partir do estágio de progenitores neurais P19 (dia 3). As barras em cinza escuro referem-se a $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após aplicação de 1,5 mM de CCh e em cinza claro a $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após aplicação de 50 μ M de ATP. A $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após a aplicação de ATP e CCh respectivamente no mesmo neurônio resulta em maior $\Delta[Ca^{2+}]_i$ com a aplicação de CCh que com a aplicação de ATP. Tal fato foi observado em todos os neurônios analisados. Este padrão de atividade de receptores não é observado nas células semelhantes a neurônios P19 advindos do tratamento com (B) RB - 2, (C) PPADS, (D) suramina ou (E) BB.

Dos neurônios originados destes ensaios de maturação neuronal *in vitro*, foram analisados $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ após aplicação de ATP/CCh na mesma célula a fim de compreender a atividade dos receptores purinérgicos e colinérgicos nestas células comparados a controle (Fig.19). Nos neurônios controle, a aplicação consecutiva de ATP e CCh respectivamente num intervalo de 5-10 minutos resultou em maior $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ após estímulo de CCh do que a ATP (Fig.19A). O padrão não se repete nas células provenientes dos ensaios com os ligantes purinérgicos. Algumas células originadas de ensaios na presença de reactive-blue 2 tiveram a resposta a CCh anulada (Fig.19B). Nem todas as células resultantes do ensaio na presença de PPADS apresentam resposta de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ após aplicação de ATP e algumas células tiveram maior $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ na aplicação de ATP que na aplicação de CCh, contrário ao verificado nos neurônios em ensaios controle (Fig.19C). Somente em algumas células diferenciadas na presença de suramina, o padrão do controle (Fig.19A) é identificado (Fig.19D).

Os diversos tipos de neurônios originados após a diferenciação neuronal têm característica colinérgica (Staines e cols., 1994). A análise pareada de resposta a ATP/CCh indica que pode haver um padrão de variação de cálcio intracelular livre nos neurônios formados ligado a atividade dos receptores purinérgicos e colinérgicos, os dados indicam que os tratamentos alteram o padrão de atividade ou até de distribuição de receptores de acetilcolina e ATP levando as células a adquirirem novo fenótipo de atividade de receptores de neurotransmissão (Fig.19).

Alguns dos receptores purinérgicos tiveram a expressão gênica investigada por tais resultados, como P2X₂, P2X₄ e P2X₇ seletivos a entrada de cálcio e o receptor muscarínico M1 muscarínico. O tratamento com reactive-blue 2 resultou em neurônios sem expressão do receptor P2X₂ (Fig.20), em todos os outros ensaios, a expressão gênica dos 4 receptores investigados foi detectada. Uma análise através de PCR em tempo real poderia nos indicar a regulação de expressão gênica envolvida nestes tratamentos.

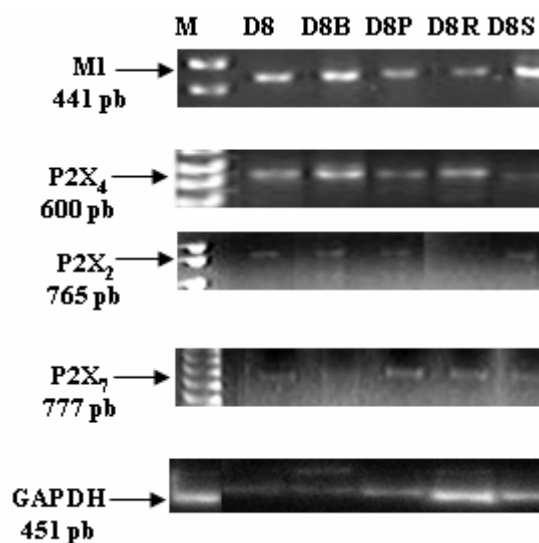


Figura.20. Detecção da expressão gênica dos receptores purinérgicos ionotrópicos cálcio-seletivos P2X₂, P2X₄ e P2X₇ e do receptor muscarínico de acetilcolina M1 nas células provenientes dos diferentes ensaios na presença de ligantes purinérgicos. Todos receptores investigados induzem fluxo de cálcio ou aumentam a concentração de $[Ca^{2+}]_i$ a partir dos estoques intracelulares. Identificou-se a expressão gênica do receptor muscarínico M1 em todos os tratamentos, a expressão da subunidade do receptor P2X₂ não é detectada nos ensaios na presença de reactive-blue-2, GAPDH é o controle da reação. Abreviações: MM= marcador de massa molecular. Os produtos de PCR referentes dos: D8=cDNA de neurônios (dia 8), D8B= cDNA de células (dia 8) advindas de ensaios com brilliant blue, D8P= cDNA de células (dia 8) advindas de ensaios com PPADS, D8R= cDNA de células (dia 8) advindas de ensaios com reactive blue-2, D8S= cDNA de células (dia 8) advindas de ensaios com suramina, PPADS= piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido dissulfônico, M=massa molecular.

A sobreposição farmacológica quanto a inibição ou ativação dos receptores purinérgicos evidenciou-nos da importância de se desenvolver ligantes seletivos aos subtipos purinérgicos os quais podem desvendar a importância de cada subtipo na diferenciação neuronal, tanto na determinação do progenitor neuronal como na passagem fenotípica do progenitor neuronal P19 a neurônios P19.

Devido a tal fato, adotamos a estratégia de selecionar inibidores específicos aos receptores ionotrópicos P2X₂ e P2X₄ os quais induzem transientes de cálcio e se

mostraram importantes no processo da diferenciação *in vitro*. A metodologia SELEX foi utilizada para identificação de aptâmeros de RNA estáveis nucleases resistentes como inibidores subtipo específicos de receptores P2X₂ e P2X₄ para posterior estudo da função destes subtipos na diferenciação neuronal das células PC12 (P2X₂) e na formação do progenitor neural nas células P19 (P2X₄).

4.5 Caracterização das células 1321N1 transfectadas com os receptores P2X₂ e P2X₄ de rato

Para iniciar os procedimentos de SELEX a fim de identificar inibidores específicos com alta afinidade aos receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₄, foi utilizado linhagens imortalizadas de astrocitoma humano 1321N1, as quais previamente haviam sido caracterizadas por não conterem nenhum receptor purinérgico por Parr e cols., (1994) e que foram cedidas pelo Dr. Fernando A. González da University of Puerto Rico (EUA) transfectadas com os receptores P2X₂ (PLSXN-P2X₂), P2X₇ (PLSXN-P2X₇) ou P2X₄ (PLSX-P2X₄) além de células contendo vetor vazio (PLSXN).

As células foram caracterizadas funcionalmente por *calcium imaging*, expressão gênica (RT-PCR utilizando *primers* específicos contra o receptor de rato), expressão protéica (imunofluorescência) e cinética (*patch clamping* em *whole cell recording*) antes do início dos ciclos de seleção reiterativos de SELEX.

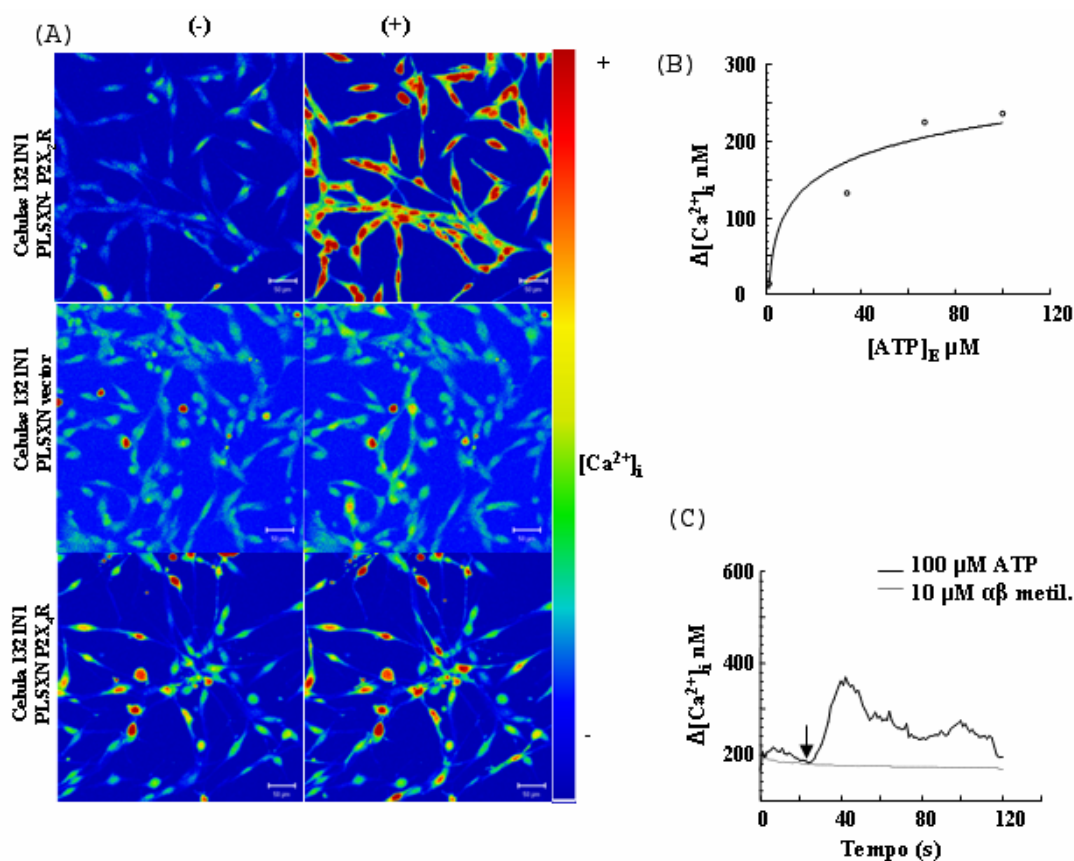


Figura.21. *Calcium imaging* em microscopia confocal das células 1321N1 transfetadas com os receptores P2X₂ ou P2X₄ sob estímulo de ATP. (A) As imagens mostram na (-) ausência ou sob estímulo (+) de 100 μM de ATP nas células PLSXN, PLSXN-P2X₂ ou PLSXN-P2X₄. (B) O gráfico representa $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas diferentes concentrações de ATP ($[\text{ATP}]_e$) nas células transfetadas com o receptor P2X₂. (C) O gráfico representa a resposta de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ a 100 μM ATP e a 10 μM $\alpha\beta$ metileno ATP nas células PLSX-P2X₄. A flecha indica o momento de aplicação do agonista ou antagonista. A imagem corresponde a 50 nm.

Os nossos dados mostraram que o aumento de cálcio intracelular livre foi maior nas células PLSXN-P2X₂R e PLSXN-P2X₄R comparadas ao controle o qual apenas contém o vetor vazio (Fig.21). A adição de 10 μM $\alpha\beta$ metileno ATP nas células PLSXN-P2X₄R não surtiu efeito. Este ligante purinérgico age como antagonista purinérgico no receptor P2X₄ de rato (Jones e cols., 2000). Em seguida, através de RT-PCR com utilização de *primers* específicos identificamos o produto gênico dos receptores transfetados P2X₂ e P2X₄ (Fig.22 e 23) os quais foram seqüenciados e

comparados ao banco de sequências, GenBank, tendo a sequência confirmada. Em seguida, foi detectado a inserção do receptor na membrana plasmática através de ensaios de imunofluorescência (dados não mostrados P2X₄ e Fig.23).

Detectada a atividade, expressão gênica e protéica dos receptores transfectados, iniciamos a realização de ensaios cinéticos e ligação radioligante-receptor para comparação com os dados já descritos na literatura. Por *patch clamping* em configuração em *whole cell recording* foram aplicadas diferentes concentrações de ATP nas células PLSXN-P2X₄ que ativou corrente variando de 200 a 450 pA semelhante a dados apresentados por Jones e cols. (2000) (Fig.22). Ensaios de ligação ATP radioligante receptor P2X₄ mostraram que $\alpha\beta$ metileno ATP desloca ATP do receptor de modo competitivo.

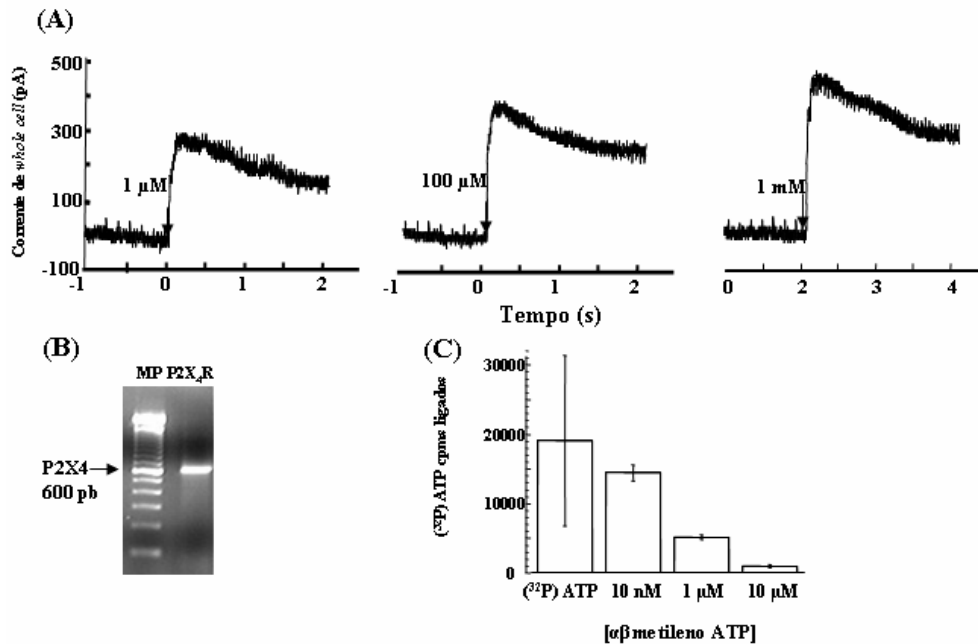


Figura.22. Caracterização do receptor P2X₄ transfetado nas células 1321N1. (A) Através da técnica de *patch clamping* em *whole cell recording*, foram obtidas correntes após aplicação de diversas concentrações de ATP (1 μM, 100 μM e 1 mM). A seta indica o tempo da aplicação do agonista. (B) A expressão gênica do receptor P2X₄ foi identificado nas células 1321N1 por RT-PCR utilizando-se *primers* específicos. (C) Curva de deslocamento do radioligante ATP em concentrações crescentes de αβ metileno ATP.

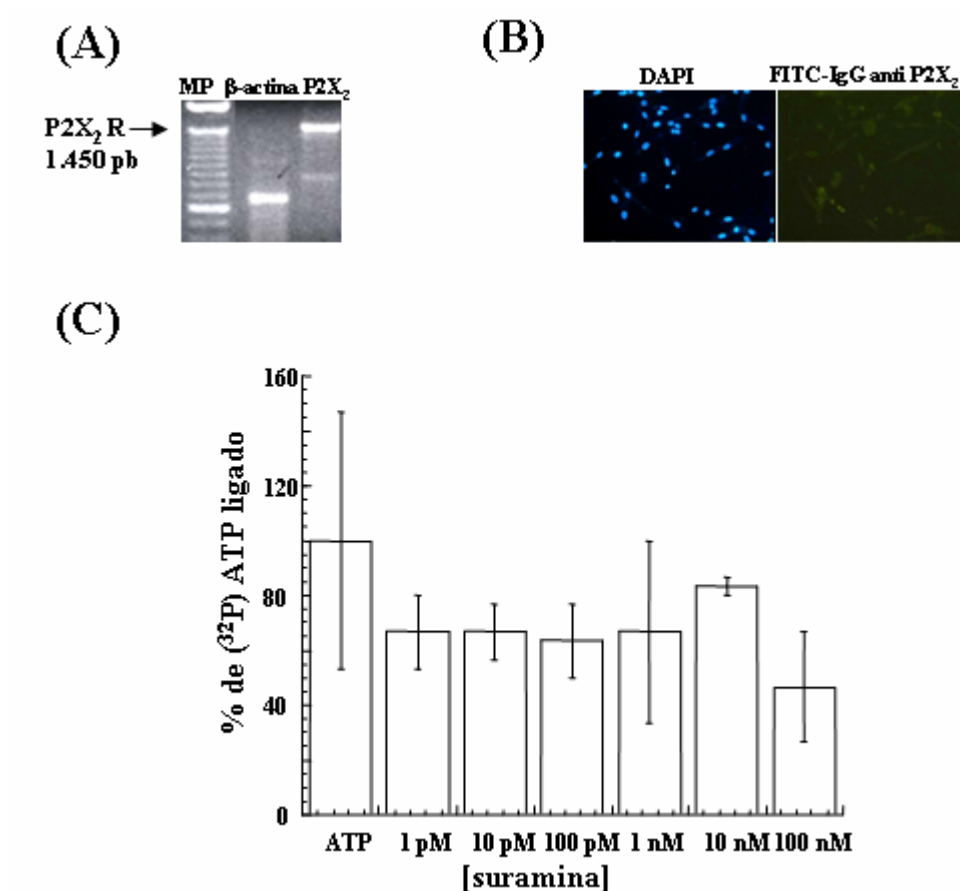


Figura.23. Caracterização células 1321N1 transfetadas com o receptor P2X₂. (A) Através da utilização de *primers* específicos detectou-se o fragmento do receptor de 1.450 pares que foi identificada como do receptor P2X₂. (B) Houve detecção da expressão do receptor P2X₂ por imunofluorescência (anticorpo secundário conjugado com FITC). O material nucléico foi corado com DAPI para visualização da população inteira de células. (C) Ensaio de ligação receptor-radioligante utilizando (³²P) ATP na presença de diferentes concentrações de suramina mostrou que suramina não desloca (³²P) ATP, o ponto de sem suramina equivale a 100% de ligação. O controle com excesso de ATP não marcado deslocou o ATP radiomarcado (controle não mostrado). DAPI= 4',6-Diamidino-2-fenilindoleo, FITC=fluorescência isotiocianato

Ao contrário do receptor P2X₄ que não é inibido por nenhum antagonista purinérgico clássico (suramina ou PPADS), o receptor P2X₂ é inibido por estes (Lynch e cols., 1999; Bo e cols., 1995). A atividade do receptor P2X₂ foi avaliada pelo nosso grupo pelos ensaios de *patch clamping* em *whole cell recording* e se mostrou de acordo com os dados presente na literatura (North, 2002). Testes de ligação radioligante-receptor utilizando diferentes concentrações de suramina e (³²P) ATP mostraram que o agonista ligou-se ao receptor P2X₂, mas que suramina não foi capaz de deslocar o radioligante, sugerindo que a ligação fosse do tipo não competitiva (Fig.23C). O nosso grupo demonstrou através de *patch clamping* em *whole-cell recording* que a natureza da inibição do receptor P2X₂ por suramina como não-competitiva (Trujillo e cols., 2006).

A análise de corrente sob adição de diferentes concentrações de TNP-ATP ao receptor demonstrou que a ligação é do tipo competitiva ao contrário da exercida pela suramina. A suramina atenua a resposta de corrente desencadeada pelo ATP, contudo não altera o EC₅₀ a ativação de ATP de 44,5 ± 1,4 μM quando comparada a somente de ATP de 42 ± 2 μM, dados de acordo com os efeitos de uma inibição não competitiva (Trujillo e cols., 2006) .

Após a caracterização cinética realizada pelo nosso grupo, a escolha de um ligante não competitivo torna-se interessante para ser utilizado como competidor nos ciclos de seleção de SELEX pela possibilidade de selecionar ligantes alostéricos ou que apenas interaja com o receptor protegendo o sítio específico de ligação, aptâmeros semelhantes a identificadas por Hess e cols. (2000) .

Ao receptor P2X₂ foi utilizado suramina (ligante não competitivo) como competidor e ao receptor P2X₄ foi utilizado αβ metileno ATP (ligação competitiva) nos ensaios de radioligante-receptor realizados na técnica SELEX.

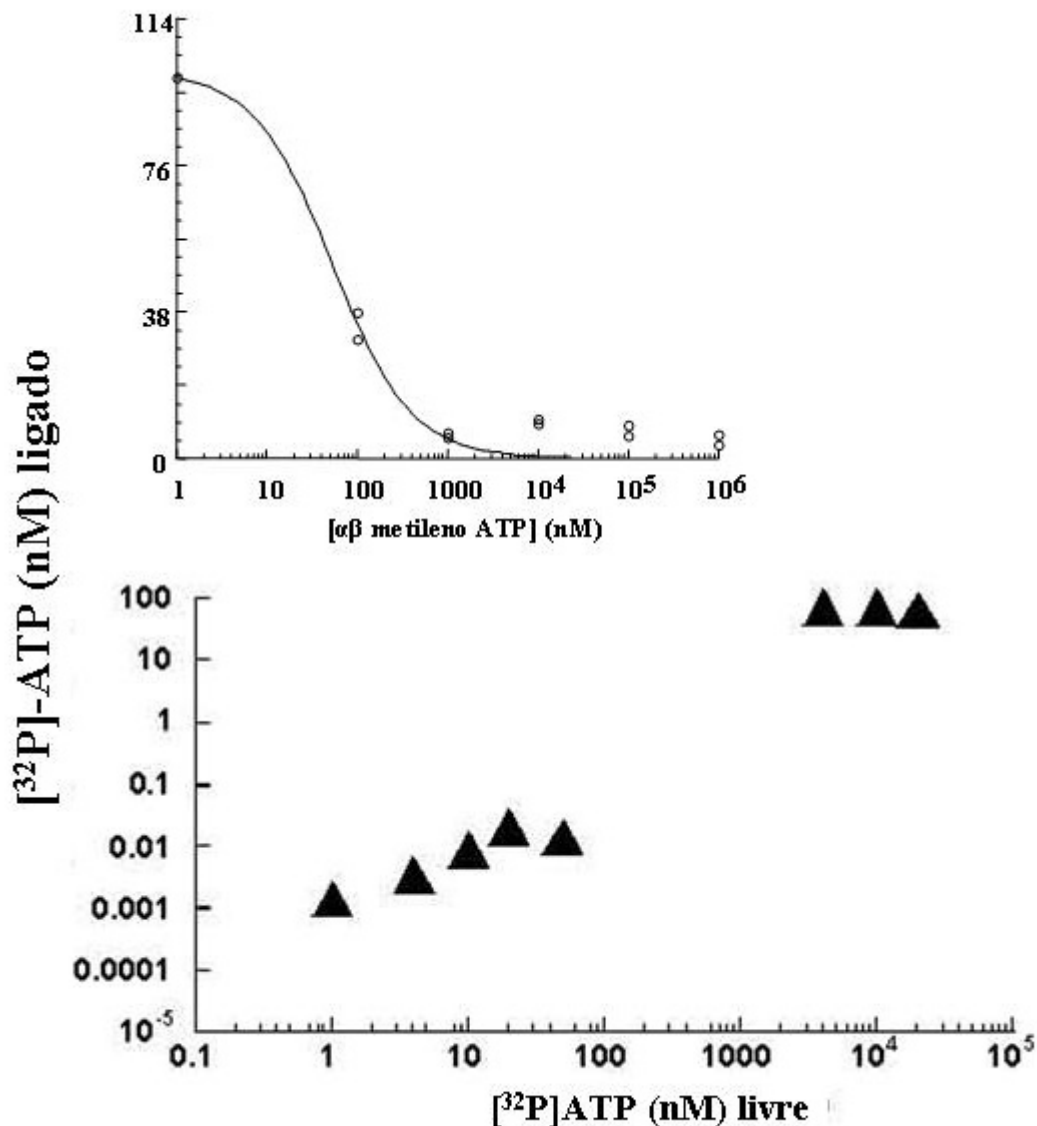


Figura.24. Ensaio de determinação de IC_{50} e de saturação com $^{32}\text{P}\text{-ATP}$ e o receptor P2X_4 . (A) Representado a curva de IC_{50} realizada com o extrato de membrana das células 1321N1-PLSXN- $\text{P2X}_4\text{R}$ na presença de diversas concentrações de $\alpha\beta$ metileno ATP (eixo X) X a quantidade de ATP radiomarcado ligado em cpm (eixo Y). O ajuste foi realizado utilizando a equação: $Y = \text{menor valor de ligação} + (\text{maior valor de ligação} - \text{menor valor de ligação}) / (1 + [\text{ATP}] / \text{IC}_{50})$. Definiu-se 100% o ponto na ausência do competidor $\alpha\beta$ metileno ATP. O IC_{50} determinado foi de 41 nM. (B) O ensaio de saturação foi efetuado com o extrato das células 1321N1 PLSXN- $\text{P2X}_4\text{R}$ na presença do radioligante $^{32}\text{P}\text{-ATP}$ e deste não radiomarcado para redução da atividade específica de ATP.

Realizamos alguns testes para determinar o IC₅₀, a concentração de $\alpha\beta$ metileno ATP necessário para deslocar 50 % do ³²P-ATP ligado ao receptor P2X₄ em extratos de membrana PLSXN-P2X₄R (Fig.24). Nestes experimentos, identificou-se o valor de IC₅₀ como 41,36 nM \pm 5,36 (erro) (Fig.24A). Em seguida, para determinar a concentração aproximada de receptores expressos na membrana foram realizados ensaios de saturação com diferentes concentrações de ATP e do radioligante ³²P-ATP no receptor (Fig.24). A ligação máxima que equivale a concentração de sítios disponíveis de ligação a ATP foi de 120 pmols/ mg de proteína . Os dados obtidos foram semelhante aos da literatura descritos nas células CHO-k1 (Michel e cols, 1997).

4.6 Construção da biblioteca combinatória para o procedimento SELEX

Após a avaliação dos receptores expressos nas células 1321N1, iniciamos a técnica SELEX pela avaliação da qualidade de síntese da biblioteca adquirida através de inicialmente da reação de *primer extension* que consiste na marcação radioativa do *primer* antisenso na sua porção 5' seguida da sua utilização em ciclo único de reação de PCR com um alíquota da biblioteca simples-fita DNA em excesso como molde (Fig.25A). Foi averiguado se ocorre a síntese enzimática da fita complementar e o tamanho da biblioteca é correto. Para este ensaio, foram utilizadas duas bibliotecas de diferentes procedências. A segunda biblioteca mostrou-se adequada a utilização por não conter fragmentos de diversos tamanhos e ausência de arraste (Fig.25A).

Todos os passos do processo de amplificação da biblioteca foram padronizadas para amplificação total da biblioteca para evitar produtos fragmentados ou contactâremos de aptâmeros durante os ciclos de PCR os quais resultam na perda de sequências. As concentrações do molde e temperatura de hibridação dos *primers* foram padronizadas (Fig.25B). A biblioteca simples-fita foi convertida em dupla-fita por ciclo único de PCR e em seguida amplificada por *PCR error-prone* que consiste na utilização de excesso de cloreto de magnésio e cloreto de manganês que resultam na incorporação aleatória de nucleotídeos na porção randômica da biblioteca com intuito de se manter se a diversidade (fig.25C). Após a amplificação da biblioteca, uma pequena porção da biblioteca de cDNA foi submetida à reação de transcrição *in vitro* utilizando-se os

ribonucleotídeos 2'-F'dCTP e 2'-F'dUTP modificados na cadeia de ribose as quais resultam em RNA nuclease resistente, (³²P) α ATP e ribonucleotídeos não modificados de purinas. A reação de transcrição funcionou e o tamanho dos aptâmeros obtidos foi de 90 nucleotídeos conforme o esperado (Fig.25D).

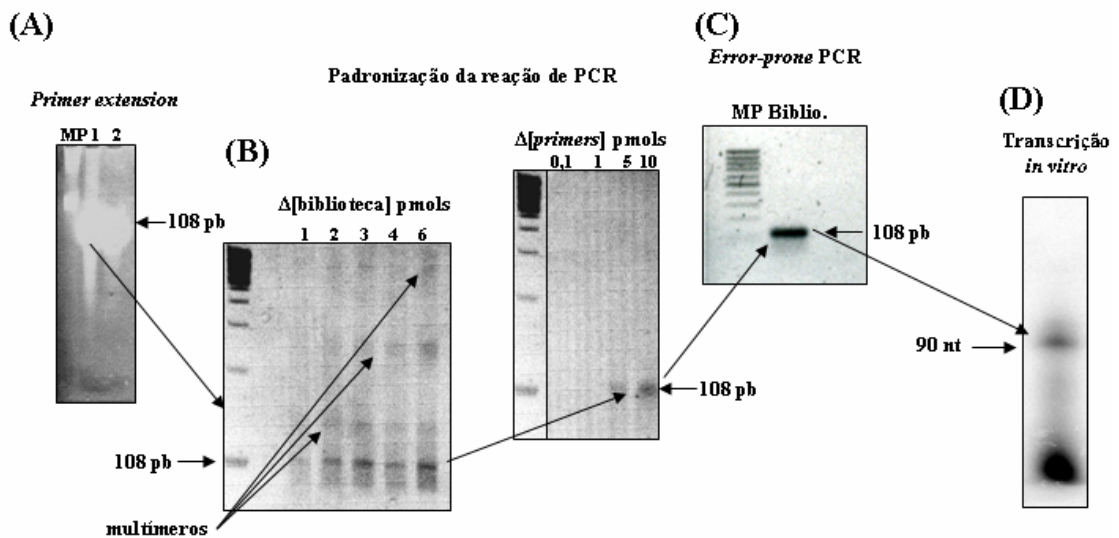


Figura.25. Construção da biblioteca SELEX. (A) O *Primer extension* é o primeiro experimento a ser realizado consistiu na marcação radioativa do *primer* antisenso com γ (^{32}P) ATP na região 5' que foi submetido a eletroforese em gel denaturante 16% (dados não mostrados), em seguida o restante da reação foi utilizado num ciclo de reação único de PCR utilizando a excesso da biblioteca como molde, o produto foi submetido a eletroforese em gel não denaturante 8%. Duas bibliotecas foram testadas e a biblioteca utilizada nos procedimentos posteriores foi a 2 por não conter arraste de DNA. (B) Em seguida, padronizaram-se as condições de PCR variando-se a concentração de molde (1, 2, 3, 4, 6 pmol) e de *primers* utilizados, (0,1; 1; 5; 10 pmols) a fim de evitar formação de concatêmeros ou multímeros (indicados na figura) e produtos de amplificação parcial. Todas as condições utilizadas foram avaliadas em eletroforese em gel não denaturante 8%. (C) Após se fixar a concentração de 6 pmols de molde e 10 pmols de primers e as condições de hibridização dos *primers* de PCR, a biblioteca foi amplificada por *PCR error prone*, como descrito no item 3.2.11.3, e uma alíquota da reação de PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose em TAE 1,5% e identificou-se a banda de 108 pares de base. (D) O material de PCR foi purificado em fenol-clorofórmio, precipitado por etanol e utilizado como molde em reação de transcrição *in vitro* na presença de (^{32}P) α ATP além dos ribonucleotídeos modificados. O produto foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante 8% que foi autorradiografado e digitalizado no aparelho *phosphor image* (Molecular Dynamics). Detectou-se uma banda única de 90 nucleotídeos. Abreviações: massa molecular=MP, Reação de polimerase em cadeia=PCR.

Além da construção da biblioteca, as condições de ensaios de ligação foram padronizadas para serem utilizadas durante os ciclos de SELEX. O extrato de membrana das células 1321N1 P2X₄R foi incubado com (³²P)ATP radioativo (controle) na presença ou ausência de 1 mM de αβ metileno ATP para verificar o deslocamento do radioligante nesta concentração do antagonista (Fig.26A). Em seguida, as condições de lavagem do filtro de nitrocelulose com PBS foram estabelecidas, após o estabelecimento do equilíbrio da ligação entre receptor e os seus ligantes de RNA nucleases resistente. O intuito foi realizar lavagens a fim de manter somente 10% iniciais de moléculas de RNA nucleases resistente adicionados ao experimento no receptor (Fig.26B).

Após ambos os experimentos, realizou-se a incubação do extrato de membrana PLSXN-P2X₄ com (³²P) ATP radiomarcado na presença ou ausência de 1 mM de αβ metileno ATP as quais foram submetidas lavagens com diferentes volumes de PBS. Identificou-se que a incubação com 1 mM de αβ metileno ATP (Fig.26A) com 200 μl de lavagem com PBS satisfatória (Fig.26C). Estas condições foram utilizadas para o procedimento SELEX para seleção de moléculas de RNA nucleases resistentes com afinidade aos receptores P2X₂ e P2X₄.

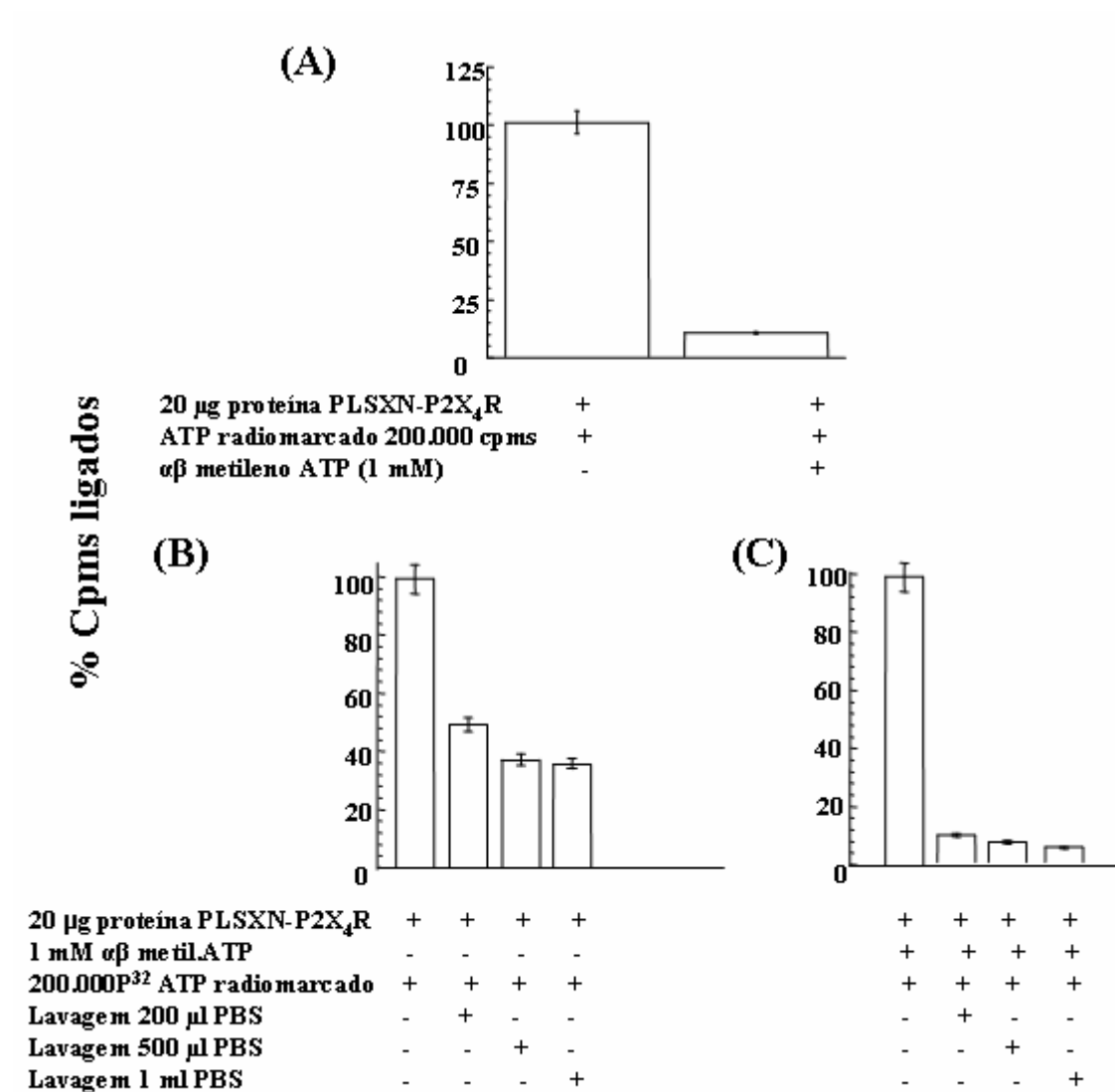


Figura.26. Padronização das condições dos ensaios de seleção *in vitro* de aptâmeros com afinidade a receptores P2X. (A) Padronização das condições dos ensaios radioligante receptor: (³²P) ATP e 1 mM de αβ metileno ATP no extrato de membrana. (A) a incubação com excesso do competidor αβ metileno ATP (1 mM) deslocou o radioligante ATP em 80% em relação ao controles sem competidor . (B) Mostra a fração restante da ligação de ATP radiomarcado após lavagens do extrato de membrana PLSXN-P2X₄ com diferentes volumes de PBS a fim de fixar as condições a serem utilizadas no SELEX. (C) O gráfico mostra a ligação de ATP radiomarcado competido com 1 mM de αβ metileno ATP após diferentes volumes de lavagens com PBS. As condições utilizando 200 µl de lavagem com PBS e 1 mM de αβ metileno ATP mostraram-se satisfatórias.

Para confirmar a randomicidade desta porção (40 nucleotídeos) (Ulrich e cols., 1998), uma alíquota da biblioteca foi clonada e inserida no vetor p-GEM-T de acordo com o item 3.2.12. As sequências foram analisadas segundo a combinação de nucleotídeos o qual mostrou que a biblioteca não é totalmente randômica por conter algumas combinações preferenciais como de TT e outras em menor quantidade como de AG (Fig.27). A biblioteca de cDNA não teve apenas 40 nucleotídeos randômicos, este valor variou de 38 a 47 devido a síntese realizada. A biblioteca amplificada mostrou se parcialmente randômica o que nos permitiu utilizá-la como molde na transcrição *in vitro* para síntese da biblioteca de RNA nuclease resistente (Fig.27).

```

Seq02 5'ACCTGGGGTCAACTCCACGCCGTACAAAATTTTGATTTTT 3' (40)
Seq04 5'GATGTATTCACTAAAAATGTCCTGACACTTTTGCAATCCGT 3' (40)
Seq05 5'TTCTTCGTACATTAACAGAAATCCTGTAATTTCTTACGCCTTGCT 3' (47)
Seq06 5'CACCTGTCTGCACGGCTTTTTCCGACCGTGGTAAATTC 3' (40)
Seq08 5'TTGATTACGCATCGCCTGGTCCGTCTACTTATCTTTTTATA 3' (41)
Seq10 5'CTCCCTATACTAAGTAACGTTAGGTAACAGTGCTGTCTTC 3' (40)
Seq13 5'GTGACCGGGTTTTGTTACGGGCATACTATCTTTTTGAAGGC 3' (41)
Seq14 5'CAAACCCCTCGCGTAAATTTATTAGCAGGTTTATCTT 3' (38)
Seq16 5'ATAACGTATATGATCACTCTCCTCGTCCAACGCTTACCCAC 3' (41)
Seq17 5'GCCTCCACCCACCTCCTGAAAAAGCCGCCAACAGTCTCGT 3' (40)
Seq18 5'ATGCTGACGTACTTCACTTTTCAGCCCTACTTTTACAG 3' (39)
Seq19 5'TTGCGTGTCTTTCCGCCTCCTATGCATAGTTGATGTTT 3' (39)
Seq20 5'CAAACCCCTCGCGTAAATTTATTAGCAGGTTTATCTT 3' (38)
Seq21 5'AATTGCGCATCTGAGGATCCGGTGGTTTTCGCTATGGGCATA 3' (41)
Seq23 5'CTCCGACCACTTCTGAGACCCCTTGTCTCGTACCACTATTG 3' (39)
Seq24 5'TCATGCTCAGACTGCCCGGTGTTCCGACTATATCCACTGCTGCG 3' (43)
Seq26 5'TGGCACTTCCACTTCCCTCCCAACCTCTCGCTTACCAGTT 3' (40)
Seq27 5'CGAGGAGTAGCGGTAAGCCGGTTCCTTAATTTTGTGGT 3' (40)
Seq28 5'ACGGTCCGCATAATTACCTTTTTCATCTAGCACGTCATC 3' (40)
Seq29 5'AACAGGTGAAGATGTGTTTCTACCAACCATTTCGTGCTCTT 3' (40)
Seq30 5'TGTGGCTCTCGGCCTTTTTTACCTATTATCATTGTTCT 3' (39)
Seq31 5'CGAGGAGTAGCGGTAAGCCGGTTCCTTAATTTTGTGGT 3' (39)

```

Figura.27. Análise de randomicidade da biblioteca de SELEX. Foram analisadas 22 sequências quanto ao tamanho, e a distribuição de pares de nucleotídeos: AA-45 (5,1%), AT-52 (5,9%), AC-55 (6,3%), AG-27 (3%), TT-112 (12,8%), TA-59 (6,8%), TC-71 (8,1%), TG-54 (6,2%), CC-65 (7,4%), CA-47 (5,3%), CG-50 (5,7%), CT-76 (8,7%), GG-33 (3,8%), GA-27 (3,1%), GT-57 (6,5%) e GC-44 (5%). O número entre parênteses indica a quantidade de repetição dos di- nucleotídeos presentes na porção randômica.

Após a construção da biblioteca (Fig.25), de padronizar as condições a serem utilizadas durante o SELEX (Fig.25 e 26) e avaliar a randomicidade da biblioteca (Fig.27), iniciamos os ciclos de enriquecimento de RNA aos receptores P2X₂ e P2X₄. A biblioteca de cDNA foi utilizada como molde para a transcrição *in vitro* de RNA nucleasa resistente utilizando os ribonucleotídeos modificados 2'-F'dCTP e 2'-F'dUTP e ribonucleotídeos ATP e GTP. O produto da reação foi purificado e quantificado. As moléculas de RNA ligadas ao extrato de membrana foram recuperadas do filtro de nitrocelulose após lavagem para retirar as ligações não específicas. O material foi incubado com excesso do competidor 1 mM de suramina ou $\alpha\beta$ metileno ATP e foi mantido sob agitação contínua por vinte minutos em temperatura ambiente. As moléculas ligadas ao sítio alvo do competidor ou próximas a este foram deslocadas, eluídas e purificadas por extração fenol-clorofórmio e precipitadas com etanol. O RNA resistente à nucleases recuperado foi ressuscitado em água e usado como molde para síntese de cDNA e amplificado por PCR. O produto de PCR foi utilizado como molde para nova transcrição *in vitro* para início de novo ciclo de seleção (Fig.7)

4.7 Seleção de antagonistas específicos utilizando SELEX

Durante o processo de seleção foram realizados ensaios para avaliar o enriquecimento de moléculas de RNA ciclo a ciclo com afinidade aos receptores P2X₂ ou P2X₄ durante os ciclos de SELEX através de experimentos de ligação radioligante-receptor ou *gel shift*. Para padronizar tal ensaio, ao extrato de membrana das células 1321N1 PLSXN P2X₄ foi adicionado (³²P) ATP na presença ou ausência de $\alpha\beta$ metileno ATP que em seguida foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 3% (item 3.2.13.1). Na ausência de $\alpha\beta$ metileno ATP, o radioligante reconheceu o extrato membranar (Fig.28A). Após o terceiro ciclo de seleção, o extrato de membrana celular PLSXN P2X₄R foi incubada com o RNA resistente à nucleases radiomarcado com (³²P) ATP (ciclo 3) na presença e na ausência de tripsina. Ambas as reações foram submetidas a eletroforese em gel. O RNA radiomarcado ligou-se a membrana que continha proteínas íntegras e parcialmente digeridas pela tripsina, demonstrando enriquecimento de sequências (Fig.28B).

Moléculas de RNA resistente à nuclease selecionadas ao receptor P2X₂ durante SELEX foram avaliadas por *patch clamping* em *whole cell recording* e por testes de ligação radioligante-receptor. O RNA resistente à nucleases P2X₂ do ciclo 0 (³²P) foi incubado com células 1321N1 PLSXN ou PLSXN- P2X₂R na presença e na ausência de 1 mM de suramina para determinação da ligação específica ao receptor. Observou-se que a suramina não competiu com a biblioteca inicial de moléculas de RNA radiomarcadas e houve radioligação em ambas as células nas duas condições (Fig.29A e B). Contudo, após o segundo ciclo, o RNA resistente à nuclease ciclo 2 (³²P) foi incubada com as células PLSXN P2X₂R na presença ou ausência de suramina. O ensaio de radioligante-receptor mostrou que 66% das moléculas de RNA da biblioteca ciclo 2 P2X₂ foram deslocadas na presença de excesso molar de suramina. Tais dados indicaram o enriquecimento de moléculas de RNA ao sítio de ligação a suramina presente ao receptor (Fig.29C). Avaliações funcionais de atividade foram realizadas *patch clamping* em *whole cell recording* após 5 ciclos mostraram que a co-aplicação de 1 μM de RNA associado a 100 μM de ATP promoveu 35% de inibição corrente induzida somente pelo ATP (controle) (Fig.29D).

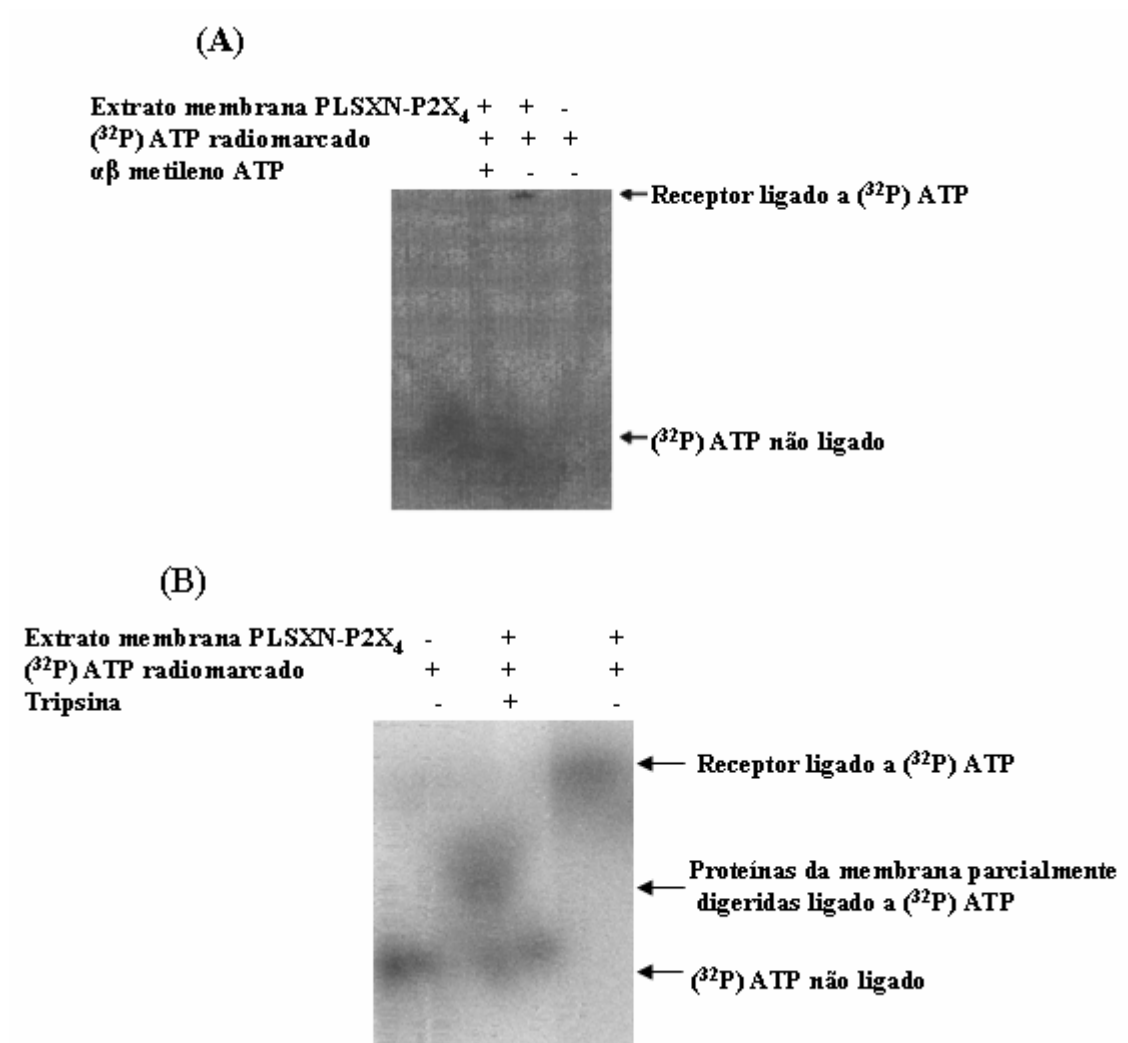


Figura.28. Experimentos de *gel shift* para verificação da ligação de (³²P) ATP ou (³²P) RNA do ciclo 0 ou 3 P2X₄ ao extrato de membrana PLSXN-P2X₄. (A) Ligação de (³²P) ATP: neste experimento, αβ metileno ATP em excesso não permitiu a ligação de (³²P)ATP ao receptor contudo na ausência deste, o ATP radiomarcado ligou-se ao extrato de membrana. (B) Ligação do (³²P) RNA selecionado (ciclo 3 P2X₄) foi incubada com extrato de membrana PLSXN P2X₄R na presença ou ausência de tripsina. Constatou-se que as moléculas de RNA selecionados ligaram-se ao extrato de membrana PLSXN-P2X₄.

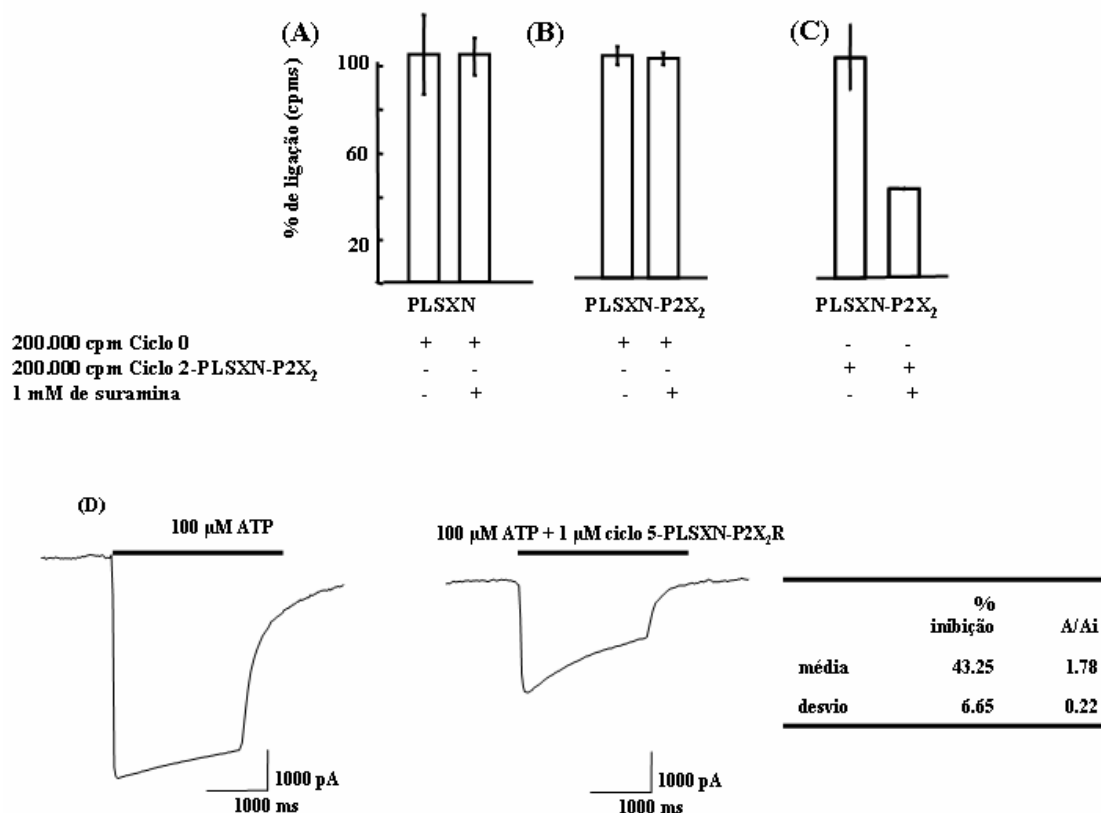


Figura.29 Enriquecimento de moléculas de RNA resistente à nucleases inibidoras da atividade do receptor P2X₂ avaliados por ensaios de ligação e *patch clamping* em *whole cell recording*. Ensaios de ligação utilizando células 1321N1 PLSXN (A) e 1321N1 PLSXN P2X₂ (B) que foram incubadas com a ³²P RNA (ciclo 0) na ausência de excesso molar de suramina. Não houve deslocamento da biblioteca radiomarcada na presença de suramina nas células. (C) Ensaios de ligação entre (³²P) RNA (ciclo 2-P2X₂) com células PLSXN P2X₂ na presença ou na ausência de suramina. Suramina deslocou 60% da ligação dos (³²P) RNAs do receptor. (D) Medidas *whole cell recording* com aplicação de somente 100 μM de ATP (controle) e com co-aplicação de 100 μM de ATP+ 1 μM de RNA (ciclo 5 P2X₂R) mostraram que houve inibição de 35% da corrente induzida por ATP com a co-aplicação quando comparada ao controle. Além das moléculas de RNA reconhecerem o sítio de suramina, levam a redução de corrente ativada por ATP. As medidas de *patch clamping* foram realizadas com voltagem transmembrânica fixa de -60 mV em pH=7,4.

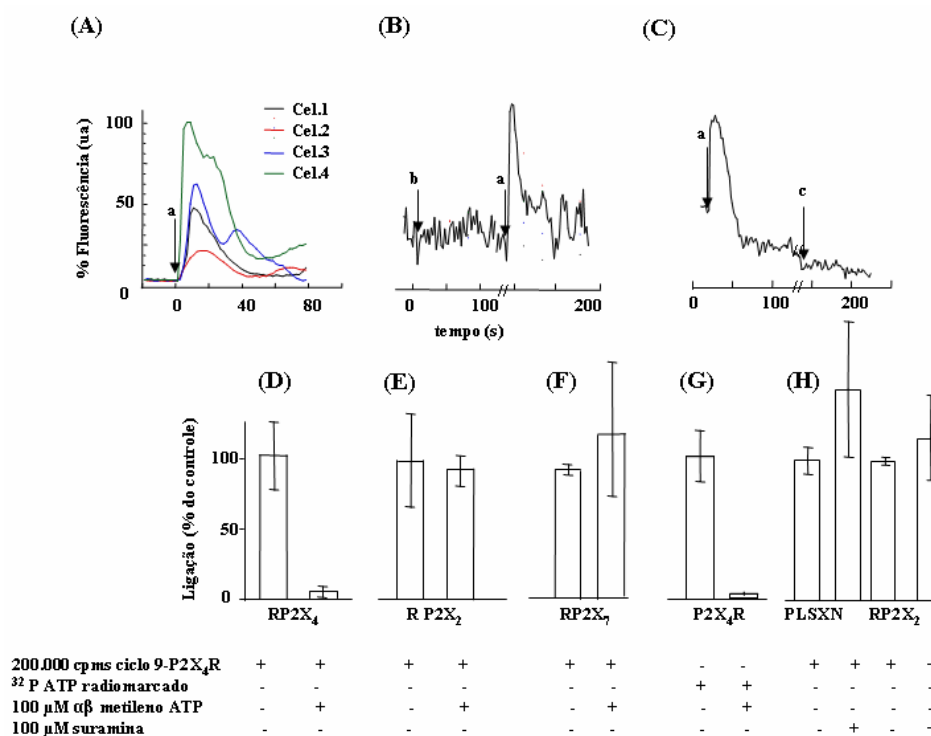


Figura.30 Análise de ligação específica e atividade das moléculas de RNA resistentes à nucleases selecionadas ao receptor P2X₄. Medições de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em (A, B e C): (A) A análise de variação de fluorescência de fluo-3 (ΔF) após aplicação de 100 μM ATP (a) nas células 1321N1 PLSXN- P2X₄R (cada traço indica uma célula). (B) 250 nM de RNA (ciclo 5 P2X₄) (b) seguida da aplicação de (a) e da co-aplicação de ATP e 250 nM RNA (ciclo 5). Não houve ΔF após aplicação da biblioteca de RNA ciclo 5 e em seguida houve variação aplicação de ATP evidenciando a viabilidade celular e a ligação reversível do RNA. (C) ΔF após aplicação de 100 μM de ATP(a) seguida após 5 minutos da co-aplicação de 250 nM de RNA (ciclo 5 P2X₄) + 100 μM de ATP. A co-aplicação de ATP + RNA não induz resposta de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ sugerindo que a biblioteca foi enriquecida com sequências de RNA com característica inibitória. (D) Testes de ligação radioligante-receptor incubando células 1321N1 PLSXN, PLSXN P2X₂R, PLSXN P2X₄R e PLSXN P2X₇R com (³²P) RNA ciclo 9 P2X₄SELEX RNA na presença ou ausência de 100 μM de $\alpha\beta$ metileno ATP ou 100 μM suramina. Houve deslocamento da ligação de (³²P) RNA pelo $\alpha\beta$ metileno ATP nas células 1321N1PLSXN P2X₄R de modo semelhante a da biblioteca de RNA radiomarcado ciclo 9 (G), contudo tal efeito não foi verificado utilizando células 1321N1 PLSXN P2X₂R (E) ou 1321N1 P2X₇R (F) e a biblioteca de RNA ciclo 9 P2X₄. (H) Determinação da ligação de (³²P) RNA (ciclo 9 P2X₄R) em células PLSXN ou PLSXN-P2X₂ na presença ou ausência de suramina como competidor. Suramina não foi capaz de deslocar o (³²P) RNA dos sítio de ligação do receptor, o que evidencia a especificidade de ligação do RNA selecionado ao sítio de $\alpha\beta$ metileno ATP presente no receptor P2X₄.

Mesmo utilizando $\alpha\beta$ metileno ATP nos ciclos de seleção como competidor, não se sabia a natureza da interação do RNA resistente à nuclease, pois mesmo que $\alpha\beta$ metileno ATP se ligue de modo competitivo a ATP, não é capaz de ativar o receptor de rato. A princípio é possível selecionar aptâmeros com atividade inibitória, de ativação ou mesmo sem nenhum efeito sobre o sítio de ativação do receptor. Além disso, é possível obter aptâmeros com efeitos alostéricos positivos ou negativos (Ulrich e Gameiro, 2001).

A aplicação de ATP resultou em $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ nestas células (Fig.30A). A possibilidade da ativação do receptor na presença de RNA resistente à nuclease ciclo 5 P2X₄ foi verificada após a aplicação de 250 nM entretanato não surtiu efeito (Fig.30B). O efeito da aplicação do RNA somente foi verificado após aplicação de 100 μM de ATP. A co-aplicação de 100 μM de ATP resultou em $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ e após 5 minutos, a aplicação de 250 nM de RNA resistente à nuclease ciclo 5 P2X₄R + 100 μM de ATP não surtiu efeito. Os aptâmeros inibiram a resposta ativada pela aplicação de ATP (Fig.30C). Tais dados são qualitativos e para avaliação quantitativa de inibição desencadeada pela co-aplicação foram realizados *patch clamping* em *whole cell recording*.

Ensaio de ligação radioligante-receptor para estudar a ligação do (³²P) RNA s resistente a nucleases ciclo 9-P2X₄R ao receptor P2X₄ (Fig.30 D-H) mostrou que o (³²P) RNA do ciclo 9-P2X₄R não foi deslocado pela suramina nas células 1321N1-PLSXN ou PLSXN-P2X₂ (Fig.31H). Houve entretanto o deslocamento de (³²P) RNA ciclo 9-P2X₄ ligado ao receptor P2X₄ na presença de excesso de $\alpha\beta$ metileno ATP, semelhante aos testes ligação radioligante-receptor entre (³²P) ATP e excesso de $\alpha\beta$ metileno ATP (Fig.30D e G). $\alpha\beta$ metileno ATP liga-se aos receptores P2X₂ e a P2X₇ (Fig.30 E e F), contudo o RNA selecionado é capaz de discernir entre os receptores P2X₂, P2X₇ e P2X₄ sendo somente deslocado por excesso molar de $\alpha\beta$ metileno ATP nos experimentos como receptor P2X₄ (Fig.30D) (North, 2000).

Para avaliação final do enriquecimento de moléculas ligantes ao receptor, ensaios de *gel shift* foram realizados com incubação do (³²P) RNA resistente a nucleases de diversos ciclos de SELEX com extratos de membrana das células 1321N1

PLSXN, PLSX-P2X₂R e PLSXN-P2X₄R na concentração de 20 µg, procedimento descrito no item 3.2.13.1 (Fig.31A). O complexo foi submetido à eletroforese em gel não denaturante 3%.

Os complexos proteína-³²P-RNA ou somente ³²P-RNA retidos no gel foram quantificadas utilizando o programa IMAGE J. Houve aumento da ligação ³²P-RNA - proteína nos ciclos finais nos extratos de membrana com P2X₂ ou P2X₄. Resultado contrário foi obtido quando a incubação foi realizada somente o extrato de membrana contendo o vetor vazio, sem o receptor (Fig.31B). Os ciclos iniciais de SELEX contêm espécies de RNA que se ligam a outras proteínas presentes no extrato de membrana, outras proteínas além do receptor, tal ligação não é verificado utilizando ciclos mais avançados de seleção (ciclo 6 e 8) (Fig.31B).

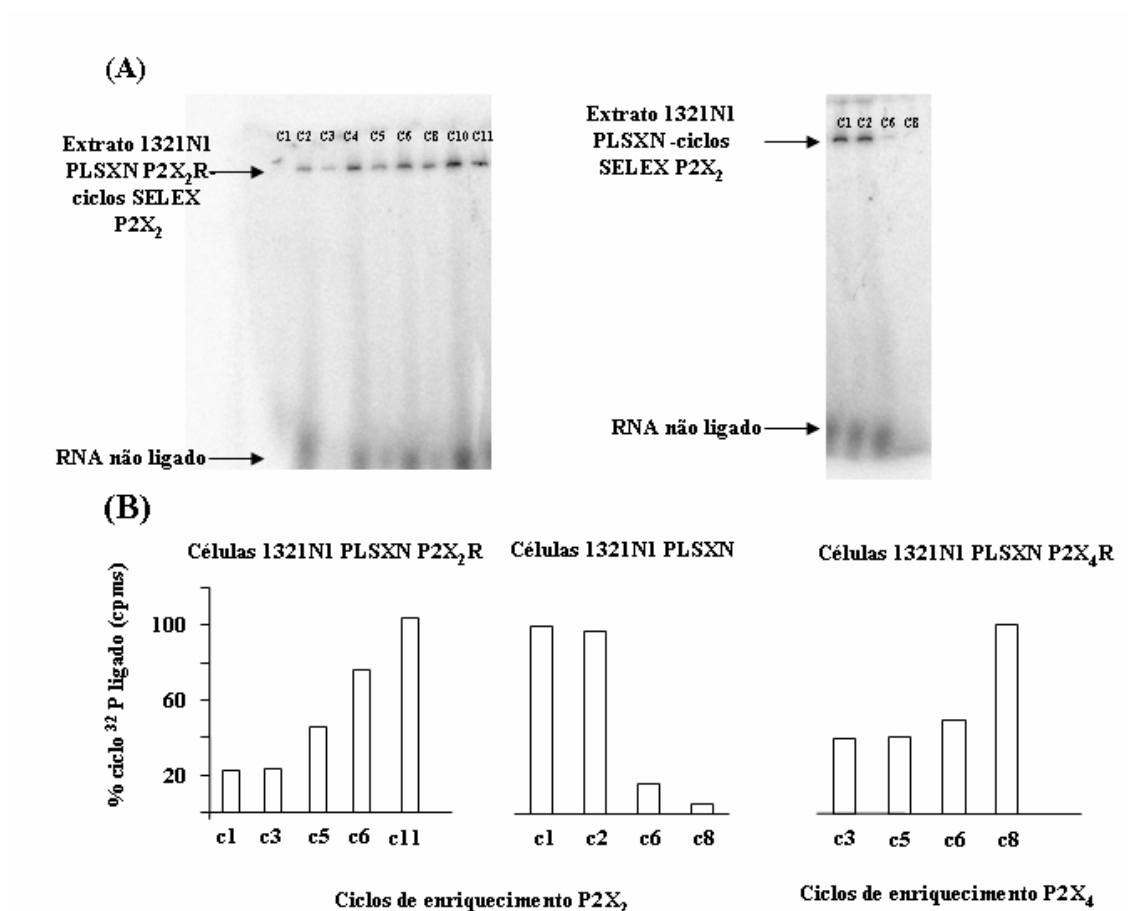


Figura 31: Avaliação do enriquecimento de moléculas de RNA ligantes aos receptores P2X₂ ou P2X₄ através de *gel shift*. Os extratos membrana-protéicos das células 1321NI PLSXN, PLSXN P2X₂R e PLSXN P2X₄R foram incubados com (³²P) RNA resistentes a nucleases dos ciclos 1-11 SELEX P2X₂ ou dos ciclos 1-9 SELEX P2X₄. (A) A imagem a esquerda mostra a ligação das moléculas de (³²P) RNA ao extrato contendo o receptor P2X₂, já a imagem a direita, a incubação mostrada é com a membrana de células transfectadas somente com o vetor e os ciclos 6 e 8 e houve redução de ligação na incubação com ciclos avançados. (B) O gráfico a esquerda: densitometria da ligação (³²P) RNA P2X₂ ao extrato de membrana P2X₂. O gráfico ao centro mostra a quantificação da ligação do (³²P) RNA dos ciclos 1, 2, 6, e 8 ao extrato de proteína- membrana das células contendo o vetor vazio. O gráfico a direita representa a ligação de moléculas (³²P) RNA dos ciclos contra o receptor P2X₄ a membrana contendo o receptor P2X₄.

4.8 Avaliação da atividade dos aptâmeros selecionados contra os receptores P2X₂ e P2X₄

Após constatar enriquecimento de moléculas de RNA resistentes a nucleases após 9 ciclos de seleção de SELEX, ao sítio de ligação de suramina ou $\alpha\beta$ metileno ATP nos receptores P2X₄ e P2X₂ (Fig.30A), o último ciclo de cada seleção foi utilizado para clonagem e em ensaios funcionais. Para avaliar o tipo de interação que o RNA ciclo 9 P2X₄ exerce sobre o receptor, foram realizados ensaios de *patch clamping* em *whole cell recording*. Dados de testes funcionais utilizando o ciclo 5 de cada seleção indicaram o enriquecimento de sequências com atividade inibitória (Fig.30B e C).

Nos ensaios de *patch clamping*, a célula transfectada com o receptor recebeu inicialmente 100 μ M de ATP e após 5 minutos, recebeu a co-aplicação de 100 μ M de ATP + 1 μ M de RNA ciclo 9 SELEX P2X₄R. Comparando corrente induzida pela aplicação de ATP e da co-aplicação, detectou-se redução da corrente ativada pela aplicação de somente ATP em até 88% (Fig.32A e B). A aplicação em seguida de ATP, mostrou que a corrente induzida pelo agonista reestabeleceu-se.

A inibição da corrente foi maior, quando alicou-se uma menor concentração de ATP (100 μ M) como esperada na inibição do tipo competitiva. O aumento da concentração de ATP em 500 μ M e co-aplicação 5 μ M ciclo 9 SELEX P2X₄R + 500 μ M, surtiu o mesmo efeito de inibição (Fig.32A e B). Estes dados confirmaram o enriquecimento de sequências de RNA resistente a nucleases com atividade inibitória sobre o receptor P2X₄ durante os ciclos de enriquecimento.

O RNA do ciclo 9-P2X₄ foi testada nas células 1321N1-PLSXN-P2X₂. $\alpha\beta$ metileno ATP liga-se também ao receptor P2X₂. Após aplicação inicial de 500 μ M de ATP, houve uma pausa de 5 minutos para permitir a ressensibilização do receptor e em seguida co-aplicou-se 500 μ M ATP + 5 μ M ciclo 9 P2X₄R. Os dados de corrente induzida pelo ATP indicaram que não houve diferença quanto as correntes obtidas nas duas condições (Fig.32 C e D). Tais resultados indicaram que as moléculas de RNA selecionados somente reconhecem o receptor P2X₄. Os testes de ligação radioligante-receptor de (³²P) RNA ciclo 9 sugeriam tal seletividade de ligação ao receptor P2X₄ e não P2X₂ ou P2X₇ (Fig.30 D).

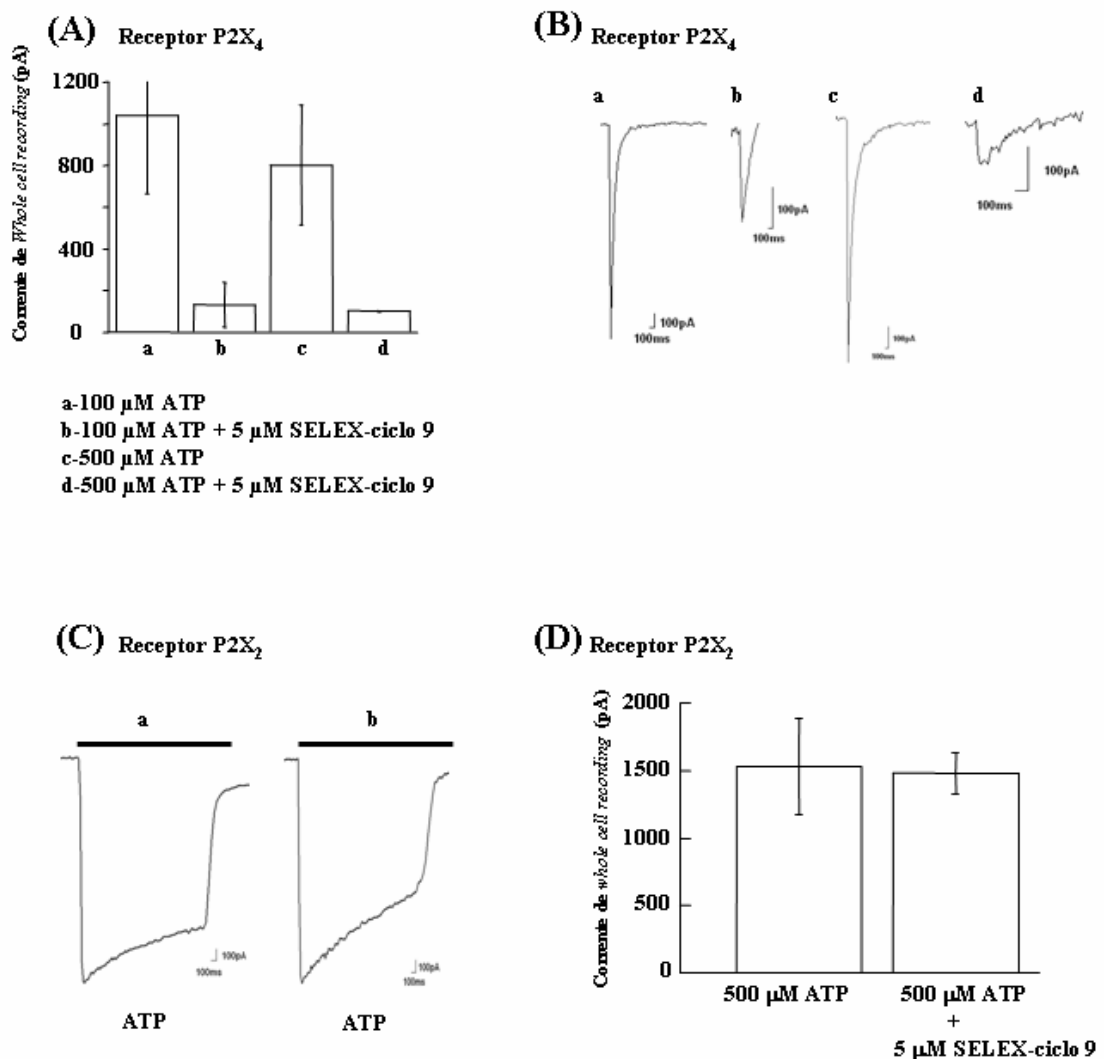


Figura.32. Efeito da co-aplicação de RNA resistente a nucleases do ciclo 9- P2X₄R + ATP sobre a atividade dos receptores transfectados P2X₄ ou P2X₂, em células 1321N1. As correntes induzidas pelo ATP ou a co-aplicação com o RNA ciclo 9 SELEX P2X₄ foi determinada através da técnica de *cell flow* na configuração de *whole cell recording*. (A e B) a-100 μ M ATP; b- 100 μ M ATP + 5 μ M RNA (ciclo 9- P2X₄R); c- 500 μ M ATP; d- 500 μ M ATP + 5 μ M RNA (ciclo 9- P2X₄R). (C e D) Medidas de *whole-cell recording* utilizando 1321N1 PLSXN P2X₄R. a- 500 μ M ATP; b- 500 μ M ATP + 5 μ M RNA (ciclo 9 P2X₄R). Ao contrário do receptor P2X₄, o receptor P2X₂ não foi inibido na presença do RNA selecionado. As células 1321N1 foram mantidas durante o experimento na voltagem transmembrânica de -60 mV (pH 7.4, 22°C).

Baseada nestes resultados e de ligação radioligante-receptor (Fig.31 e 32), o último ciclo de RNA resistente a nucleases P2X₂ e P2X₄ foi clonado e seqüenciado. As seqüências obtidas foram comparadas a fim de determinar regiões consenso conservadas nos ciclos, que adquirem conformações secundária responsável pelo efeito de inibição do receptor que não é necessariamente na conformação fechada (Fig.33).

No alinhamento dos aptâmeros P2X₄ foram identificados diversos ribonucleotídeos conservados, estes foram agrupados quanto à similiaridade em famílias. Algumas seqüências tiveram maior representatividade como A84 (5X) e A132 (12X). A análise de seqüências do ciclo 11 P2X₂ mostrou a presença de duas famílias conservadas (Fig.33).

Para determinar quais as grupos de aptâmeros que melhor interagiam com o receptor foram realizados inicialmente testes de ligação radioligante receptor com um representante de cada grupo (Fig.34A). Nestes experimentos, identificou-se maior deslocamento pelo competidor dos aptâmeros A51, A81 e A114 P2X₄. Em seguida a atividade dos aptâmeros foi avaliada por ensaios de *patch clamping* (Fig.34B), que indicou que além destes aptâmeros, A43 resulta também na redução de corrente ativada pelo ATP.

Três representantes das duas famílias identificadas do RNA selecionado do receptor P2X₂ foram utilizadas em experimentos de ligação radioligante receptor, na ausência ou presença de excesso molar de suramina nas células transfectadas e os aptâmeros foram deslocadas pela suramina (A63, A65 e A69) em até 40% (Fig.35A). A atividade do aptâmero A63 foi avaliada em testes de *patch clamping* em *whole cell recording* quando demonstrou haver inibição de corrente ativada por ATP de 38 % +/- 9% (Fig.35B).

Uma estimativa da constante de inibição do aptâmero (K_i) foi determinada de acordo com a equação: $A/A_i = 1 + x/K_i$ (Hess e Grewer, 1998), sendo A a corrente ativada por ATP, A_i corrente ativada com a co-aplicação ATP + A63, x= concentração do inibidor não competitivo 1 μ M. O valor de K_i ficou em torno de 273 a 885 nM.

(A)

Família I	
A51	5'--AUUUAGGCGGCCAGUCUUGGCGUAA <u>CGUCCUGCA</u> AGGGGAUUACCAU-----3'-----49 (1X)
A44	5'-----ACAGAAGUUCAAUAGCAAUGUAAU <u>UCCACCUCGUGCAA</u> -----3'-----40 (1X)
A06	5'-----CUAAAA <u>CUAAAGUAAC</u> -CCUACCUGAUGCAAAAAGAAUAG--3'-----39 (1X)
A05	5'----UUGCCCGUUAACAUCGCAAAGUAAU <u>UCCACCAU</u> AGCGCCG-----3'-----43 (1X)
A29	5'-----CUACAUGACUUCUGGACUC- <u>GUAUACACU</u> -----3'-----29 (1X)
A81	5'-----ACAAG- <u>CUUCUGGACUCGGUAAUCGAAU</u> UCCCGCGGUUCCAUGGCGCGGG 3'52 (1X)
A40	5'-----CUCUC <u>CAUCU</u> AAACAUCGC--AGGGCGCACAAAAAAUAAA-----3'-----40 (1X)
Família II	
A49	5'UGCUGAUUACCACGCCCGCCUCUAGC <u>ACUACCCU</u> -----3'-----36 (1X)
A41	5'-----UAAGAU-AGCGAAUUAUAAA <u>CUACCU</u> ACCCCGAUUGU-----3'-----38 (1X)
A50	5'-----AUGAUCAGUUAACCUAGAAGCGAUUA <u>ACUAAA</u> CUAGCU-----3'-----40 (1X)
A84	5-----CUCCCAAUAUAAGU--AGG- <u>UACCUAAU</u> AAUACAGCUAUCAU-----3'-----40 (5X)
84, 108, 123, 130, 103	
Família III	
A43	5'-----CCCGAAUAAUCUCAUAACAGACAUUUAGUGUAAGAAUAGU-----3'-----41 (1X)
A48	5'-----CACACCGAAUAAUCGUGUCUAGA <u>ACUUA</u> GAGACCGCCU-----3'-----40 (1X)
A2	5'-----AUUGUGCGACCCUGUGGGUUAUACACU <u>CAAAA</u> UAAAUGAA-----3'-----40 (1X)
A09	5'-----AUUUCUAAAAGAUAAUGG-GCUAGUGAU <u>AUGGGU</u> AAUGAA-----3'-----40 (1X)
A132	5'----CCCACCAAAAUA <u>CAACUU</u> ACA <u>CCAGAU</u> UAU <u>AUGAG</u> CAAU-----3'-----41 (12X)
132, 128, 125, 131, 115, 77, 117, 83, 124	

(B)

Família I	
A612	5'----- <u>CGTAATACGACTCACTATAGGGA</u> 3'
A72	5' <u>AAGCTTCTGGACTCGGTG</u> AGACTTT----- <u>TAATACGACTCACTATAGGGA</u> 3'
A621	5' <u>AAGCTTCTGGACTCGGTG</u> ----- <u>TAATACGACTCACTATAGGGA</u> 3'
A70	5' <u>AAGCTTCTGGATT</u> CGGTG----- <u>TAATACGACTCACTATAGGGA</u> 3'
A69	5'----- <u>CTGGACTCGGTG</u> ----- <u>TAATACGACTCACTATAGGGA</u> 3'
A62	5'----- <u>CTCGAGTTC</u> CAGAA <u>NCTTCTGGACTCGGTG</u> <u>CTAATACGACTCACTATAGGGA</u> 3'
A64	5'----- <u>CTGGACTCGGTG</u> ----- <u>TAATACGACTCACTATAGGGA</u> 3'
A67	5'----- <u>CTGGACTCGGTG</u> ----- <u>TAATACGACTCACTATAGGGA</u> 3'
Família II	
A68	5'-----TACCGAGTCCAAAAGCTTGTAGTACCGAGTCCAGAAGCTTGTAGTAGATGGCAGTT 3'
A65	5'-----GCTTGTAGTACCGAGTCCAGAAGCTTGTAGTAGATGGCAGTT 3'
A63	5'-----AAGCTTGTAGTACCGAGTCCAGAAGCTTGTAGTAGATGGCAGTTGAATTC 3'
A641	5'-----TGTAAGTCCAGAAGCTTGTAGT 3'
A642	5'-----GAGTCGTATCACTAGATGGCAGTTGAATTC 3'
A662	5'-----AGATGGCAGTTGAATTC <u>CAACTGCC</u> ATCTAT 3'
A661	5'-----TCAAGCTTGTAGTGCCTTGTAGT 3'
A611	5'-----TACCGAGTCCAGAAGCTTCTGGACTCG 3'

Figura.33 Identificação dos aptâmeros selecionados durante os ciclos de enriquecimento de SELEX ciclo 9 P2X₄ e ciclo 11 P2X₂ (A) As sequências presentes no ciclo 9 P2X₄ foram alinhadas e as sequências consenso foram identificadas e agrupadas em famílias. Ao fim da sequência está indicado o número de nucleotídeos randômicos que compõe o aptâmero como também o número de vezes identificado na biblioteca sequenciada. (B) Processo semelhante foi realizado com as sequências do ciclo 11 P2X₂, neste caso, além de sequências idênticas, duas porções conservadas durante a seleção estão sublinhadas.

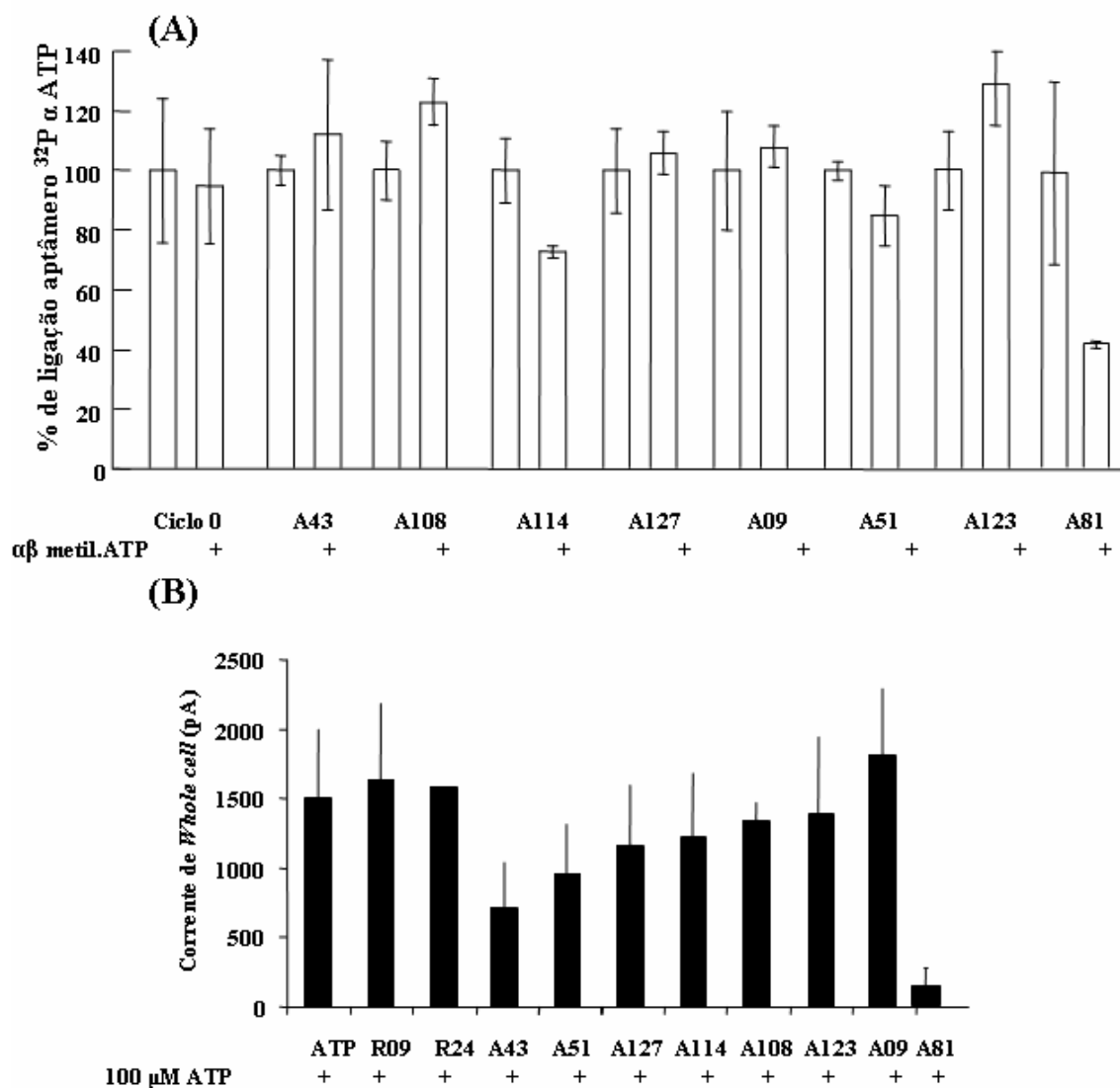


Figura.34 Avaliação da afinidade e potencial inibitório dos aptâmeros selecionados contra o receptor $P2X_4$ através de ensaios de ligação radioligante receptor e *patch clamping* em *whole-cell recording*. (A) Ensaios de ligação radioligante-receptor com (^{32}P) aptâmero foi incubado nas células transfectadas na ausência ou presença de $\alpha\beta$ metileno ATP para determinação da ligação específica. (B) Os mesmos aptâmeros foram testados por *patch clamping* em *whole-cell recording*. A co-aplicação de 100 μM de ATP + 1 μM de aptâmero resultou em inibição da corrente ativada por ATP. As seqüências do ciclo 0 R9 ou R24 foram utilizadas como controle. As células foram mantidas durante o experimento na voltagem transmembrânica de -60 mV (pH 7.4, 22°C).

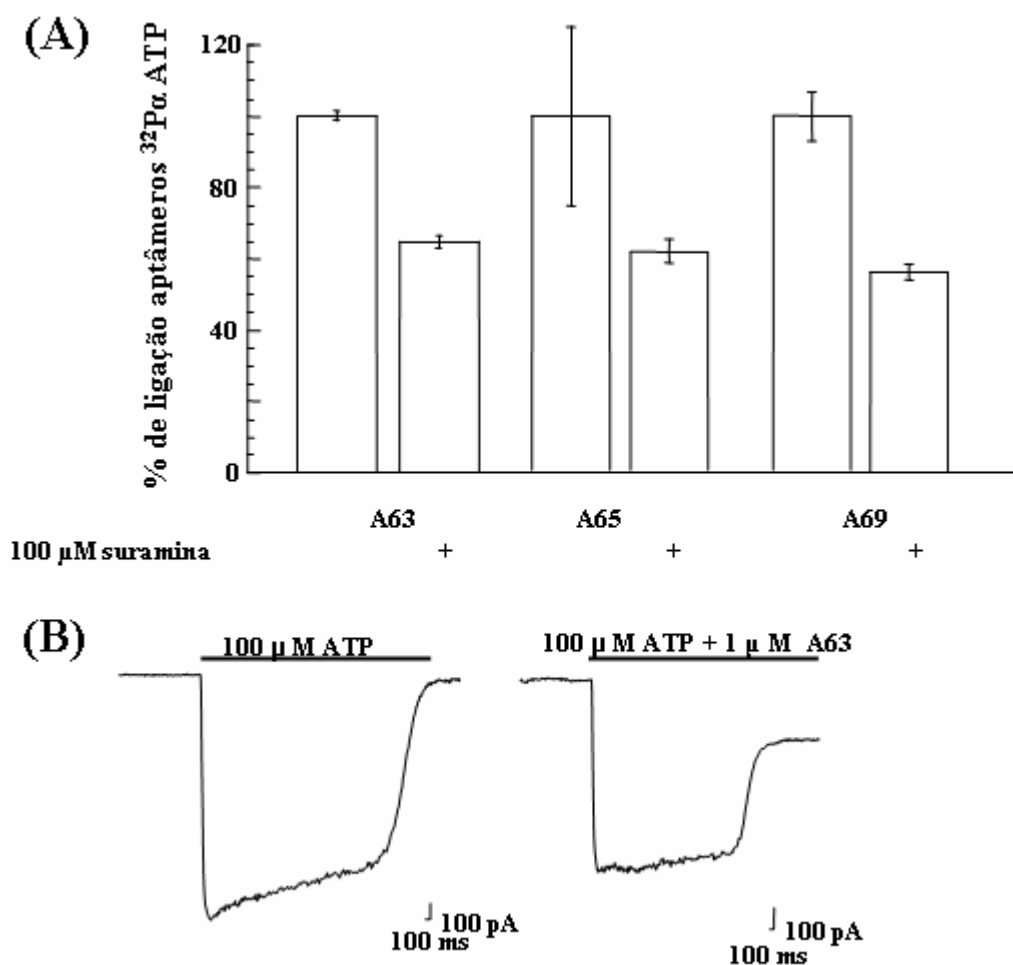


Figura.35 Avaliação da afinidade e potencial inibitório dos aptâmeros contra receptor P2X_2 por ensaios de ligação radioligante receptor e *patch clamping* em *whole-cell recording* (A) Três destes aptâmeros A63, A65, A69 foram avaliados em testes de ligação radioligante receptor e demonstraram serem deslocados por excesso de suramina (100 μM) em aproximadamente 50% comparado ao controle sem competidor. B) Medidas de *patch clamping* em *whole cell recording*. A aplicação de ATP e em seguida aplicação de ATP + 1 μM do aptâmero 63 resultou em 38 % \pm 9% de inibição da corrente ativada somente por ATP. As células foram mantidas durante o experimento na voltagem transmembrânica de -60 mV (pH 7.4, 22°C).

Representantes de famílias conservadas nas duas seleções de SELEX tiveram sua estrutura secundária predita pelo programa M-fold (Zuker, 1989) que lev em conta a conformação estável, energia livre (ΔG) mínima estável, temperatura e salinidade do meio. Contudo, o programa não utiliza como parâmetros como da utilização de ribonucleotídeos modificados que foi utilizada nestes aptâmeros que resultam no aumento da estabilidade do RNA resistente a nucleases, característica que pode mudar a conformação da estrutura secundária. Foram preditas as estruturas dos aptâmeros A43, A51, A81 e A114 P2X₄ e A65 e A69 P2X₂ com os respectivos grampos estruturais formados, candidatas a interagirem com o receptor quando comparados ao restante da estrutura (Fig.36) (Davis e cols., 1996).

Grampos estruturais identificados nos aptâmeros P2X₂ / P2X₄ levam a atividade inibitória do receptor na co-aplicação com ATP

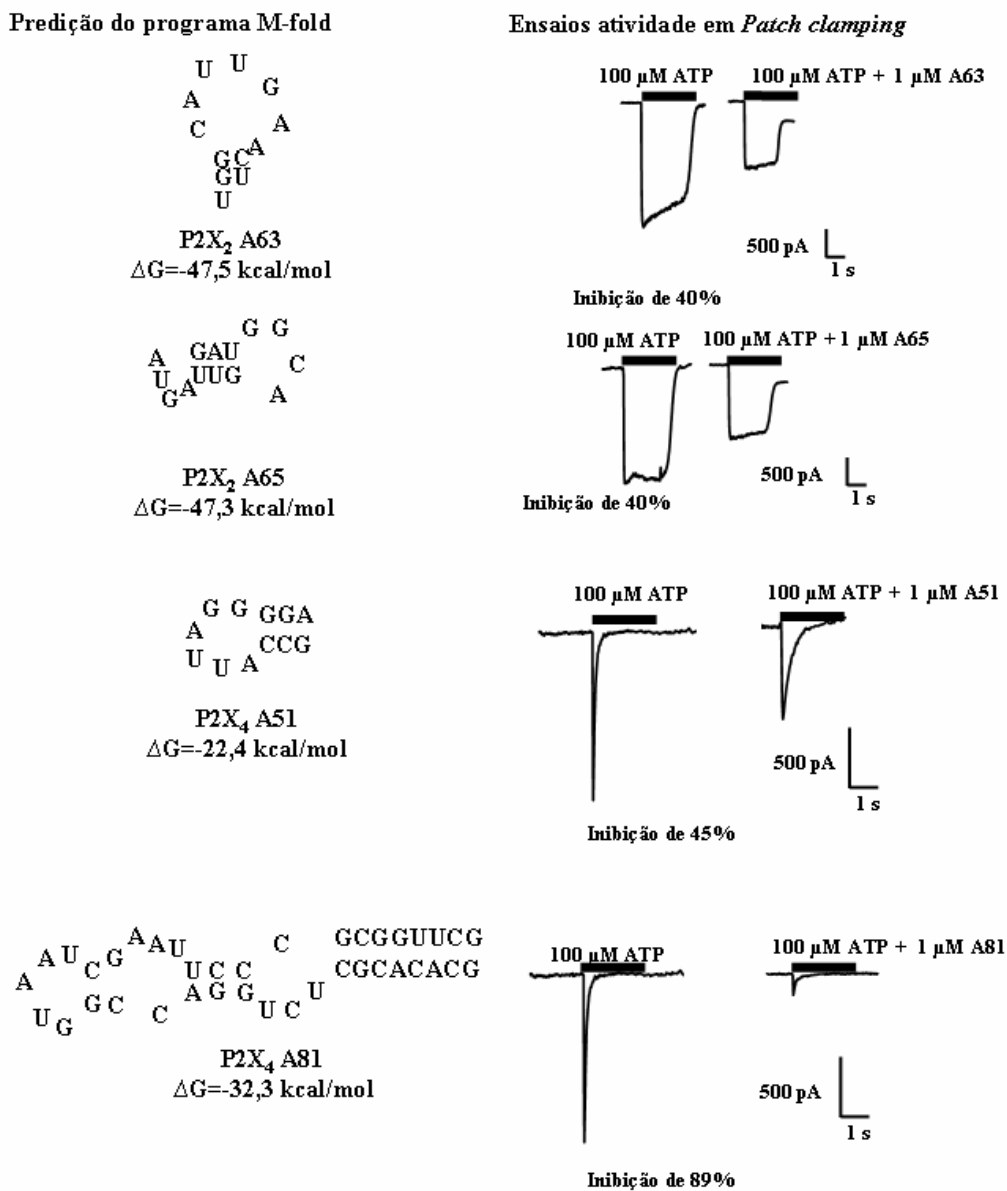


Figura 36 Predição do grupo estrutural envolvido com a inibição e a atividade inibitória de inibição por *patch clamping*. Através do programa M-fold foi feita a predição do *stem loop* envolvido com a inibiçãoda corrente ativada pelo ATP dos aptâmeros A63, A65, A51 e A81.

4.9 Inibição de receptores purinérgicos nas células PC12 e P19 utilizando aptâmeros específicos aos receptores P2X₄

A característica principal dos aptâmeros identificados por SELEX é que são extremamente específicos discernindo isoformas da mesma proteína o que poderia resultar num inibidor específico ao receptor purinérgico utilizado, como sugerido em nossos dados (Fig.32). Testamos os aptâmeros em células que expressassem os receptores selvagens como P19 teratocarcinoma murino e PC12 feocromocitoma de rato nas quais identificamos a expressão destes receptores (fig.13 e 16).

Às células P19 indiferenciadas foram adicionadas diferentes concentrações de RNA resistentes a nucleases (ciclo 9 P2X₄) (Fig.37) na formação de CE semelhante ao experimento na presença de inibidores genéricos de receptores purinérgicos (Fig.17). Após adição de *all trans* ácido retinóico nas células em suspensão foram adicionados 2,5 (Fig.37A), 25 (Fig.37B e C) e 200 nM (Fig.37D) de RNA ciclo 9 ou RNA nucleases resistente ciclo 0 (controle). Nas células com concentração de 2,5 nM RNA ciclo 0 e 9 resultaram em 2,5 e 5% respectivamente de aumento na distribuição de CE com tamanho maior que 7 em relação ao controle.

Já com a aplicação de 25 nM, a distribuição de CE na faixa de 0.1-1.4 ua reduziu em relação ao controle mas na fração de distribuição 1.5 a 5 ua houve aumento, contudo foi observado que CE maiores que 5 ua manteve-se semelhante ao controle. As células obtidas deste tratamento em específico foram plaqueadas a fim de se diferenciarem em neurônios semelhante ao controle (Fig.7). As células mantiveram-se em cultura até o dia 8. A morfologia celular de diferenciação dos neurônios advindos de CE ficou alterada, as extensões foram menores nas células tratadas com alteração morfológica (Fig.37B). O mesmo ensaio foi novamente realizado com adição de 200 nM RNA ciclo 9 P2X₄R na qual foi observado a depleção da formação de CE (Fig.38D). Tal fato não ocorreu nos ensaios no controle ou na presença de RNA ciclo 0. Os dados obtidos corroboram com o fato de que os receptores P2X₄ estejam envolvidos com a formação dos CE e envolvidos com a determinação do progenitor neural P19 que é pré-requisito para a diferenciação precoce.

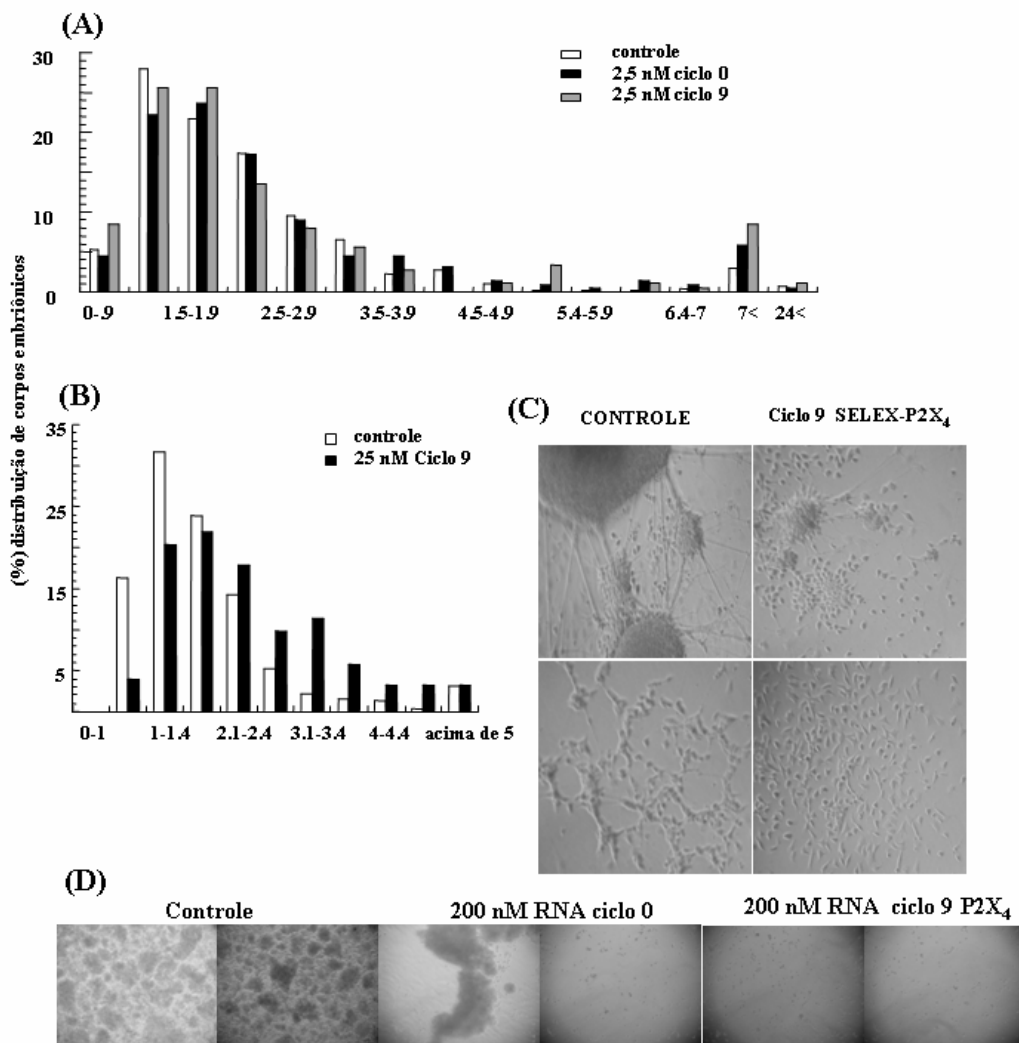


Figura.37: Efeitos da presença de RNA resistente a nucleases (ciclo 0 e 9-P2X₄) sobre a formação de corpos embriônicos (CE). (A) Na presença de 2,5 nM RNA ciclo 0 e ciclo 9 houve aumento de CE maiores que 7 e menores que 24 de 2,5 e 5 % respectivamente em relação ao ensaios controle. (B) A presença de 25 nM de RNA ciclo 9 resultou em pequeno aumento do tamanho de CE pela redução de CE de 1-1.4 ua de 20% em relação ao controle. (C) Os corpos embriônicos de (B) foram plaqueados em frascos aderentes para dar continuidade à diferenciação neuronal na ausência de aptâmeros até o dia 8. As extensões celulares provenientes de células diferenciadas de corpos embriônicos na presença de RNA do ciclo 9-P2X₄ foram menores quando comparada ao controle. (D) Utilizando 200 nM de RNA ciclo 9 P2X₄ houve depleção da formação de CE ao contrário quando comparado ao ciclo 0. Os dados se referem a três experimentos realizados independentes.

Outro experimento funcional realizado foi a utilização de RNA resistente a nucleases ciclo 9 P2X₄ nos experimentos de *calcium imaging* em células P19 indiferenciadas para comparar o aumento $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig.15) após aplicação de ATP + $\alpha\beta$ metileno ATP e a co-aplicação destes com o RNA. Neste estágio, além dos receptores P2X₄, outros receptores purinérgicos são expressos (b-Resende e cols., 2007, Fig.16 e tabela 3). O ligante $\alpha\beta$ metileno ATP promove somente ativação do P2X₃ presente neste estágio. A aplicação de ATP ativa os receptores P2X₃, P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆. Somente a comparação da $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ativado por $\alpha\beta$ metileno ATP e a co-aplicação com o RNA ciclo 9 poderiam indicar a atividade da biblioteca de RNA nucleases resistente sobre o receptor. A aplicação nas células de ATP + $\alpha\beta$ metileno ATP (Fig.38A) ativa o influxo mediado por $\alpha\beta$ metileno ATP e ATP, de todos os receptores purinérgicos presentes. A aplicação de ATP + biblioteca de RNA resultou em menor $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig.38B) quando comparado a (A). O agonista ATP ativa os todos os receptores purinérgicos presentes inclusive os metabotrópicos P2Y. O RNA inibiu os receptores P2X₄. A co-aplicação $\alpha\beta$ metileno ATP + RNA ciclo 9 (Fig.38C) resultou em menor influxo de cálcio quando comparado a (A) e (C) pois houve ativação somente do receptor P2X₃ e não houve alteração da atividade dos receptores P2Y presentes. Foi identificado que houve redução do influxo de cálcio na co-aplicação do RNA ciclo 9 com ATP e com $\alpha\beta$ metileno ATP quando comparado ao controle (A) identificado pela análise de variação de fluorescência (F/F₀) (Fig.38D). Nossos dados indicaram que o RNA atuou nos receptores P2X₄ presentes nas células P19 não no receptor P2X₃.

Na célula PC12 de feocromocitoma de rato, o potencial inibidor e a seletividade do RNA (ciclo 9, P2X₄) na concentração de 1 μM foi analisada por ensaios de *patch clamping* em *whole-cell recording*. Determinou-se 300 μM de ATP a concentração para obtenção da corrente máxima (Fig.38E). Na aplicação dessa concentração de ATP na presença de $\alpha\beta$ metileno ATP de 5 μM (Fig.38F) como ativador adicional, não resultou em aumento de corrente induzidos pelos receptores purinérgicos presentes e pelo contrário houve inibição da corrente ativada pelo receptor P2X₄ de rato. Sabendo-se que não há expressão de receptores P2X₇ nestas células (Arslan e cols., 2000). Vinte e cinco % da corrente ativada por ATP nestas células aparentemente foi mediada pelo receptor P2X₄.

Ensaio de *patch clamping* em *whole-cell recording* em células PC12 foram realizados com aplicação de 300 μM de ATP + 1 μM RNA (ciclo 9 P2X₄) comparado ao controle (300 μM de ATP) e a coaplicação com ATP + $\alpha\beta$ metileno ATP. A percentagem de inibição semelhante observada na presença de aptâmeros e $\alpha\beta$ metileno ATP foi semelhante. A conclusão final dos ensaios com células P19 e PC12 é que os aptâmeros selecionados reconhecem especificamente o receptor P2X₄ presentes nestas células.

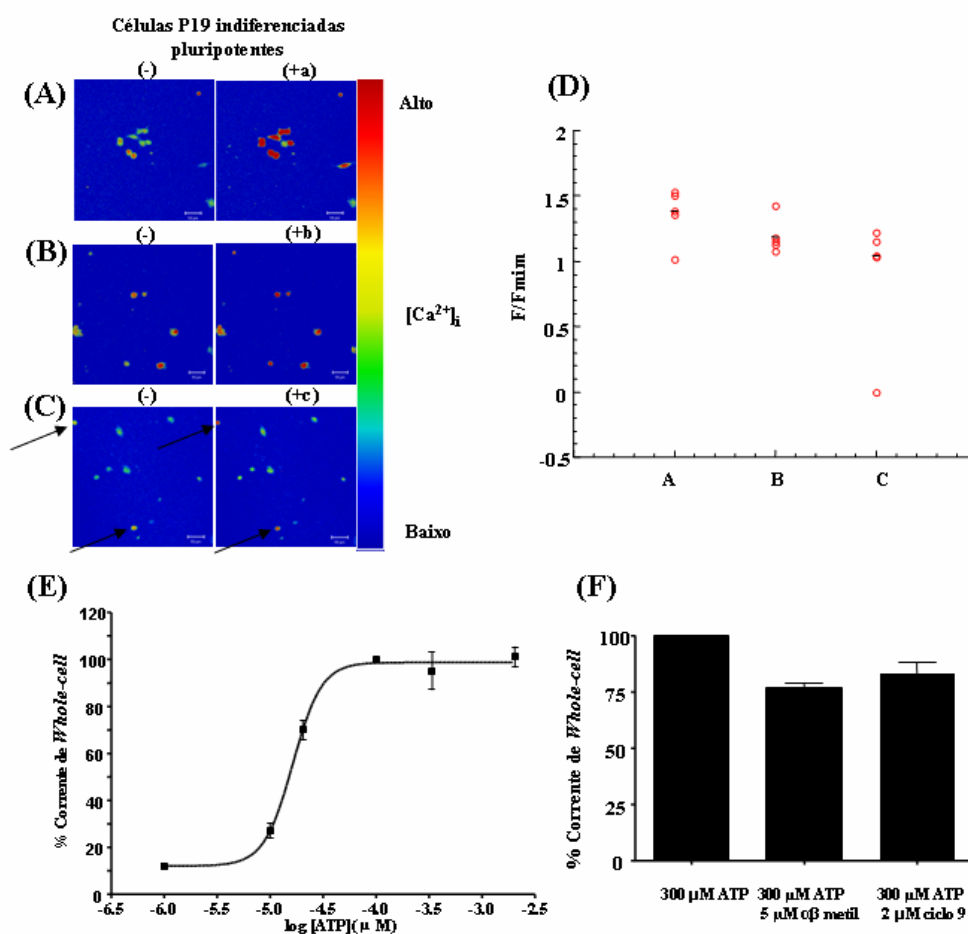


Figura 38. Efeitos de RNA resistentes a nucleases ciclo-9-P2X₄ como inibidores da atividade dos receptores purinérgicos P2X₄ nas células P19 e PC12. (A) Houve aumento de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ nas células P19 indiferenciadas após adição de 100 μ M ATP + 50 μ M $\alpha\beta$ metileno ATP (B) Foi verificada que co-aplicação de 100 μ M ATP + 250 nM de RNA ciclo 9- P2X₄ redução de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ quando comparado a controle (100 μ M ATP)(C) A co-aplicação de 250 nM de RNA (ciclo 9-P2X₄) com 50 μ M de $\alpha\beta$ metileno ATP resultou em redução de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ quando comparado a (A) e (B). As células analisadas contendo o receptor P2X₃ estão indicadas pelas setas. (D) Razão (F/F₀) após adição de ligantes mostrou $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em (A), (B) e (C). Valor mediano está indicada pelo traço preto no gráfico. (E) Curva de corrente máxima induzida pelo ATP medida através de *patch clamping* em *whole-cell recording*, a concentração de 300 μ M de ATP atinge o *plateau* dos receptores. (F) O gráfico compara a corrente após aplicação de 300 μ M de ATP, 300 μ M de ATP + 5 μ M $\alpha\beta$ -metileno ATP e 300 μ M de ATP + 2 μ M de RNA ciclo 9- P2X₄.

4.10 Inibição de receptores purinérgicos nas células PC12 utilizando aptâmeros específicos aos receptores P2X₂

Ensaio nas células PC12 com co-aplicação de 100 μ M de ATP + 1 μ M de A63 em *patch clamping* em *whole cell recording* resultou em inibição de corrente ativada de ATP de 21% (Fig.39). Há casos de aptâmeros inativos, que resultam em baixa inibição ou ainda agem como ligantes alostéricos. Mas neste caso nada pode ser afirmado quanto a especificidade pela presença de outros receptores purinérgicos nas células PC12.

Nossos dados indicam que os aptâmeros selecionados são específicos aos receptores alvo utilizados na seleção de SELEX sendo inibidores específicos em potenciais a estes receptores.

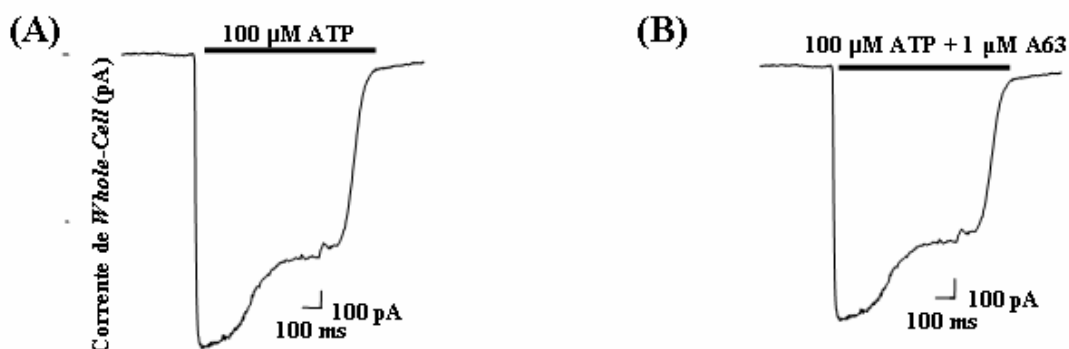


Figura 39. Ensaio de *patch clamping* em *whole cell recording* nas células PC12 utilizando o aptâmero A63 P2X₂ membro da família conservada II. (A) A aplicação de 100 μ M de ATP. (B) Co-aplicação de 1 μ M de A63 + 100 μ M ATP resultou em inibição de 21% da corrente induzida na aplicação de 100 μ M de ATP nas células PC12 em relação ao controle. O aptâmero A63, pertencente a família II.

Discussão

5. Discussão

5.1 Caracterização da diferenciação neural nas células de carcinoma embrionário P19

Durante o desenvolvimento embrionário, as células precursoras neurais participam da formação da citoarquitetura cerebral em três níveis de organização: na organogênese da ultra estrutura do sistema nervoso com estabelecimento de reservatórios de células progenitoras, em sistemas nos quais são responsáveis por responder a alterações sistêmicas ou perturbações fisiológicas ou patofisiológicas e em nível de micro-estrutura com estabelecimento de conexões sinápticas em processos de plasticidade neural (Imitola e cols., 2004).

Para compreender-se os mecanismos de diferenciação, plasticidade neural e integração de neurônios imaturos em circuitos sinápticos existentes utilizamos a linhagem de carcinoma embrionário murino P19 (EC), como modelo de diferenciação neuronal. Esta linhagem é bem caracterizada na literatura e compreende todos os passos de diferenciação de célula-tronco embrionária murina (ES)(Fig.7). A diferenciação neuronal destas células é muito semelhante ao que ocorre *in vivo* quanto a expressão de marcadores protéicos. A determinação da diferenciação neuronal *in vivo* ocorre na formação do tubo neural enquanto que a maturação neuronal com a formação de sinapses funcionais ocorre durante a migração neuronal na qual a célula neuronal imatura posiciona em um lugar em definitivo.

Neste trabalho, além das células P19, a linhagem neural NH15-CA2 (di-híbrido neuroblastoma de camundongo X glioma de rato) foi caracterizada quanto a atividade e expressão de seus receptores de neurotransmissão e neuropeptídeos. Nosso objetivo neste trabalho foi de identificar receptores envolvidos nas vias de sinalização em comum quanto a diferenciação

As células P19 têm um repertório amplo de diferenciação comparada às outras linhagens neuronais PC12 ou NH15-CA2, podendo originar células dos 3 folhetos embrionários e diversos tipos neuronais quando comparadas a diferenciação de células

PC12 que originam neurônios adrenérgicos ou feocromócitos ou de células NH15-CA2 que resultam somente neurônios e glias após diferenciação. A diferenciação neuronal das células P19 segue o mesmo padrão de expressão de marcadores protéicos da diferenciação ectodérmica da crista neural, entretanto não demanda manutenção especial requerida pelas células ES murinas. *In vitro*, além de células-tronco embrionárias que possuem capacidade de originar células dos 3 folhetos embrionários, há as células progenitoras neuronais presentes no giro dentado do hipocampo, na zona subventricular e na cortical, que podem ser induzidas a se diferenciarem em neurônios e glias após a formação de neuroesferas.

A diferenciação do tipo neuronal, *in vivo*, de neurônio mesencefálicos dopaminérgicos ocorre em duas regiões organizadoras: no istmus (presente entre a região mesoencefálica e o cerebelo, denominada também *mid/hindbrain boundary-MHB*) e nas células lâmina basal (*floor plate*) que estão presentes em todo sistema nervoso central ventral. A expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) envolvida com a síntese de dopamina em neurônios, foi detectada no dia 11 do desenvolvimento embrionário no mesoencefálo de camundongo. Mas as células já estão especificadas a originarem neurônios dopaminérgicos numa fase anterior pela ação de duas proteínas sinalizadoras, a Shh (sonic hedgehog) e o FGF 8 (fator de crescimento de fibroblasto 8) (Wallén e Perlmann, 2003). A combinação destes fatores a FGF 4 especificam células a se diferenciarem em neurônios serotoninérgicos localizados na cauda do MHB (Ye e cols., 1998). Nas células precursoras dopaminérgicas foi identificado a enzima aldeído desidrogenase (Aldh1), capaz de metabolizar retinaldeído a ácido retinóico. Acredita-se que este esteja envolvido na sinalização inicial da diferenciação de neurônios dopaminérgicos (Castro e cols., 2001). *In vitro* foi identificado que a transcrição da subunidade do receptor de NMDA NR1 é ativada após adição de *all trans* ácido retinóico nas células P19 (Bai e cols., 2003) sendo que sua expressão aumentou no decorrer da diferenciação (Okamoto e cols., 1999).

Os neurônios P19 permanecem em cultura por mais de 40 dias após a indução a diferenciação neuronal e glial. Tal característica permite estudar o processo de diferenciação, maturação neuronal e sináptica e a interação neurônio-glia. Nesta cultura celular foi identificada a secreção de diversos neurotransmissores, neuropeptídeos e

seus precursores, e de enzimas envolvidas com a via de síntese; neuropeptídeo Y, serotonina, GABA, ácido glutâmico descarboxilase, GABA-transaminase, somatostatina, tirosina hidroxilase, DOPA decarboxilase, serotonina, peptídeo calcitonina, galanina, substância P e encefalina (Staines e cols., 1994). *In vivo* neurotransmissores, neuropeptídeos e seus receptores estão presentes em estágios precoces da diferenciação, fase anterior a formação de sinapses corticais e sub-corticais nas quais regulam o processo de desenvolvimento do sistema nervoso. Neste estágio, estes ligantes atuam de modo semelhante a fatores de crescimento (Nguyen e cols., 2001).

Estudos para entender os mecanismos envolvidos na determinação do estágio progenitor neurais e na maturação neuronal podem aumentar a compreensão quanto as vias de sinalização intracelular envolvidas, que pode ser utilizada em estratégias terapêuticas a fim de direcionar a diferenciação neuronal a um fenótipo específico (Wallen e Perlmann, 2003).

Neste sentido, nosso trabalho consistiu em tentar elucidar o papel dos receptores P2 e especificamente dos subtipos P2X₂ e P2X₄ nas células P19. Pela ausência de ligantes seletivos, utilizamos a técnica SELEX para identificar-se aptâmeros específicos capazes de inativar tais receptores em estágios específicos da diferenciação.

5.2. Expressão de receptores de neurotransmissores de NMDA, de acetilcolina e dos neuropeptídeos endotelina-B e B2 de cininas nas linhagens neuronais NH15-CA2 e carcinoma embrionário P19.

O desenvolvimento embrionário do sistema nervoso de vertebrados é baseado no controle da expressão gênica que por sua vez é o resultado da influência de fatores intrínsecos e extrínsecos. O controle da expressão de fatores específicos de transcrição promove a expressão de moléculas de superfície celular, de receptores e de moléculas com atividades biológicas resultando em mudanças morfológicas e moleculares necessárias para a maturação do sistema nervoso (Fig.2). O processo de diferenciação *in vivo* envolve a passagem das células por vários estágios fenotípicos, de células

pluripotentes a progenitoras, seguida pela migração e maturação neural de neurônios e glias (Fig.1).

Neste processo, os neurotransmissores e seus receptores são expressos em diversos estágios da diferenciação neuronal, os quais ativam vias intracelulares nas células em diferenciação para a maturação de sinapses cerebrais. A expressão de receptores é importante em fases específicas do desenvolvimento embrionário, por exemplo em embriões de *Xenopus* aonde a inibição dos receptores de dopamina e de α adrenérgico resulta na redução da quantidade de neurônios diferenciados (Rowe e cols., 1993). A ativação de receptores de serotonina, noradrenalina e dopamina elevam a $[Ca^{2+}]_i$ durante a diferenciação neuronal (Lauder, 1993) (Fig.2). Neurônios e progenitores neurais de embriões de rato expressam o receptor M1 muscarínico de acetilcolina, o qual está envolvido com a sinaptogênese na região cortical (Williams e cols., 2004). Há também a participação do receptor de acetilcolina, $\alpha 7$ envolvido com a axogênese, sinaptogênese e na plasticidade sináptica (Criado e cols., 1997, Slotki e cols., 2004). A serotonina está envolvida com na formação crânio-facial e no desenvolvimento cardíaco; em nível celular atua na proliferação, migração, expressão gênica e a morfogênese da crista neural (Shuey e col., 1991 1992; Yavarone e cols., 1993; Moiseiwitsch e Lauder; 1995; 1997; Nebigil e cols., 2000; Moiseiwitsch e cols., 1998). Os neurotransmissores GABA e glutamato regulam a proliferação de precursores neuronais (Haydar e cols., 2000; LoTurco e cols., 1995). A resposta celular de células-tronco a neurotransmissores é a elevação da $\Delta[Ca^{2+}]_i$ que em muitos casos altera o padrão de síntese de DNA e a formação das junções gap entre as células (LoTurco e cols., 1995; Owens e cols., 2000; Console-Bram e cols., 1998).

Durante o desenvolvimento, pequena sensibilidade à acetilcolina foi observada antes da formação de sinapses periféricas, contudo o contato com a célula alvo resultou no aumento substancial da sensibilidade celular à acetilcolina o que levou ao aumento na expressão e na localização de subunidades nicotínicas de acetilcolina (Nishi,2003). A liberação de acetilcolina em células progenitoras neurais regula o desenvolvimento, a proliferação, a diferenciação, resulta no crescimento de neuritos e na estimulação a diferenciação de células multipotentes neurais. Foi identificada a expressão do receptor muscarínico M2 nas células embrionárias neuroepiteliais da zona ventricular de rato

semelhante ao que ocorre nas P19 em diferenciação (Larocca e cols., 1994; Coronas e cols., 2000, Resende e cols., 2007a; Ma e cols., 2000).

A fim de caracterizar os neurônios originados do nosso protocolo de diferenciação neuronal das células P19, alguns transcritos gênicos foram identificados quanto à proliferação, como RECK e quanto a atividade das sinapses formadas, receptor B2 de cininas e VAMP-2 (Fig.8). Os dados do receptor B2 de cininas resultou na publicação pelo nosso grupo, Martins e cols. (2005). Com participação comprovada no desenvolvimento neural, os receptores de acetilcolina, NMDA e do neuropeptídeo endotelina-2, foram previamente identificados na diferenciação neuronal e neural das células P19 (Cauley e cols., 1996; Parnas e cols., 1998; Resende e cols., 2007a; Morley e cols., 1995; Monge e cols., 1995). Por *calcium imaging* identificamos e confirmamos a atividade de receptores de neurotransmissão e neuropeptídeos em neurônios P19, progenitores neurais P19 (dia 5) e células indiferenciadas P19 e NH15-CA2. (Fig.9, 10). Parte destes dados resultaram no manuscrito publicado, Ulrich e Majumder (2006).

Os receptores de acetilcolina foram detectados em diversos modelos de diferenciação neuronal *in vitro*, como em células de PC12, NG108-15, neuroblastoma murino N1E-115, em células embrionárias de carcinoma humano (NT2-N e N-TERA), em células que se comportam semelhante a tumores humanos neuroectodérmicos como a células TE-671 e em progenitoras neurais embrionárias da zona subventricular de rato. (Avila e cols., 2003; Melnikova e Gardner, 2001; Yamashita e Nakamura, 1996; Pozzan e cols., 1986; Higashida e cols., 1997; Newman e cols., 2002; Squires cols., 1996; Ma e cols., 2000).

Nossos dados mostraram a atividade e a expressão gênica dos receptores de acetilcolina em todas as fases da diferenciação neuronal das células P19 e nas células NH15-CA2. Tais dados sugerem o envolvimento de receptores e suas vias de transdução de sinal no processo de diferenciação neuronal (Fig.9 e 10). Tais achados resultaram na publicação de alguns artigos pelo nosso grupo sobre o assunto, Ulrich e Majumder (2006), Resende e cols. (2007 A) e Martins e cols. (2005).

Outro receptor de neurotransmissão com atividade investigada durante a diferenciação foi de NMDA. Este pertence a família de receptores glutamatérgicos, e participa do desenvolvimento do sistema nervoso central. A estimulação dos receptores

de NMDA em estágios precoces do desenvolvimento do sistema nervoso central é importante para a sobrevivência celular, diferenciação neuronal e estabelecimento de redes neurais (Deutsch e cols., 1998). Foi detectado em células progenitoras adultas do hipocampo e a exposição destas, *in vitro*, ao neurotransmissor facilitou a diferenciação neural de neuroesferas (Deisseroth e cols., 2004; Kitayama e cols., 2004). No estágio de célula progenitora, a atividade do receptor de NMDA é fundamental para alterações morfológicas neuronais, mas não no *timing* de aquisição do fenótipo celular de neurotransmissão (Ciccolini e cols., 2003). As células progenitoras P19 e seus neurônios expressam tais receptores (Fig.10) e que nos levou a utilizá-los nos experimentos de avaliação da maturação neuronal na presença de ligantes de receptores purinérgicos.

A atividade do receptor de endotelina-B foi somente detectada em neurônios P19 quando se aplicava máxima concentração do ligante necessária a resposta. Os receptores de endotelina são divididos em A e B têm como ligantes endotelina do tipo 1, 2 e 3. A endotelina e seus receptores participam da diferenciação e migração terminal de determinadas populações localizadas na crista neural. Estas células originam melanócitos e células ganglionares entéricas. A perda ou mutação da endotelina-3 ou do receptor endotelina-B leva a agangliose distal no intestino resultando na doença de Hirschsprung do tipo II ou síndrome Shah-Waadenburg. Não se sabe ao certo se as doenças estão relacionadas à migração ou manutenção das células progenitoras da crista neural (Kruger e cols., 2003). É necessária a expressão do receptor e do ligante no estágio embrional durante os dias 10 a 12.5 quando ocorre a migração de melanoblastos e neuroblastos entéricos no desenvolvimento do camundongo (Shin e cols., 1999).

Os dados de expressão gênica e da atividade de receptores de neurotransmissão e neuropeptídeos reforçam a importância da utilização do modelo de diferenciação neuronal, *in vitro* P19 para melhor compreensão dos fenômenos que ocorrem *in vivo*. Desta forma, investigamos os receptores purinérgicos os quais ainda não haviam sido descritos durante a diferenciação neuronal no início deste trabalho.

5.3. Identificação dos receptores purinérgicos nas células NH15-CA2 e durante a diferenciação neuronal das células P19

A sinalização purinérgica é um sistema primitivo envolvido em processos tróficos de pequena e longa duração que resultam na liberação de ATP endócrina. Foi identificada a participação do sistema purinérgico na resposta imune e inflamação, transdução mecanosensorial, agregação plaquetária, vasodilatação endotelial mediada, estresse e hipóxia, proliferação celular, diferenciação, migração e morte celular programada no desenvolvimento (Burnstock, 2006; Rathbone e cols., 1999).

Haviam-se indícios da participação do sistema no desenvolvimento do sistema nervoso. A estimulação de receptores de adenosina (A1) induziram o crescimento de neuritos na linhagem humana de neuroblastoma SH-SY5Y e em cultura primária de precursores neuronais no estriato. Além disso, estes receptores A1 foram associados ao aumento do número de células na fase G1, sugerindo seu envolvimento em processos primários da diferenciação neuronal (Canals e cols., 2005). O receptor A2A foi identificado no controle da sobrevivência e de morte de células PC12 (Trincavelli e cols., 2003).

Já os receptores purinérgicos P2 foram identificados nas células PC12 e foram relacionados à regeneração de neuritos nos neurônios PC12 em 48 horas de tratamento com 100 μ M de ATP (D'Ambrosi e cols, 2000; D'Ambrosi e cols, 2001, Hur e cols, 2000; Fujita e cols, 2000, Arslan e cols., 2000). Nossos dados demonstraram que a atividade purinérgica é detectada de modo semelhante a diferenciação com NGF e FGF-2 (Fig.13).

O receptor ionotrópico P2X₅ foi o primeiro a ser associado à diferenciação muscular (Ryten e cols, 2002). Atividade mitogênica do ATP foi identificada nas células v-myc progenitoras neurais imortalizadas (Ryu e cols., 2003). O estudo com células da glia radial do córtex, indicou que há sinalização mediada pelo receptor P2Y₁ na neurogênese, sendo que este foi identificado como sendo o receptor, que inibido pela suramina, reduziu a proliferação glia radial (Weissman e cols., 2004). Hogg e cols., (2004) identificaram receptores P2X₃ e P2X₇ em células progenitoras de hipocampo de

rato e sugeriram a participação destes receptores no controle da $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ para início da diferenciação neural. Lin e cols., (2007) e Mishra e cols., (2006) identificaram a sinalização parácrina e autócrina do ATP nas células progenitoras como sendo responsáveis pela proliferação de células de neuroesferas através da ativação de P2Y, principalmente de P2Y₁ e P2Y₂. O bloqueio destes receptores em neuroesferas provenientes de animais *knock-outs* resultou em menor proliferação celular e de transientes $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ mostrado em estudos de inibição de receptores (Mishra e cols., 2006). A produção de ATP se dá por pulsos sendo mais acentuada no início do processo de diferenciação (Lin e cols., 2007).

Shukla e cols., (2005) identificaram a expressão de diversas ecto-nucleases nas células multipotentes progenitoras neurais de hipocampo adulto murino, principalmente de NTPDase, responsável pela quebra em dinucleotídeos ADP e UDP e restrita em regiões com atividade neurogênica. Tal atividade enzimática pode disponibilizar substratos a outros receptores purinérgicos com menor afinidade a ATP ou UTP levando a ativação desses (Fig.3).

Nossos dados indicaram a participação dos receptores purinérgicos durante a diferenciação neuronal e neural das células P19 e no estado indiferenciado da linhagem NH15-CA2 (Fig.14 e 15). Há modificação do padrão gênico de expressão dos receptores nos diferentes estágios de diferenciação. Como constatamos a atividade destes receptores mesmo em células indiferenciadas P19, NH15-CA2 e PC12 sugerimos que haja contribuição do sistema no início da diferenciação pelos transientes $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ como colocado por Hogg e cols., (2004). Nas células P19, os receptores purinérgicos inotrópicos P2X₂ e P2X₄ são expressos em diferentes fases da diferenciação neuronal, P2X₄ na fase precoce da diferenciação das células P19, NH15-CA2 e PC12 e P2X₂ nas fases de progenitor neuronal e neurônios maduros das células P19 e em células NH15-CA2 indiferenciadas (Fig.14, 15 e 16) Tais dados resultaram na publicação de nosso achados, Resende e cols.(2007b). Os dados por nós obtidos são semelhantes aos verificados por Arslan e cols. (2000). O pesquisador e seu grupo constataram maior atividade do receptor P2X₄ no estágio indiferenciado devido a ausência de sensibilidade das células ao inibidor PPADS. Entretanto, a atividade dos receptores purinérgicos não é uma característica isolada da linhagem de teratocarcinoma murino P19, as células EC

humanas NTERA-2 expressam receptores P2Y₁ em seu estágio indiferenciado de modo semelhante às células de neuroesferas de camundongo e células progenitoras de hipocampo de rato (Moore e cols, 2002, Lin e cols., 2006, Mishra e cols., 2006, Hogg e cols., 2004). Além de serem amplamente distribuídos no sistema nervoso central adulto, estes receptores possuem alta seletividade ao influxo de cálcio, o que nos levou a investigar sua participação deles no processo de diferenciação (Fig.40).

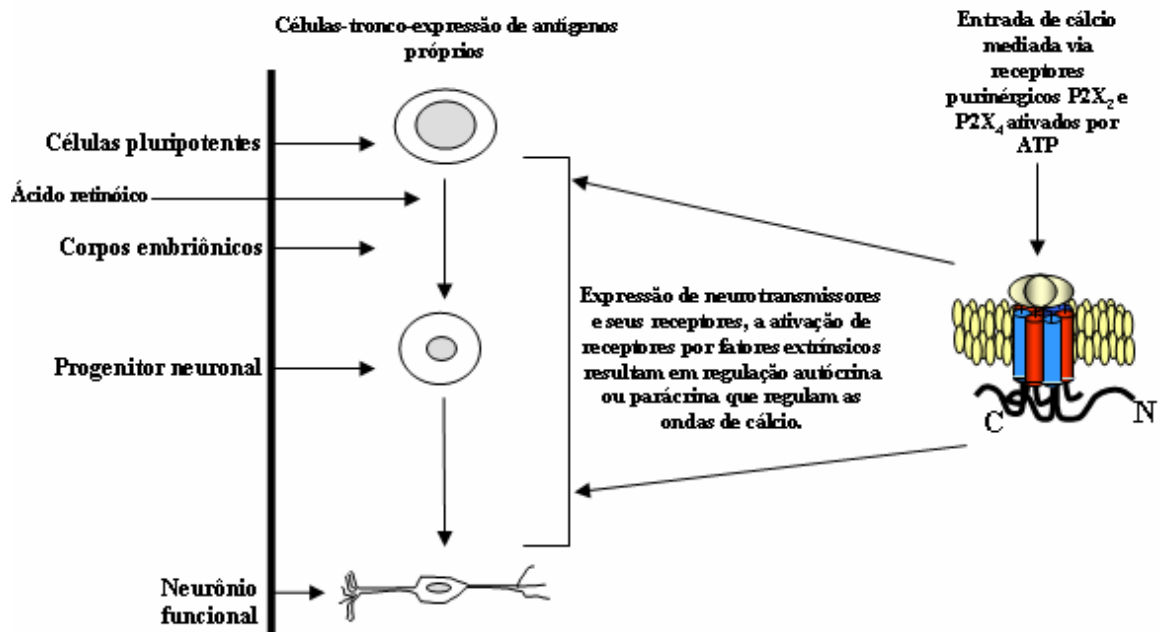


Figura.40 Hipótese da participação dos receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₄ na diferenciação neuronal de células P19. Fatores extrínsecos e intrínsecos que coordenam a progressão da diferenciação pela ativação de difersas vias de sinalização.

A ativação destes receptores dispara diversas vias intracelulares de sinalização, os receptores P2Y mediam vias de Ras/Raf/MEK/MAPKs em neuroesferas indicando *cross talking* em potencial com as vias de FGF, EGF/TGF α , PDGF e erb-B para a mitose neural (Tu e cols., 2000). Os receptores P2X₂ e P2X₄ têm sua atividade intrínseca regulada pela fosforilação da proteína quinase C (PKC) e AMPc dependente de proteína quinase A (*cyclic AMP-dependent protein kinase A*). Como os receptores NMDA e AMPA modulam $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e levam a ativação de fatores de transcrição responsivos à proteína elemento ligante de AMPc (CREB). Quando ativados, os receptores P2X₂ e P2X₄ induzem aumento de $[Ca^{2+}]_i$ modulando a atividade de calmodulina que regula cAMP (AMP cíclico) em questão de segundos e de MAPKs em minutos. (Lin e cols., 2007, Berridge, 1998).

Tais dados corroboram com a importância das células P19 como modelo de estudo da diferenciação neural com padrão de diferenciação de progenitoras neurais semelhante à zona subventricular e do giro dentado do hipocampo murino quanto a expressão e atividade dos receptores purinérgicos (Mishra e cols, 2006, Lin e cols., 2007, Shukla e cols., 2005). Além do mais, as células P19, por serem pluripotentes, permitem estudar a sinalização envolvida na determinação do progenitor neural, uma vez que atividade de receptores purinérgicos foi verificada em estágio anterior a formação de CE. Tais dados podem ser comparados e complementados, uma vez que todas as informações provenientes são originárias de células murinas e animais *knock outs*. Além disso, Svendsen e cols. (1997) descrevem restrições no cultivo de precursores celulares de rato quando a divisão celular. Nossos dados de expressão de receptores de neurotransmissores como acetilcolina, NMDA e purinérgicos são semelhantes ao padrão de expressão e atividade no desenvolvimento do tubo neural, em progenitoras multipotentes de neuroesferas e em células progenitoras neurais NH15-CA2 (di-híbrido camundongo X rato)(Staines e cols., 1996; Niemann e Schaller, 1996;).

5.4 Efeito da presença de inibidores de receptores purinérgicos sobre os fenótipos neuronais obtidos durante a diferenciação neural das células P19.

Mesmo não possuindo inibidores ou ativadores seletivos aos diferentes subtipos de receptores purinérgicos, a participação de receptores purinérgicos foi identificada no reparo da epiderme através das drogas disponíveis. O tratamento com 1 mM ATP, $\alpha\beta$ metileno ATP, suramina, PPADS, reactive blue 2 ou 100 nM de TNP-ATP por 48 horas indicou que a participação do receptor P2X₃ é responsável pelo fluxo de cátions na homeostase da barreira epidérmica (Denda e cols., 2002). Greig e cols. (2003) identificaram o envolvimento dos receptores purinérgicos na proliferação de queratinócitos, na diferenciação e apoptose em epiderme fetal humano. Os receptores P2Y₁, presentes em células fetais de queratinócitos, atuam na proliferação celular. Os receptores P2Y₂, presentes em células da periderme, participam no controle de fluxo de cloreto e secreção de fluídos ao líquido amniótico. Coutinho-Silva e cols., (2005) relataram que os receptores P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₄ estão envolvidos com a proliferação celular e apoptose de linhagem celulares de carcinoma epitelial Caco-2 e HCT8.

No sistema nervoso a privação de oxigênio e glicose desencadeia isquemia que resulta em morte celular, a qual é estudada no modelo de fatias de hipocampo (organotípicas) CA1 e CA3/fascia dentata de rato. A expressão dos receptores P2X₂ e P2X₄ aumenta no processo de isquemia em diferentes extensões e nos diferentes tipos celulares. P2X₂ em corpos celulares neuronais localizados em CA1 e P2X₄ em microglias. Ocorre morte de células de hipocampo, córtex e estriato. A inibição da MAPk (proteína específica mitogênica ativada quinase ativadora) p42 e p44 após a isquemia por PD98059 ou U0126 resultou em proteção parcial dos danos. A aplicação dos antagonistas de receptores purinérgicos suramina (200 μ M) ou PPADS (5 a 300 μ M) resultou em neuroproteção na mesma magnitude como obtido na presença do bloqueador do canal do receptor de NMDA, MK801. Em ambas as condições a via de ERK1/2 MAP quinase foi inibida (Rundén-Pran e cols., 2005). Já Cavaliere e cols. (2003) preveniram muitos destes efeitos causados pela isquemia com o tratamento

prévio destas fatias hipocampais com 100 μ M de suramina ou basilen blue ambos com espectro de inibição ampla de receptores purinérgicos.

Em ensaios de *calcium imaging*, a combinação da aplicação de inibidores de receptores purinérgicos permitiu identificar quais subtipos de receptores purinérgicos envolveriam a proliferação celular em neuroesferas. Mishra e cols., (2006) utilizaram 100 μ M dos inibidores MRS2179, PPADS ou suramina e identificaram a participação do receptor P2Y₁ no processo da proliferação.

Para analisarmos o fenótipo resultante à alteração da atividade dos receptores purinérgicos, optamos por iniciar a diferenciação das células para formação de CE em suspensão na presença dos ligantes purinérgicos $\alpha\beta$ metileno ATP, suramina, reactive-blue, brilliant blue-2 e PPADS. Os corpos embriônicos foram mantidos por 48 horas nas diferentes concentrações de antagonistas ou agonistas para inibir ou ativar conjuntos de receptores purinérgicos. A análise dos tratamentos poderia nos indicar os subtipos de receptores purinérgicos envolvidos no processo de proliferação e agregação celular nos eventos precoces da diferenciação com formação de CE. Constatamos que a presença de suramina, reactive-blue 2, $\alpha\beta$ metileno ATP ou brilliant blue alteraram o tamanho dos CE (Fig.17), indicando a participação dos receptores P2Y e P2X₄. A análise consistiu na expressão de receptores no estágio indiferenciado e o padrão farmacológico de resposta analisados no item 4.4.1 (tabela 3 e 4).

As células se agrupam em forma de corpos embrióides ou embriônicos ativando sinalizações intracelulares e passem ao estágio de progenitores neuronais. Neste processo, há alterações no padrão gênico, protéico intracelular, morfológico e de citoesqueleto celular com variações espontâneas de cálcio intracelular (Czyz e Wobus, 2001). Após a adesão destas células à garrafa de cultura, há a expressão de um novo repertório de receptores purinérgicos, colinérgicos e de neurofilamentos intermediários nas células P19 e com aparecimento de neurofilamentos intermediários (Fig.16; Pyle cols., 2001; Paterno e cols., 1997).

Interferir no processo de formação de CE levando ao aumento desta estrutura pode resultar em necrose das células presentes no interior da massa devido ao déficit no transporte de nutrientes e oxigênio para o interior (Gerecht-Nir e cols, 2004). A presença dos agonistas ou antagonistas dos receptores purinérgicos interfere com a

sinalização de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ levando a alteração da morfologia celular no decorrer do processo da formação do progenitor neural. Tal fato foi verificado em condições de tratamento dos CE com RNA da biblioteca ciclo 9 P2X₄ (Fig.38C).

O espectro de neurotransmissores liberado pelos neurônios P19 reflete a distribuição homogênea de fatores bioativos na cultura celular. Foi constatado, que mesmo após a diferenciação, fatores protéicos solúveis são capazes de induzir neurônios imaturos a mudar o padrão de síntese de neurotransmissores (Gotz e cols., 1995). O neurotransmissor sintetizado pelo neurônio pode ser determinado pela origem celular de diferenciação e desenvolvimento ou por um mecanismo estocástico. Mudanças no padrão de frequência local e global de aumento de cálcio estão correlacionadas positivamente ao crescimento de neuritos e ao fenótipo neuronal de liberação do neurotransmissor GABA, respectivamente. (Ciccolini e cols., 2003). Borondinsky e cols., (2004) demonstraram que a alteração distinta de picos espontâneos de cálcio intracelular, pode resultar na diferenciação de diferentes classes de neurônios na medula espinhal embriônica, com mudanças na liberação de neurotransmissores, contudo sem modificação de marcadores fenotípicos da identidade celular. Em seus experimentos, a supressão da atividade de picos de cálcio resultou em neurônios com maior expressão de neurotransmissores excitatórios e menor número de neurônios com neurotransmissores inibitórios. Quando houve maior atividade dos picos de cálcio aumentou o número de neurônios com expressão de neurotransmissores inibitórios. O grupo estudou tal fenômeno através de superexpressão de canais retificadores de potássio (h.Kir.2.1) e através da aplicação de agentes farmacológicos bloqueadores de canais de cálcio ou ativadores de canais de sódio.

A fim de testar alterações no padrão de atividade dos receptores purinérgicos, de NMDA e colinérgicos nos neurônios formados, foram realizados ensaios de maturação neuronal na presença de agonistas/antagonistas dos receptores purinérgicos: brilliant blue, reactive blue 2, PPADS ou suramina na concentração de 1 μ M. Os neurônios advindos da diferenciação neuronal das células P19 têm atividade colinérgica e NMDA constatadas (Staines e cols., 1994, Morley e cols., 1995) e demonstrada em nossos experimentos (Fig.10).

A ativação ou inibição de receptores purinérgicos na fase de progenitores neurais até a maturação neuronal (dia 3 a 8 ou 9), resultou em células com atividade purinérgica mantida, mas em alguns casos sem atividade de receptores colinérgicos ou de NMDA, dependendo do inibidor utilizado durante a maturação neuronal. Através da análise farmacológica destes receptores (tabela 3) e do padrão de expressão dos receptores purinérgicos nas células progenitores neurais P19 (tabela 4), identificou-se a participação de receptores P2X₂ e P2Y₁ na inibição da atividade de receptores NMDA e P2X₂ e P2Y₂ na inibição colinérgica, analisado no item 4.4.2 (Fig.18). A avaliação simultânea do padrão de atividade de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ nestas células a aplicação de ATP/CCh por *calcium imaging* mostrou que o padrão de atividade de receptores purinérgicos e colinérgicos ficou alterado entre as células destes ensaios e os neurônios P19 controle (Fig.19). O padrão da expressão gênico dos receptores purinérgicos; P2X₂, P2X₄, P2X₇ e do receptor muscarínico M1 de acetilcolina, em neurônios P19, foi alterado em alguns destes tratamentos (dados não mensurados). Seria interessante fazer uma análise através de RT-PCR semi-quantitativo, PCR em tempo real ou do-marcação de receptores para averiguar a expressão de receptores nas células oriundas de tais tratamentos e sua distribuição célula a célula.

Anteriormente nosso grupo havia mostrado que a inibição de receptores B2 de cininas, pelo seu antagonista específico HOE-140, durante a diferenciação neuronal de células P19, resultou em neurônios sem atividade de receptores colinérgicos. Acreditamos que eventos sucessivos dinâmicos de sinalização são ativados pelos receptores B2 de cininas e purinérgicos, que levam no controle da expressão e da ativação alguns de receptores de neurotransmissão durante a maturação neuronal como de colinérgicos e de NMDA. Contudo, nossos dados indicam que a atividade purinérgica e colinérgica é fundamental em todo o processo, e coordena a diferenciação, pois apesar dos ensaios, sua atividade é identificada após os tratamentos. Os tratamentos iniciados no dia 3 de diferenciação de inibição de receptores P2 resultam na modificação da resposta colinérgica, anterior a inibição do receptor B2 de cininas (Fig.41).

A contribuição da atividade dos receptores purinérgicos principalmente de receptores metabotrópico como P2Y₁, no desenvolvimento do sistema nervoso, foi

demonstrada em neuroesferas murinas (Lin e cols., 2007; Mishra e cols., 2006). Entretanto Mishra e cols., (2006) sugerem a importância do receptor P2Y₂ no processo mas não puderam identificar a participação deste pela ausência de ligantes seletivos. A adição de ATP em cultura de células-tronco embrionárias murinas resultou em proliferação celular pelas vias de PKC, PI3K/Akt e MAPKs (Heo e Han, 2006). Arthur e cols., (2005) identificaram a participação do receptor P2Y₂ na diferenciação neuronal juntamente com neurotrofinas. Ambos os receptores, P2Y₂ e tirosina quinase A, na presença de fatores de crescimento aceleram o processo de diferenciação. Estudos utilizando neuroesferas de células do estriato embriônico de camundongo, incubadas 3 dias na presença de 100 µM de suramina ou MRS-2179, mostraram que o receptor P2Y₁ era responsável pelos transientes $\Delta[Ca^{2+}]_i$, proliferação e migração de progenitores neuronais. Não identificou-se variação quanto a expressão de nestina ou GFAP nas células tratadas (Scemes e cols., 2003).

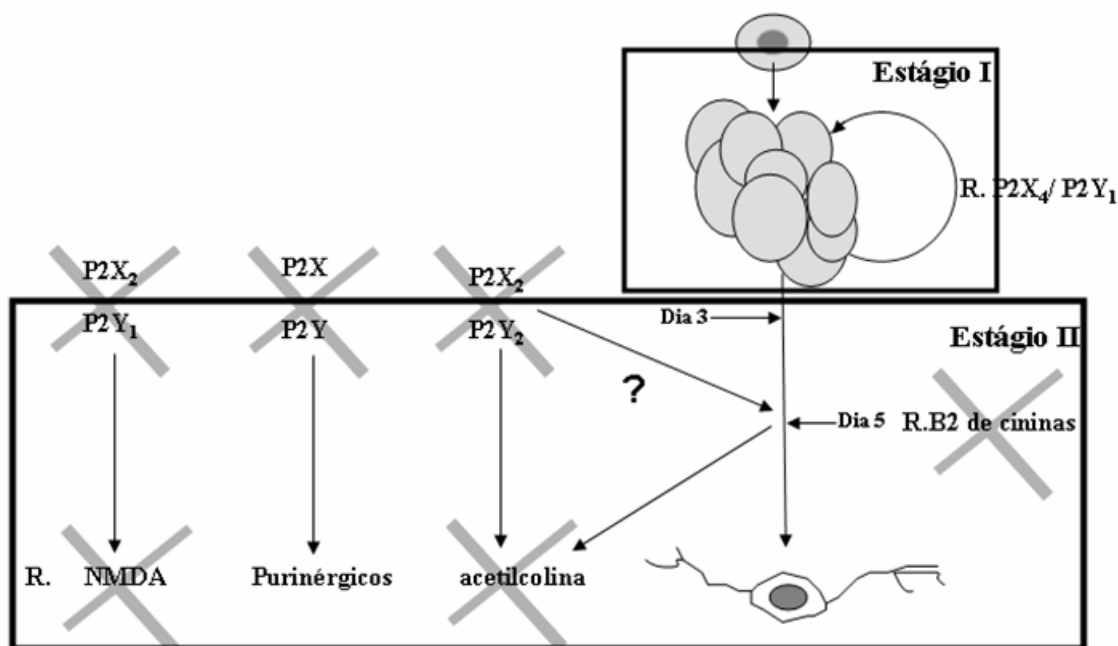


Figura.41 Participação dos receptores purinérgicos na diferenciação neuronal das células P19. Através de ensaios farmacológicos identificamos a importância dos receptores P2X₄ e P2Y na formação de corpos embriônicos (CE) (estágio I). A inibição dos receptores purinérgicos P2X₂ e P2Y₁, durante a maturação neuronal, resultou em células sem atividade dos receptores de NMDA. O bloqueio farmacológico dos receptores P2X₂ e P2Y₂ reduziu a atividade colinérgica das células dias 8 ou 9. A atividade dos receptores purinérgicos manteve-se nas células dia 8 ou 9 (estágio II). Dados obtidos pelo nosso grupo mostraram que a inibição de receptores B2 de cininas, no dia 5, resultou em células diferenciadas no dia 8 sem atividade de receptores colinérgicos. Nossos dados sugerem que o sistema purinérgico participe em todo o processo de diferenciação inclusive em fases mais precoces.

A importância dos receptores ionotrópicos no processo de diferenciação foi identificada inicialmente em mioblastos, onde identificou o receptor P2X₅ envolvido nas vias de sinalização necessária a diferenciação muscular esquelética (Ryten e cols., 2002). O receptor P2X₅ é expresso em células satélites. A ativação de receptores P2X inibiu a proliferação, estimulou a expressão de marcadores de diferenciação muscular, incluindo miogenina, p21 e miosina de cadeia pesada e aumentou a taxa de formação de

miotubos. Além disso, demonstrou-se que a aplicação de ATP resultou no aumento significativo e rápido da fosforilação de MAPKs, principalmente de p38, e que a inibição da atividade de p38 preveniu o efeito de ATP nas células. Estes resultados não somente demonstraram a existência de um modulador de diferenciação esquelética o ATP, mas um novo papel desempenhado pelos receptores P2X no controle do destino final de diferenciação celular (Ryten e cols., 2002). No desenvolvimento do coração humano, foram identificados a expressão dos receptores P2X₁, P2X₃, P2X₄, P2Y₆ e P2Y₂ sugerindo sua participação no desenvolvimento e na atividade orgão (Bogdanov e cols., 1998; Sandona e cols., 2005).

A decisão celular de replicar-se ou de diferenciar-se é dependente da integração de múltiplas vias de sinalização, da densidade celular, do estágio metabólico, da viabilidade do ligante, do tipo e níveis de expressão de receptores e *cross-talking* de vias intracelulares distintas (Sommer e Rao., 2002). A compreensão da participação dos receptores purinérgicos em processos biológicos é necessária para o conhecimento do amplo papel desta molécula em tróficos celulares, como a diferenciação e tipo neuronal específico. Conhecimento que pode ser aplicado em indução de progenitores exógenos ou ainda no recrutamento de células-tronco neurais induzindo a migração e diferenciação a fenótipos especializados em locais específicos. As células -tronco embrionárias originadas podem ser utilizada em modelos animais para testes de drogas neurais e neuronais, na pesquisa e desenvolvimento de métodos terapêuticos, na cura de doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, doença de Huntington e Parkinson, as quais afetam milhões de pessoas ao redor do mundo e resultam em dispendioso gasto no tratamento todos os anos.

Os camundongos *knock outs* têm sido gerados e empregados para compreensão do papel de cada subtipo purinérgico. Além da utilização de inibidores específicos, Mishra cols., (2006) empregaram células destes animais para o estudo dos receptores em neuroesferas e identificaram a participação dos receptores P2Y₁ e P2Y₂ nos processos de proliferação celular e eventos transientes de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. Através da utilização de camundongos *knock-out* ao receptor P2X₄, identificou se alterações na região CA1 do hipocampo. As potenciações de longo-termo (LTP) nas sinapses colaterais de Schaffer reduziram consideravelmente em relação ao controle, sugerindo a participação

em processos de alta frequência de estimulação (Sim e cols., 2006). No sistema vascular, o camundongo *knock-out* P2X₄ apresenta nas células endoteliais padrão alterado de influxo de cálcio e na produção potente vasodilatador óxido nítrico (NO). Os animais apresentam pressão sanguínea alta e excreção baixa de metabólitos de NO. Os vasos sanguíneos têm tamanho reduzido em resposta a crônica redução do fluxo sanguíneo sugerindo a participação do receptor em mecanismo sensíveis a regulação sanguínea e a remodelagem vascular (Yamamoto e cols., 2006).

Associada a identificação do papel do sistema purinérgico e de seus receptores nos passos cruciais da diferenciação neuronal, esta a necessidade do desenvolvimento de ligantes específicos a cada subtipo de receptor purinérgico. Os agonistas ou antagonistas purinérgicos disponíveis além de ativarem ou inibirem de forma pouco seletiva os receptores P2 receptores ionotrópico e metabotrópico em geral, atuam em alguns casos em outros receptores e proteínas de membrana. Suramina e PPADS agem em receptores P2X e P2Y e os ligantes reactive blue-2, brilliant blue e $\alpha\beta$ metileno ATP são seletivos aos receptores ionotrópicos (Tabela 3). A suramina, além de inibir a atividade de receptores P2X e P2Y, atua como desacoplador da proteína G de seus receptores, inibe a fosfolipase C e os ligantes da célula a EGF, PDGF (*Platelet-derived growth factor*) e TNF- β . (*Tumor necrosis factor*) (McCain e cols., 2004).

A utilização de bibliotecas combinatórias é promissora e pode permitir a seleção de inibidores específicos a estes receptores. Utilizamos a técnica SELEX com este objetivo (Fig.7) que consiste na utilização de uma biblioteca combinatória de oligonucleotídeos constituída de 10^{13} a 10^{15} seqüências diferentes para identificar inibidores específicos aos receptores P2X₂ e P2X₄.

5.5 Caracterização das células 1321N1 transfectadas com os receptores P2X₂ e P2X₄ de rato

Para iniciar a seleção de inibidores específicos aos receptores, utilizamos a linhagem imortal humana de células de astrocitoma 1321N1 humanas as quais foram previamente caracterizadas por não expressarem nenhum receptor purinérgico (Parr e cols., 1992). Estas células receberam o vetor PLSXN (Clontech) no laboratório do Dr. Weissman (University of Missouri, EUA) com os receptores P2X₂ (PLSXN-P2X₂), P2X₄ (PLSXN-P2X₄) ou P2X₇ de rato (PLSXN-P2X₇) ou ainda o vetor vazio PLSNX.

As células inicialmente foram caracterizadas para identificação dos receptores, gênica (RT-PCR com a utilização de *primers* específicos), protéica (imunofluorescência) e testes funcionais de *patch-clamping* em *whole cell recording* ou *calcium imaging* a fim de detectar atividade dos receptores (Fig.21, 22, 23, 24). A ausência de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ após aplicação de $\alpha\beta$ metileno, característica do receptor P2X₄ de rato foi identificada no receptor transfectado, assim como a indução de baixa corrente ativada por ATP (Jones e cols., 2000).

Nosso grupo realizou uma caracterização cinética do receptor P2X₂ em *patch clamping* em *Whole cell recording*, da inibição promovida TNP-ATP (2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil) adenosina 5'-trifosfato) e da suramina. Constatou-se que a inibição de TNP-ATP ocasiona inibição do tipo competitivo e de suramina ao receptor P2X₂ era do tipo não competitivo, questão que ainda permanecia controversa na literatura e resultou na publicação de tais dados (Trujillo e cols., 2006). Os estudos realizados foram com a aplicação de ATP e a co-aplicação de ATP + TNP-ATP ou ATP + suramina. A ativação de corrente induzida pela aplicação de 100 μ M de ATP resulta em receptores predominantemente no estado aberto e atinge seu valor máximo de abertura em 80 milissegundos. O receptor é rapidamente ativado mas possui cinética lenta dessensitização na presença de ATP de $0,45 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$. A co-aplicação de ATP + TNP-ATP reduziu a corrente ativada comparado ao controle mas sem alteração do coeficiente de dessensitização do receptor. A co-aplicação de suramina + ATP resultou em redução da corrente comparado ao controle e na mudança no coeficiente de dessensitização do

receptor a $0,7 \pm 0,17 \text{ s}^{-1}$. A corrente ativada pelas diferentes concentrações de ATP, de 1 a $1.000 \text{ }\mu\text{M}$ resultaram numa variação de 10 a 4.971 pA . Determinou-se EC_{50} de ATP, concentração necessária para ativação de 50% de resposta, de $42 \pm 2 \text{ }\mu\text{M}$ com o slope de Hill de $2,11 \pm 0,04$ indicando a presença de três sítios de ligação de ATP no receptor. A constante de dissociação determinada foi de $38 \pm 2 \text{ }\mu\text{M}$. Já o valor do IC_{50} , concentração necessária para inibição de resposta a 50% de TNP-ATP foi de $9,4 \pm 0,9 \text{ }\mu\text{M}$ e de suramina foi de $34 \pm 2 \text{ }\mu\text{M}$. A aparente constante de dissociação determinada foi de K_x de $38 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$, menos eficiente que TNP-ATP de acordo com dados previamente descritos (Khakh e cols., 2001; Honore e cols., 2002).

Ensaio de ligação radioligante-receptor nas células 1321N1 transfectadas com o receptor P2X_4 indicaram o IC_{50} de $41,36 \text{ nM}$ (Fig.24A). Através de experimentos de saturação e análise dos dados no gráfico de saturação mostrou-se que há 3 sítios de ligação de ATP com expressão de 120 pmol do receptor por mg de proteína. Os dados obtidos foram semelhantes aos descritos na expressão do receptor nas células CHO-k1 pelo sistema de transfecção por Semlike Forest Virus de 151 pmol/ml (Michel e cols, 1997). (Fig.24 e Trujillo e cols., 2006).

Jones e cols., (2000) realizaram um estudo comparativo de caracterização de ortólogos de receptores P2X_4 de humano, camundongo e rato. Identificou-se que $\alpha\beta$ metileno ATP é um antagonista do receptor de rato e agonista parcial dos receptores humano e de camundongo (Jones e cols., 2000; Buell e cols., 1996; Collo e cols., 1996). A aplicação de $10 \text{ }\mu\text{M}$ de ATP no receptor de rato resultou em $82 \pm 21 \text{ pA}$ de corrente com ativação do receptor em $468 \pm 36,5 \text{ ms}$. O EC_{50} determinado de ATP neste receptor foi de $5.5 [2,6-11,6] \text{ }\mu\text{M}$.

Foram realizados ensaios de ligação radioligante-receptor com (^{32}P) ATP com excesso de suramina ou $\alpha\beta$ metileno ATP utilizando células 1321N1 vivas transfectadas com os receptores P2X_2 ou P2X_4 . O excesso de $\alpha\beta$ metileno ATP deslocou o radioligante de ambos os receptores, suramina deslocou 24% do radioligante do receptor P2X_2 , não ação nos P2X_4 . A suramina não teve efeito de inibição neste receptor (Jones e cols., 2000; Buell e cols., 1996). Após caracterização dos receptores quanto a expressão e atividade, foram iniciados a seleção de inibidores por SELEX utilizando suramina (antagonista não competitivo) e $\alpha\beta$ metileno ATP (agonista competitivo) que foram

utilizados como competidores respectivamente da biblioteca de RNA resistentes a nucleases ligado aos receptores.

5.6 A técnica SELEX e os ciclos de enriquecimento de seqüências

Em nosso sistema de diferenciação, membros do grupo identificaram a expressão crescente da subunidade P2X₆ ao longo da diferenciação neuronal das células P19, no estágio de maturação neuronal (Da Silva e cols., 2006) levando nos a acreditar na possibilidade de expressão de heteromultímeros de receptores purinérgicos como P2X₄/P2X₆. A utilização de técnicas de *knock down* gênico poderia alterar todo o padrão de expressão de receptores purinérgicos na diferenciação favorecendo a associação da subunidade P2X₆ a outras tornando mais complexo a análise da importância do receptor P2X₄ no processo. O ligante $\alpha\beta$ -metileno ATP inibe somente o receptor P2X₄, mas não o heteromultímero P2X₄/P2X₆ (North e Surprenant, 2000). Um aptâmero desenvolvido ao receptor P2X₄ provavelmente pode não interferir com a ação de P2X₄/P2X₆ formado, o que pode ser testado. Devido a tais fatos, acreditamos que a técnica SELEX seria mais propícia na inibição específica do receptor P2X₄.

Em nosso caso, como o alvo era a porção extracelular dos receptores e optamos pela utilização da biblioteca de RNA resistente a nucleases. Para os procedimentos de SELEX apresentadas nesta tese, foram empregadas moléculas de RNA com ribonucleotídeos de pirimidina modificados no anel da ribose na posição 2'OH por 2'F a fim de aumentar a estabilidade da molécula em meio fisiológico.

O tamanho da porção randômica da biblioteca de SELEX pode variar de 25 a 75 bases. Para a nossa seleção utilizamos um molde de biblioteca contendo 40 posições randômicas, semelhante a já foi utilizada em outras seleções e que se mostrou satisfatória (Bartel e Szostak, 1993; Shi e cols., 1997; Ulrich e cols., 1998; Ulrich e cols., 2002). A diversidade de seqüências utilizando tal biblioteca atinge 10¹³ moléculas diferentes com 40 posições randômicas. O processo de síntese da segunda-fita complementar e de amplificação da biblioteca inicialmente de cDNA foi todo padronizado para em seguida ser transcrito *in vitro* para geração da biblioteca de RNA resistente a nucleases (Fig.25).

Para fins terapêuticos, o alvo de seleção pode ser o ligante extracelular ou receptor de membrana. Contudo pela possibilidade do ligante poder ter múltiplas funções e interagir com diferentes receptores além do alvo, torna conveniente a seleção de ligantes ao domínio extracelular dos receptores, o qual torna a seleção de SELEX complexa (Ulrich e cols., 1998). Neste caso, deve se apresentar o receptor embebido na membrana ou células inteiras em sua conformação nativa. Além da presença do receptor, diversas outras proteínas estão presentes na superfície extracelular da membrana, levando em alguns casos o emprego de um competidor a fim de se recuperar o RNA ligado somente ao sítio alvo no receptor (Fig.6) (Ulrich e cols., 1998). Neste tipo de seleção requer-se 10-25 ciclos reiterativos de seleção comparado a proteínas purificadas solúveis as quais requerem de 7 a 15 ciclos para identificação de aptâmeros com ligação específica. A seleção *in vitro* de aptâmeros de RNA não modificados a proteína purificada citoesina 1 resultou em 61% de aptâmeros de apenas um tipo após 13 ciclos de seleção com afinidade que variou de 4 a 48 nM (Mayer e cols., 2001). A seleção de aptâmeros de DNA contra a L-seletina resultaram na identificação de três seqüências conservadas após 17 ciclos com afinidade na ordem de 1,8 a 10 nM (Hicke e cols., 1996). A seleção de aptâmeros de DNA em alvos complexo como na membrana de eritócitos, resultou numa afinidade aumento em 10 vezes após 25 ciclos de seleção de aptâmeros de DNA. Identificou-se duas regiões conservadas com afinidade na ordem de 1,6 a 1,8 nM. A utilização de SELEX na identificação de aptâmeros de RNA não modificados ao receptor de acetilcolina, alvo complexo, resultou após nove ciclos duas famílias de seqüências conservadas com afinidade na ordem de 2 a 12 nM (Ulrich e cols., 1998). Ulrich e cols., (2002) identificaram aptâmeros de RNA resistente a nuclease a receptores envolvidos adesão e invasão de *Trypanosoma cruzi* no interior da célula e após 8 ciclos de seleção identificou-se aptâmeros com afinidade variando de 40 a 240 nM aos receptores das proteínas fibronectina, trombospondina, heparan sulfato e laminina. Durante os ciclos de seleção de aptâmeros aos receptores P2X₂ e P2X₄ identificamos o enriquecimento de seqüências com afinidade a proteínas de membrana celular já no ciclo 3 (Fig.28) e a avaliação de característica inibitória das seqüências selecionadas no ciclo 5 em ambas as seleções P2X₂ e P2X₄ (Fig.29 e 30). Moléculas de RNA ciclo 5 P2X₄ inibiram o receptor P2X₄ na concentração de 250 nM em

experimentos de *calcium imaging*. Por *patch clamping* em *whole cell recording* 1 μM do RNA ciclo 5 P2X₂ quando co-aplicado com 100 μM de ATP resultou na inibição da corrente ativada por ATP em 37% (Fig.29).

No ciclo 9 P2X₄, o RNA 1 μM co-aplicado com 100 μM de ATP resultou na inibição da corrente ativada por ATP em 80%. O enriquecimento do RNA com ligação ao receptor durante os ciclos de SELEX foi avaliado em ensaios de *gel shift*. As bandas foram densitometradas e os RNAs dos últimos ciclos tiveram maior ligação ao receptor. Os RNAs das bibliotecas ciclo 11 -P2X₂ e ciclo 9- P2X₄ foram transcritos para cDNAs, clonadas, seqüenciadas e comparadas para verificação de sequências conservadas (Fig.31).

Neste ensaio, 4 ciclos de (³²P) RNA resistente a nucleases P2X₂ (ciclo 1, 2, 6 e 8) foram incubados com o extrato de membrana sem o receptor. As ligações mais forte ao receptor foram observados utilizando RNAs dos ciclos iniciais 1 e 2. Já nos ciclos 6 e 8 houve baixa ligação de RNA Estes ciclos iniciais contêm RNA que se liga de modo não seletivo a outras proteínas de membrana (Fig.31).

Bock e cols (1992) relataram que já no quinto ciclo de seleção, 30% dos aptâmeros selecionados possuíam afinidade a trombina, alvo da seleção e que inibiam em 50 % a atividade da trombina protease na concentração de 25 nM. Comparado com o primeiro ciclo de seleção na qual apenas 0,01% do RNA presente na biblioteca randômica se ligou ao sítio alvo, até 40% do RNA do quinto ciclo mostrou ligação específica.

5.7 Caracterização de seqüências identificadas

No caso de aptâmeros selecionados como compostos foram identificado atividade alostérica destes ao receptor nicotínico de acetilcolina, seleção na qual se identificou duas classes de seqüências (Ulrich e cols., 1998). Em ensaios de *patch clamping* em *whole cell recording configuration*, as seqüências tinham capacidade de modular sua atividade, protegendo-o da ligação de outros ligantes ou levando-o ao estado conformacional estável inativo (Hess e cols., 2000).

Tais dados sugerem que mesmo utilizando um competidor para recuperação dos RNAs especificamente ligados ao sítio alvo ao longo do processo de seleção, as seqüências identificadas podem ligar-se de modo semelhante ao sítio do competidor ou em regiões próximas e induzir uma mudança conformacional da proteína como efeito alostérico, resultando na dissociação do RNA ligado ao sítio alvo. Portanto, no fim do experimento de SELEX identificou-se mais de uma classe estrutural de seqüências com possivelmente diferentes afinidades ao sítio alvo. No caso do experimento publicado por Ulrich e cols. (1998), os aptâmeros classe I estrutural foram deslocados da sua ligação ao receptor por cocaína com IC₅₀ de 500 µM e a classe II com IC₅₀ de 110 µM. Em experimentos de *patch clamping* em *whole cell recording* foi observado que as interações dos aptâmeros referentes às classes I e II com o receptor nicotínico não eram no mesmo local no receptor e que aptâmeros das duas classes agiram alostericamente sobre o receptor estabilizando diferentes conformações do receptor. Aptâmeros da classe I ligavam-se ao sítio regulatório na conformação fechada do receptor com alta afinidade de modo semelhante à cocaína e da droga anticonvulsiva MK801 e a classe II ligavam-se no sítio regulatório do receptor com afinidade maior ao receptor aberto.

Um aptâmero já identificado de RNA resistente a nucleases promissor na terapia contra o cancer é o inibidor do receptor de tirosina quinase RET D4 o qual leva a inativação da via de sinalização. O receptor expresso constitutivamente está envolvido na causa de diversas neoplasias endócrinas (MEN). Através da combinação de ciclos de enriquecimento utilizando células PC12 transfectadas com RET e de seleção negativa com células PC12 transfectadas com o receptor mutado, identificou-se duas seqüências consenso extremamente conservadas de 67 seqüências D4 e D24 com o K_d variando de 30 a 70 nM que resultaram na inibição da autofosforilação do receptor e da via intracelular de sinalização mediada de ERK. Por ensaios de dose resposta identificou-se que a concentração de 200 nM de D4 inibia a autofosforilação do receptor em até 70% e que havia redução drástica da fosforilação de ERK (Cerchia e cols., 2005).

Outro receptor envolvido com o cancer e alvo de seleção foi receptor 3 do fator de crescimento epidermal humano (*human epidermal growth factor receptor 3-HER3*), membro da família de tirosina quinase e que está super-expresso em diversos carcinomas. O receptor HER2 está superexpresso em 20 a 30% dos casos de cancer de

mama. Ao contrário de HER2, HER3 quinase deficiente se auto-associa na concentração de nmolar na ausência de ligantes, as várias formas de hergulinas (hrg). A ligação de hrg interrompe a oligomerização de HER3 e leva a formação de heterodímeros funcionalmente competentes a sinalização com HER2. O aumento da concentração de HER3 resulta em resistência a droga pelo paciente. Através de SELEX, identificou-se que o aptâmero selecionado A30 liga-se ao estado oligomérico do receptor HER3, mas não no mesmo sítio de hrg. A ligação de hrg ao oligômero HER3 resulta num aumento de afinidade aos sítios de ligação de HER3 em 10 X e mas com o aptâmero há o aparecimento de novos sítios de ligação com menor afinidade. A alta afinidade de ligação de A30 ao HER3 levou a inibição hrg dependente da fosforilação de tirosina de HER2 e do crescimento induzido por hrg nas células MCF7 (Chen e cols., 2003). Após a análise de 88 clones identificou-se 29 seqüências. Seis deles foram utilizados em ensaios com células e o resultado do *Western blotting* revelou que A30 inibia a fosforilação de HER2. Contudo não se identificou a região consenso como motivo estrutural comum em todos aptâmeros selecionados.

Nas seleções de aptâmeros ao receptor P2X₄ foram identificadas 28 seqüências com várias delas sendo idênticas e com maior representatividade como o aptâmero A132 que foi identificado 8 vezes (Fig.33). Diversas regiões conservadas foram identificadas entre os aptâmeros os quais estão indicados na figura. Ensaios de ligação radioligante receptor indicaram maior atividade inibição de 30 a 80% da corrente induzida por ATP utilizando os aptâmeros A43, A51, A81 e A114.

Foram identificadas 16 seqüências no ciclo 11 P2X₂ as quais originaram duas classes de seqüências. Através de testes de ligação radioligante-receptor, aptâmeros de ambas as classes foram deslocadas dos seus sítios alvo na presença de excesso de suramina em 40% e um aptâmero da classe II inibiu a corrente induzida de ATP no receptor 38% ±9 na concentração de 1 µM. Serão necessárias mais medidas de *patch clamping* em *whole cell recoding* a fim de determinar diferenças nas propriedades dos aptâmeros de classes I e II em ligar ao receptor P2X₂.

Nossos dados indicam diferença de afinidade de ligação ao receptor entre aptâmeros P2X₄ selecionados pela variação de inibição da corrente induzida por ATP na co-aplicação de 1 µM de cada aptâmero. Provavelmente os aptâmeros não se ligam

exatamente ao sítio do competidor e sim em regiões próximas. Pode estar ocorrendo variação quanto ao tipo de interação do grampo formado do aptâmero com os aminoácidos do sítio alvo.

5.8 Estrutura secundária dos aptâmeros

Utilizando o programa desenvolvido de Zuker (1989), M-FOLD, é possível fazer predições quanto a estrutura secundária dos aptâmeros identificados. A estrutura tridimensional dos aptâmeros nuclease resistente contra o receptor RET, D4 e D24 são muito semelhantes, todavia o grampo formado de D4 conservado contém 6 ribonucleotídeos e D24, 8 ribonucleotídeos. Os grampos formados pelos dois aptâmeros não são idênticos (Cerchia e cols., 2005). O programa leva em conta a energia livre mínima necessária para aquisição da estrutura, a temperatura e condições salina, mas não faz a predição utilizando os ribonucleotídeos modificados que resultam em aptâmeros mais estáveis ao final da seleção. Ulrich e cols., (1998) utilizaram este programa para a predição das estruturas das classe I e II identificadas e constatou diferenças estruturais entre aptâmeros de diferentes classes quanto a forma e o tamanho dos grampos formado de 7 a 8 ribonucleotídeos, tamanho do sítio de ligação do competidor.

O aptâmero identificado durante esta tese com maior atividade de inibição do receptor P2X₄, A81 forma um grampo composto de 7 ribonucleotídeos sendo a predição do M-FOLD de energia livre é de -32,3 kcal/mol. A estrutura do grampo formado contém a seqüência consenso do aptâmero A51 corresponde a 6 ribonucleotídeos, já A43 tem três conformações preditas em com energia livre muito próxima, mas todas geram um grampo muito grande de 30 ribonucleotídeos comparado com A81 ou A51 (Fig.36). Dentre as duas famílias I e II de aptâmeros P2X₂, apenas a família I forma um grampo de 5 ribonucleotídeos com a seqüência consenso, o que não foi identificado na família II que possui o grampo com a interação das porções constantes do aptâmero.

A identificação do grampo funcional é necessária e deve se fazer uma síntese truncada desta porção para evitar interações não específicas dos ribonucleotídeos sem função presente no aptâmero. A identificação da porção funcional pode ser realizada por

estudos utilizando o M-FOLD e predição confirmada por lise parcial de aptâmeros ligados a seu alvo para determinar a região funcional. Uma vez determinada, troca-se as ribonucleases modificadas para não modificadas e o novo teste deve ser feito para confirmar a atividade, caso esta seja perdida, re-insere-se novamente o ribonucleotídeo modificado e é identificada a posição crítica de ligação do aptâmero ao alvo (Gold, 1999). São realizadas modificações pós SELEX nos aptâmeros com a incorporação de 2' O metil açúcar. Tais aptâmeros podem ser utilizados em testes pré-clínicos e clínicos (Gold, 1999).

5.9 Inibição de receptores purinérgicos nas células PC12 e P19 utilizando os aptâmeros selecionados

Os aptâmeros selecionados aos receptores P2X₂, P2X₄ ou RNAs do ciclo 9 P2X₄ foram utilizadas em sistemas nos quais os receptores expressos são selvagens para confirmar os dados de inibição obtidos com os receptores. Após identificar a especificidade de ligação do RNA resistente a nucleases ciclo 9 P2X₄ a este receptor e não aos receptores P2X₂ ou P2X₇ (Fig.30), ensaios de atividade funcional foram realizados em células com expressão selvagem do receptor. Por já termos previamente identificado a expressão do receptor no estágio indiferenciado P19 e PC12, estas foram utilizadas nos experimentos de formação de CE na presença de RNA nucleases resistente e *patch clamping* em *whole cell recording* respectivamente (Fig.13 e 16).

Como mostrado na introdução, os CE são agregados celulares tridimensionais formados em suspensão celular. Nesta fase ocorrem oscilações intracelulares espontâneas de cálcio que resultam o fenótipo celular de progenitor neuronal. De acordo com Resende e cols., (2007b), ocorre a expressão dos receptores P2X₃, P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆ no estágio indiferenciado celular. Nossos dados mostraram que o receptor P2X₄ é um dos envolvidos no processo de formação de corpos embrionários (Fig.17).

O RNA ciclo 9 P2X₄ foi incubado em diversas concentrações com as células P19 para indução da formação de CE. Na concentração de 2,5 nM de RNA houve aumento de CE maiores que 7 e menores que 24 ua de 5% e 2,5% quando comparado ao

controle na presença de RNA do ciclo 0 comparado ao controle (Fig.38A). Numa concentração maior de 25 nM houve redução da distribuição de CE de pequeno tamanho, de 0,1 a 2 ua, mas sem aumento de CE maiores que 5 ua. Estes CE foram cultivados de modo semelhante ao controle a fim de finalizar a diferenciação neuronal. Houve diferenciação de células com morfologia modificada (Fig.38B). Mais estudos serão necessários para caracterizar tais alterações e da participação do receptor na determinação do progenitor neural P19. Contudo estes dados sugerem haver a participação deste receptor no processo, já mostrada anteriormente nesta tese através de ensaios farmacológica deste receptor com agonistas e antagonistas purinérgicos (Fig.17). Na concentração de RNA de 200 nM houve depleção da formação de CE, tal fato não é verificado em ensaios na presença de RNA ciclo 0 no qual há formação de CE de maior tamanho comparado ao controle. Tais dados sugerem que o receptor P2X₄ efetivamente esteja participando no processo de diferenciação precoce para a formação de CE da determinação do progenitor neural P19. Em baixas concentrações, a inibição do receptor é parcial o que viabiliza a formação de CE, o que não é verificado com 200nM. Cerchia e cols., (2005) utilizaram em seus ensaios celulares funcionais a concentração de 200 nM de aptâmero D4 na inibição da fosforilação de ERK. Nosso grupo identificou a variação da distribuição de tamanho de CE sob adição de 1 µM de HOE-140 (Martins e cols., 2005). Nossos dados indicam que as oscilações da concentração de cálcio intracelular nas células nesta estrutura são mediadas além pelos canais de cálcio pelos receptores de neuropeptídeos e neurotransmissores.

O RNA ciclo 9 P2X₄ foi aplicado nas células num estágio anterior, em células indiferenciadas P19 na concentração de 250 nM co-aplicado com ATP ou com αβ metileno ATP. Através dos dados de expressão de receptores purinérgicos presente na tabela 4, fizemos uma análise farmacológica de inibição de receptores presentes P2X₃, P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆. A aplicação somente de ATP e de αβ metileno ATP ativa todos os receptores presentes, a co-aplicação de ATP e o RNA leva a inibição somente do receptor P2X₄ (Fig.38B). A aplicação de αβ metileno ATP + 250 nM de RNA somente ativa o receptor P2X₃ indicado nas setas (Fig.38C). Para analisar tais dados, um gráfico com a variação de fluorescência foi montada e que indicou redução de fluorescência na condição Fig.38C em relação a Fig.38B. Os dados sugerem que o

RNA estável selecionado é específico ao receptor P2X₄ e não aos receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2X₃. Não houve depleção da resposta. Contudo mais análises devem ser realizadas.

O RNA ciclo 9 P2X₄ foi testado em células PC12 indiferenciadas. As células PC12 foram utilizadas como modelo em ensaios de eletrofisiologia porque as células P19 não formam selo de fechamento a pipeta com suficiente resistência para serem utilizadas nos ensaios de *patch-clamping*.

Identificou-se que a aplicação de 300 µM de ATP era capaz de ativar a corrente máxima dependente de receptores purinérgicos nestas células em experimentos de *whole cell recording*. Os receptores P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ e P2X₆ foram identificados como expressos nestas células (Arslan e cols., 2000). Dubyak e el-Moatassim (1993) não identificaram o receptor P2X₇ em células PC12. A co-aplicação de ATP + 5 µM de αβ metileno ATP leva a inibição de corrente ativada somente do receptor P2X₄ de rato. A co-aplicação de 2 µM de RNA nuclease resistente ciclo 9 P2X₄ resultou em semelhante redução de corrente ativada por ATP na co-aplicação de αβ metileno ATP, não havendo interferência na ativação de outros receptores purinérgicos. Estes dados indicam especificidade de inibição do RNA ciclo 9 P2X₄ a atividade do receptor P2X₄ de rato.

Ensaio de *patch clamping* em *whole cell recording* utilizando a família conservada II P2X₂ identificou a capacidade do aptâmero identificado de inibir resposta ativada por ATP nestes receptores selvagens PC12 (Fig.35B). O aptâmero A63 foi co-aplicação com ATP e resultou na inibição de 21% da corrente ativada pela aplicação de 100 µM de ATP. Tais dados indicam que o aptâmero A63 reconhece e inibe receptores selvagens presentes nas células PC12.

Os mesmos experimentos serão realizados utilizando aptâmeros com seqüências conservadas da família I P2X₂, inclusive em outros receptores purinérgicos a fim de verificar a seletividade de ligação dos aptâmeros aos receptores.

5.10 Perspectivas

Nosso grupo identificou a expressão de receptores purinérgicos nas células NH15-CA2 e ao longo da diferenciação neuronal das células P19. Nossos dados identificaram que estes receptores estão envolvidos na formação de corpos embriônicos e na determinação neuronal, receptores P2X₄ e P2Y₂. A atividade dos receptores P2X₂ e P2Y₂ modula o fenótipo de neurônios P19 muscarínicos e P2X₂ e P2Y₁, os glutamatérgicos de NMDA nos neurônios originados. Tais dados corroboram com a participação de receptores de neurotransmissão em processos precoces do desenvolvimento e diferenciação de receptores purinérgicos. Pela ausência de inibidores seletivos, utilizamos a técnica SELEX para identificar inibidores aos receptores P2X₂ e P2X₄.

Na diferenciação neuronal, os aptâmeros utilizados podem ser utilizados em específicos estágios celulares nas quais os receptores estejam expressos para identificar sua participação no processo. Faz-se necessário a avaliação das células P19 originárias dos tratamentos farmacológicos a fim de identificar se a inibição purinérgica não compromete a morfologia neuronal das células P19. Uma vez avaliada, testes para identificar as características funcionais serão necessárias. A inibição de receptores em estágio de maturação neuronal pode ser uma estratégia importante para direcionar a diferenciação ao tipo de fenótipo neuronal desejado.

Os nossos dados indicam que RNA selecionado ao receptor P2X₄ tem atividade inibitória sobre este receptor e não se liga aos receptores P2X₂ ou P2X₇, inclusive por *patch clamping* em *whole cell recording* não houve inibição da corrente ativada pela aplicação de ATP em ensaios de co-aplicação ATP. Identificou-se conservação de duas famílias durante as seleções de SELEX ao receptor P2X₂, as quais se ligaram ao receptor e que foram deslocadas por excesso de suramina. A família II testada em *patch clamping* em *whole cell recording* mostrou atividade inibitória ao receptor. Após 9 ciclos de seleção de inibidores específicos ao receptor P2X₄, as seqüências identificadas possuíam conservação de seqüências entre si. Diversos aptâmeros identificados tiveram grande representatividade entre os clones identificados. Ensaios de ligação radioligante

receptor identificaram alguns aptâmeros promissores os quais foram testados funcionalmente por *patch clamping* e que se mostraram com atividade inibitória. Ambas as seleções originaram aptâmeros com capacidade de reconhecimento aos receptores selvagens. Os ensaios de especificidade de ligação aos receptores alvo podem ser realizados em células que expressem o receptor e comparadas as células com subexpressão do receptor (com a utilização de RNA de interferência ou células de animais *knock outs*).

Nesta tese é apresentada pela primeira vez seleção de aptâmeros específicos dois subtipos de receptores de neurotransmissão, os quais são ativados pelo mesmo agonista, ATP. Os aptâmeros identificados são específicos aos subtipos selecionados, não havendo inibição de aptâmeros P2X₂ ao receptor P2X₄ e vice versa. Estes dados convergem com a identificação de um maior papel do RNA dentro da célula, como do RNA estar envolvido como mecanismo de defesa celular contra vírus, da regulação da transcrição e tradução do RNA mensageiro através de microRNA ou pelo identificado pelo grupo do Professor Sergio Verjovski-Almeida e do Dr. Eduardo Reis de que RNA intrônico antisense envolvido com o cancer de próstata (Reis e cols., 2004). Os aptâmeros ou intrâmeros poderiam estar reproduzindo mecanismos de regulação gênica já presentes na célula.

Há necessidade de se realizar mais testes para identificar a concentração utilizada para inibição de 100% da atividade dos aptâmeros identificados e de especificidade de ligação somente ao subtipo selecionado, pois os competidores utilizados como competidores suramina e $\alpha\beta$ metileno ATP agem em outros receptores purinérgicos. Confirmado a especificidade de ligação e a concentração para inibição da resposta a ATP, os aptâmeros se tornam excelentes drogas a serem utilizadas na pesquisa e ensaios pré e clínicos e na terapia semelhante ao medicamento Macugen produzido pela Pfizer-Eyeteck Pharmaceuticals (Ng e cols., 2006).

Conclusão

6. Conclusão

- Os receptores purinérgicos são expressos e ativos em células NH15-CA2 e ao longo da diferenciação neuronal das células P19.
- Há controle intrínseco exercida pelos receptores purinérgicos P2X₄ e P2Y na proliferação celular, na formação de corpos embriônicos e ou na determinação de progenitores neurais P19 (fase precoce da diferenciação).
- Os receptores purinérgicos são importantes na diferenciação neuronal tardia, na passagem do estágio de célula progenitor neural a neurônios P19 (dia 3 a 8 ou 9) com controle intrínseco de atividade dos receptores purinérgicos P2X₂ e P2Y₁ na funcionalidade de receptores de NMDA em neurônios P19 e de P2X₂ e P2Y₂ na atividade dos receptores de acetilcolina em neurônios P19.
- Foram identificados antagonistas específicos aos receptores P2X₂ e P2X₄ utilizando SELEX. Estas moléculas têm alta seletividade de ligação e afinidade aos receptores sendo os primeiros ligantes específicos aos dois subtipos de receptores purinérgicos.
- Utilizando a biblioteca ciclo 9 P2X₄, confirmou-se a importância do receptor P2X₄ na formação de corpos embriônicos, previamente identificados em testes farmacológicos apresentados neste trabalho.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

Abbracchio, M.P; Burnstock, G. Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors? *Pharmacol. Therap.* 64: 445-475, 1994.

Adrian, K.; Bernhard, M.K.; Breitingner, H-G.; Ogilvie, A. Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. *Biochimica Biophysica acta*, 127-138, 2000.

Arthur, D.B.; Akassoglou, K.; Insel, PA. P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(52):19138-43, 2005.

Arslan, G.; Filipeanu, C.M.; Irenius, E.; Kull, B.; Clementi, E.; Allgaier, C.; Erlinge, D.; Fredholm, B.B. P2Y receptors contribute to ATP-induced increases in intracellular calcium in differentiated but not undifferentiated PC12 cells. *Neuropharmacology*, 39: 482-496, 2000.

Ashour,F.; Deuchas, J. Electron Microscopic localization of P2X₄ receptor subunit immunoreactivity to pre- and pos- synaptic neuronal elements and glial processes in the dorsal vagal complex of the rat. *Brain Research.* 1026: 44-55, 2004.

Avila, A.M; Davila-Garcia, M.I.; Ascarrunz, V.S; Xiao, Y; Kellar, K.J. Differential regulation of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells by nicotine and nerve growth factor. *Mol Pharmacol.*, 64(4):974-986, 2003.

Bain, G.; Ray, W.J.; Yao, M.; Gottlieb, D.I. From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway. *Bioessays.* 16:343-348, 1994.

Bai, G.; Zhuang, Z.; Liu, A.; Chai, Y.; Hoffman, PW. The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Neurochem.* 86(4):992-1005, 2003.

Barajas-Lopez, C.; Huizinga, J.D.; Collins, S.M.; Gerzanich, V.; Espinosa-Luna, R.; Peres, A.L. P2X-pirinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. *Br.J.Pharmacol.*, 119(8):1541-1548, 1996.

Barry, V.A.; Cheek, T.R. Extracellular ATP triggers two functionally distinct calcium signalling pathways in PC12 cells. *J Cell Sci.* 107 (Pt 2):451-62, 1994.

Bartel, D.P; Szostak, J.W. Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science*, 261(5127): 1411-8, 1993.

Berchtold, S.; Ogilvie, A.L.L.; Bogdan, C.; Muhl-Zurbes, P.; Ogilvie, A.; Schuler, G.; Syeinkasseree, A. Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Letters* 458: 424-428, 1999.

Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361:315-325, 1993.

Berridge, M.J. Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1):13-26, 1998.

Bjerre, B.; Bjorklund, A. The production of catecholamine-containing cells *in vitro* by young chick embryos: effects of "nerve growth factor" (NGF) and its antiserum. *Neurobiol.* 3(3):140-61, 1973.

Blank, M.; Weinschenk, T.; Priemer, M.; Schluesener, H. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. *J Biol Chem.* 276(19):16464-8, 2001.

Blind, M., Kolanus, W.; Famulok, M. Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(7):3606-10, 1999.

Bo, X; Zhang, Y; Nassar, M; Burnstock, G.; Schoepfer, R. A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett.*, 375(1-2):129-331995, 1995.

Bock, L.C.; Griffin, L.C.; Latham, J.A.; Vermaas, E.H.; Toole, J.J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature.*355(6360):564-566, 1992.

Bogdanov, Y.D.; Dale, L.; King, B.F.; Whittock, N.; Burnstock, G. Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos. *J.Biol.Chem.* 272:12583-12590, 1997.

Bogdanov, Y.; Rubino, A.; Burnstock, G. Characterisation of subtypes of the P2X and P2Y families of ATP receptors in the foetal human heart. *Life Sci.* 62(8):697-703, 1998.

Borodinsky, L.N.; Root, C.M.; Cronin, J.A.; Sann, S.B.; Gu, X.; Spitzer, N.C. Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature* 429(6991):523-30, 2004.

Bottenstein, J.E.; Sato, G.H. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(1):514-7, 1979.

Brake, A.J.; Wagenbach, M.J.; Julius, D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature.* 371(6497):519-23, 1994.

Brandle, U.; Spielmanns, P.; Osteroth, R.; Sim, J.; Surprenant, A.; Buell, G.; Ruppertsberg, J.P.; Plinkert, P.K.; Zenner, H.P.; Glowatzki, E. Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett.* 404(2-3):294-8, 1997.

Brandle, U.; Zenner, H-P.; Ruppertsberg, J.P. Gene expression of P2X receptors in the developing inner ear of the rat. *Neuroscience Letters.* (273): 105-108, 1999.

Braun, N.; Sevigny, J.; Mishra, S.K.; Robson, S.C.; Barth, S.W.; Gerstberger, R.; Hammer, K.; Zimmermann, H. Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 17(7):1355-64, 2003.

Brown, D.A.; Bruce, J.I.; Straub, S.V.; Yule, D.I. cAMP potentiates ATP-evoked calcium signaling in human parotid acinar cells. *J Biol Chem.* 279(38):39485-94, 2004.

Bruce, J.I.; Yule, D.I.; Shuttleworth, T.J. Ca²⁺-dependent protein kinase--a modulation of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in parotid acinar cells. *J Biol Chem.* 277(50):48172-81, 2002.

Brusaard, A.B. Antisense oligonucleotide induce functional deletion of Ligand gated ion channels in cultured neurons and brain explants. *J. Neurosci. Meth.* (71): 55-64, 1997.

Buell, G.; Collo, G.; Rassendren, F. P2X receptors: an emerging channel family. *Eur.J. Neurosci.* 8:2221-2228, 1996.

Burnstock, G. Do some nerves cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1, 239-248, 1976.

Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Straub, R.W., Bolis, L. (Eds.), cell membrane receptor for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. Raven Press, New York, pp.107-118, 1978.

Burnstock, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *TRENDS in Pharmacol. Sciences*, 2006.

Burnstock, G. Purinergic signalling in gut. In Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 151/II. Purinergic and Pyrimidinergic signalling II- cardiovascular , respiratory, immune, metabolic and gastrointestinal tract function (Abbracchio, M.P. e Williams, M. eds), pp. 141-238, Springer-Verlag, 2001.

Burnstock, G.; Costa, M. Inhibitory innervation of the gut. *Gastroenterology*. 64(1):141-4, 1973.

Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2 purinoreceptors? *Gen. Pharmacol.* 16: 433-440, 1985.

Cameron, H.A.; Tanapat, P.; Gould, E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience*. 82(2):349-54, 1998.

Canals, M.; Angulo, E.; Casado, V.; Canela, E.I.; Mallol, J.; Vinals, F.; Staines, W.; Tinner, B.; Hillion, J.; Agnati, L.; Fuxe, K.; Ferre, S.; Lluís, C.; Franco, R. Molecular mechanisms involved in the adenosine A and A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. *J Neurochem.*, 92(2):337-48, 2005.

Canzoniero, L.M.; Sensi, S.L.; Turetsky, D.M.; Finley, M.F.; Choi, D.W.; Huettner, J.E. Glutamate receptor-mediated calcium entry in neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells. *J Neurosci Res.* 45(3):226-36, 1996.

Castro, D.S.; Hermanson, E.; Joseph, B.; Wallen, A.; Aarnisalo, P.; Heller, A.; Perlmann, T. Induction of cell cycle arrest and morphological differentiation by Nurr1 and retinoids in dopamine MN9D cells. *J Biol Chem.* 276(46):43277-84, 2001.

Cauley, K.; Marks, M.; Gahring, LC.; Rogers, SW. Nicotinic receptor subunits alpha 3, alpha 4, and beta 2 and high affinity nicotine binding sites are expressed by P19 embryonal cells. *J Neurobiol.* 30(2):303-14, 1996.

Cavaliere, F.; Florenzano, F.; Amadio, S.; Fusco, F.R.; Viscomi, M.T.; D'Ambrosi, N.; Vacca, F.; Sancesario, G.; Bernardi, G.; Molinari, M.; Volonte, C. Up-Regulation of P2X₂, P2X₄ receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience*. 120: 85-98, 2003.

Cerchia, L.; Duconge, F.; Pestourie, C.; Boulay, J.; Aissouni, Y.; Gombert, K.; Tavitian, B.; de Franciscis, V.; Libri, D. Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. *PLoS Biol.* 3(4):e123, 2005.

Chaloin, L.; Lehmann, M.J.; Sczakiel, G.; Restle, T. Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 30(18):4001-8, 2002.

Chen, C.; Parker, M.S.; Branes, A.P.; Deininger, P.; Bobbin, R.P. Functional Expression of Three P2X₂ Receptor Splicing Variants from Guinea Pig Cochlea. *J. Neurophysiol.*, 83:1502-1509, 2000.

Chen, C.H.; Chernis, G.A.; Hoang, V.Q.; Landgraf, R. Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(16):9226-31, 2003.

Chen, H.C.; Wei, L.N.; Loh, H.H. Expression of mu-, kappa- and delta-opioid receptors in P19 mouse embryonal carcinoma cells. *Neuroscience.* 92(3):1143-55, 1999.

Cheun, J.E.; Yeh, H.H. Differentiation of a stem cell line toward a neuronal phenotype. *Int J Dev Neurosci.* 9(4):391-404, 1991.

Ciccolini, F., Collins, T., Sudhoelter, J., Lipp, P., Berridge, M.J., Bootman, M.D. Local and Global Spontaneous Calcium Events Regulate Neurite Outgrowth and Onset of GABAergic Phenotype during Neural Precursor Differentiation. *J. Neurosci* 23 (1), 103-111, 2003.

Conrad, R.; Keranen, L.M.; Ellington, A. D.; Newton, A.C. Isozyme-Specific Inhibition of Protein kinase C by RNA Aptamers. *J Biol Chem.* 269 (51):32051-320514, 1994.

Console-Bram, L.M.; Baird, D.H.; Fitzpatrick-McElligott, S.G.; McElligott, J.G. Modulation of GAP-43 mRNA by GABA and glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Brain Res.* 783(2):316-25, 1998.

Coronas, V.; Durand, M.; Chabot, J.G.; Jourdan, F.; Quirion, R. Acetylcholine induces neuritic outgrowth in rat primary olfactory bulb cultures. *Neuroscience,* 98(2):213-9, 2000.

Coutinho-Silva, R.; Stahl, L.; Cheung, K.K.; de Campos, N.E.; de Oliveira Souza, C.; Ojcius, D.M.; Burnstock, G. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288(5):G1024-1035, 2005.

Criado, M.; Dominguez del Toro, E.; Carrasco-Serrano, C.; Smillie, F.I.; Juiz, J.M.; Viniegra, S.; Ballesta, J.J. Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *J Neurosci.* 17(17):6554-64, 1997.

a-Cui, Y.; Ulrich, H.; Hess, G.P. Selection of 2'-fluoro-modified RNA aptamers for alleviation of cocaine and MK-801 inhibition of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Membr Biol.* 202(3):137-49, 2004.

b-Cui, Y.; Rajasethupathy, P.; Hess, G.P. Selection of stable RNA molecules that can regulate the channel-opening equilibrium of the membrane-bound gamma-aminobutyric acid receptor. *Biochemistry.* 43(51):16442-9, 2004.

Czyz, J.; Wobus, A. Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. *Differentiation*, 68(4-5):167-74, 2001.

D'Ambrosi, N.; Cavaliere, F.; Merlo, D.; Milazzo, L.; Mercanti, D.; Volonte, C. Antagonists of P2 Receptor Prevent NGF-Dependent Neuritegenesis in PC12 cells. *Neuropharmacol*, 39(6):1083-1094, 2000.

D'Ambrosi, N.; Murra, B.; Cavaliere, F.; Amadio, S.; Bernardi, G.; Burnstock, G.; Volonte, C. Interaction between ATP and Nerve Growth Factor Signalling in the Survival and Neuritic Outgrowth from PC12 cells. *Neurosci*, 108:527-534, 2001.

da Silva RL, Resende RR, Ulrich H. Alternative splicing of P2X6 receptors in developing mouse brain and during in vitro neuronal differentiation. *Exp Physiol*. 92(1):139-45, 2007.

Dang, S.M.; Zandstra, P.W. Scalable production of embryonic stem cell-derived cells. *Methods Mol Biol*. 290:353-64, 2005.

Daniels, M.P.; Hamprecht, B. The ultrastructure of neuroblastoma glioma somatic cell hybrids. Expression of neuronal characteristics stimulated by dibutyryl adenosine 3',5' cyclic monophosphate. *J Cell Biol*. 63(2 Pt 1):691-9, 1974.

Darmon, M.; Bottenstein, J.; Sato, G. Neural differentiation following culture of embryonal carcinoma cells in a serum-free defined medium. *Dev Biol*. 1981 Jul 30;85(2):463-73.

Davis, J. P., Janjic, N., Javornik, B.E., Zichi, D.A. Identifying consensus patterns and secondary structure in SELEX sequence sets. *Methods Enzymol*. 267:302-314, 1996.

Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T.D., Malenka, R.C., Pritzker, N. Excitation-Neurogenesis coupling in Adult Neural Stem/progenitor cells. *Neuron*, 42: 535-552, 2004.

Denda, M.; Inoue, K.; Fuziwara, S.; Denda, S. P2X purinergic receptor antagonist accelerates skin barrier repair and prevents epidermal hyperplasia induced by skin barrier disruption. *J. Invest. Dermatol*. 119: 1034-1040, 2002.

Deuchars, S.A.; Atkinson, L.; Brooke, R.E.; Musa, H.; Milligan, C.; Batten, T.F.C.; Buckley, N.J.; Parson, S.H.; Deuchards, J. Neuronal P2X₇ receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J.Neurosc.*, 21:7143-7152, 2001.

Deutsch, S.I.; Rosse, R.B.; Mastropaolo, J. Current status of NMDA antagonist interventions in the treatment of nonketotic hyperglycinemia. *Clin Neuropharmacol.*, 21(2):71-9, 1998.

Dhulipala, P.D.K.; Wang, Y-X.; Kotlikoff, M.J. The human P2X₄ receptor gene is alternatively spliced. *Gene*, 207:259-266, 1998.

Dietzel, I.D. Voltage-gated ion currents in embryogenesis. *Perspect. Dev. Neurobiol*. 2(4):293-308, 1995.

Ding, S.; Sachs, F. Inactivation of P2X2 purinoceptors by divalent cations. *J.Physiol.*,522:199-214, 2000.

Dorn, G.; Abdel'Al, S.; Natt, F.J.; Weiler, J.; Hall, J.; Meigel, I.; Mosbacher, J.; Wishart, W. Specific inhibition of the rat ligand-gated ion channel P2X₃ function via methoxyethoxy-modified phosphorothioated antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11(3):165-174, 2001.

Drury, A.N.; Szent-Györgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J.Physiol.*,68:213-237, 1929.

Dubyak, G.R; el-Moatassim, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol.*, 265(3 Pt 1):C577-606, 1993.

Duprat, A.M. What mechanisms drive neural induction and neural determination in urodeles? *Int J Dev Biol.* 40(4):745-54, 1996.

Edwards, M.K.S.; Harris, J.F.; McBurney, M.W. Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line. *Molec. Cell Biol.*,3:2280-2286, 1983.

Edwards, M.K.S.; McBurney, M.W. The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Devel. Biol.*,98:187-191, 1983.

Edwards,F.A.; Gibb, A.J. ATP: a fast neurotransmitter. *FEBS Lett.* 325: 86-89, 1995.

Egan, T.M.; Khakh, B.S. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci.* 24(13):3413-20, 2004.

Egan, T.M.; Khakh, B.S. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci.* 24(13):3413-20, 2004.

Ellington, A.D.; Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346:818-822, 1990.

el-Moatassim C, Dubyak GR. Dissociation of the pore-forming and phospholipase D activities stimulated via P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. Product inhibition of phospholipase D enzyme activity. *J Biol Chem.* 268(21):15571-8, 1993.

Evans, M.J.; Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292:154-156, 1981.

Evans RJ, Derkach V, Surprenant A ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357: 503–505, 1992.

Famulok, M.; Blind, M.; Mayer, G. Intramers as promising new tools in functional proteomics. *Chem Biol.* 8(10):931-9, 2001.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391(6669):806-11, 1998.

Fiske, C.H.; SubbaRow, Y. Phosphorous compounds of muscle and liver. *Science* 70:381–382, 1929.

Fujita, N.; Kakimi, M.; Ikeda, Y.; Hiramoto, T.; Suzuki, K. Extracellular ATP inhibits starvation-induced apoptosis via P2X₂ receptors in differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells. *Life Sci.* 66(19):1849-59, 2000.

Gage, F.H.; Coates, P.W.; Palmer, T.D.; Kuhn, H.G.; Fisher, L.J.; Suhonen, J.O.; Peterson, D.A. Suhr, S.T.; Ray, J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(25):11879-83, 1995.

Garcia-Guzman, M.; Soto, F.; Gomez-Hernandez, J.M.; Lund, P-E.; Stuhmer, W. Characterization recombination human P2X₄ receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol. Pharmacol.*, 51:109-118, 1997.

Gendreau, S., Schirmer, J.; Schalzing, G. Identification of a tubulin Binding motif on the P2X₂ receptor. *J. Chromatography.* e86: 311-318, 2002.

Gerecht-Nir, S.; Cohen, S.; Ziskind, A.; Itskovitz-Eldor, J. Three-dimensional porous alginate scaffolds provide a conducive environment for generation of well-vascularized embryoid bodies from human embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng.* 88(3):313-20, 2004.

Ginsborg, B.L.; Hirst, G.D.S. The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J. Physiol.* 224, 629-645, 1972.

Gold, L. Globular oligonucleotide screening via the SELEX process: aptamers as high-affinity, high-specificity compounds for drug development and proteomic diagnostics, 389-403, 1999. In *Combinatorial chemistry and technology: principles, methods, and applications.*

Good, P.D.; Krikos, A.J.; Li, S.X.; Bertrand, E.; Lee, N.S.; Giver, L.; Ellington, A.; Zaia, J.A.; Rossi, J.J.; Engelke, D.R. Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther.* 4(1):45-54, 1997.

Gopinath, S.C.; Misono, T.S.; Kawasaki, K.; Mizuno, T.; Imai, M.; Odagiri, T.; Kumar, P.K. An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J Gen Virol.* 87(Pt 3):479-87, 2006.

Gotz, M.; Huttner, W.B. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6(10):777-88, 2005.

Greene, L.A.; Tischler, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73: 2424-2428, 1976.

Greig, A.V.; Linge, C.; Cambrey, A.; Burnstock, G. Purinergic receptors are part of a signaling system for keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis in human fetal epidermis. *J Invest Dermatol.* 121(5):1145-9, 2003.

Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsia, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:340-350, 1985.

Gu. X.; Spitzer, N.C. Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients. *Dev. Neurosci.* 19(1):33-41, 1997.

Guan. K.; Chang, H.; Rolletschek, A.; Wobus, A.M. Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell. Tissue Res.* 305(2):171-6, 2001.

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391(2):85-100, 1981.

Hamprecht, B. Neuron models. *Angew Chem Int Ed Engl.* 15(4):194-206, 1976.

Hamprecht, B.; Amano, T. Differential assay for choline acetyltransferase. *Anal Biochem.* 57(1):162-72, 1974.

Harris, A.L.; Zhang, H.; Moghaddam, A.; Fox, S.; Scott, P.; Pattison, A.; Gatter, K.; Stratford, I.; Bicknell, R. Breast cancer angiogenesis--new approaches to therapy via antiangiogenesis, hypoxic activated drugs, and vascular targeting. *Breast Cancer Res Treat.* 38(1):97-108, 1996.

Haydar, T.F.; Wang, F.; Schwartz, M.L.; Rakic, P. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci.* 20(15):5764-74, 2000.

a-Heck, S.; Enz, R.; Richter-Landsberg, C.; Blohm, D.H. Expression and mRNA splicing of glycine receptor subunits and gephyrin during neuronal differentiation of P19 cells in vitro, studied by RT-PCR and immunocytochemistry. *Brain Res Dev.* 98(2):211-20, 1997.

b-Heck, S.; Enz, R.; Richter-Landsberg, C.; Blohm, D.H. Expression of eight metabotropic glutamate receptor subtypes during neuronal differentiation of P19 embryocarcinoma cells: a study by RT-PCR and in situ hybridization. *Brain Res Dev.* 101(1-2):85-91, 1997.

Heine, C.; Heimrich, B.; Vogt, J.; Wegner, A.; Illes, P.; Franke, H. P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus *in vitro*. *Neuroscience.* 138(1):303-11, 2006.

Hemmings-Mieszczak, M.; Dorn, G.; Natt, F.J.; Hall, J.; Wishart, W.L. Independent combinatorial effect of antisense oligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinant rat P2X₃ receptor. *Nucleic Acids Res.* 31(8):2117-26, 2003.

Heo, J.S.; Han, H.J. ATP stimulates mouse embryonic stem cell proliferation via PKC, PI3K/Akt, and MAPKs signaling pathways. *Stem Cells.* 24(12):2637-48, 2006

Hess, G.P.; Grewer, C. Development and application of caged ligands for neurotransmitter receptors in transient kinetic and neuronal circuit mapping studies. *Methods Enzymol.* 291:443-73, 1998.

Hess, G.P.; Udgaonkar, J.B. Olbricht, W.L. Chemical kinetic measurements of transmembrane processes using rapid reaction techniques: acetylcholine receptor. *Annu Rev. Biophys. Chem.* 16: 507, 1987.

Hess, G.P.; Ulrich, H.; Breiting, H.G.; Niu, L.; Gameiro, A.M.; Grewer, C.; Srivastava, S.; Ippolito, J.E.; Lee, S.M.; Jayaraman, V.; Coombs, S.E. Mechanism-based discovery of ligands that counteract inhibition of the nicotinic acetylcholine receptor by cocaine and MK-801. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 13895, 2000.

Hesselberth, J.R.; Robertson, M.P.; Knudsen, S.M.; Ellington, A.D. Simultaneous detection of diverse analytes with an aptazyme ligase array. *Anal Biochem.* 312(2):106-12, 2003.

Heumann, R.; Ocalan, M.; Kachel, V.; Hamprecht, B.; Clonal hybrid cell lines expressing cholinergic and adrenergic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4674-7, 1979.

Heumann, R.; Stavrou, D.; Reiser, G.; Ocalan, M.; Hamprecht, B. Tumorigenicity of neuroblastoma X glioma hybrid cells in nude mice and reintroduction of transplanted cells into culture. *Eur J Cancer*. 13(12):1417-20, 1977.

Hicke, B.J.; Watson, S.R.; Koenig, A.; Lynott, C.K.; Bargatze, R.F.; Chang, Y.F.; Ringquist, S.; Moon-McDermott, L.; Jennings, S.; Fitzwater, T.; Han, H.L.; Varki, N.; Albinana, I.; Willis, M.C.; Varki, A.; Parma, D. DNA aptamers block L-selectin function in vivo. Inhibition of human lymphocyte trafficking in SCID mice. *J Clin Invest*. 98(12):2688-92, 1996.

Higashida, H.; Yokoyama, S.; Hashii, M.; Taketo, M.; Higashida, M.; Takayasu, T.; Ohshima, T.; Takasawa, S.; Okamoto, H.; Noda, M. Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes. *J Biol Chem*. 272(50):31272-7, 1997.

Hogg, R.C.; Chipperfield, H.; Whyte, K.A.; Stafford, M.R.; Hansen, M.A.; Cool, S.M.; Nurcombe, V.; Adams, D.J. Functional maturation of isolated neural progenitor cells from the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 19 (9): 2410-2420, 2004.

Holton, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145: 494-504, 1959.

Honore, P.; Mikusa, J.; Bianchi, B.; McDonald, H.; Cartmell, J.; Faltynek, C.; Jarvis, M.F. TNP-ATP, a potent P2X₃ receptor antagonist, blocks acetic acid-induced abdominal constriction in mice: comparison with reference analgesics. *Pain*, 96(1-2):99-105, 2002.

Housley, G.D.; Greenwood, D., Bennett, T.; Ryan, A.F. Identification of a short form of the P2XR₁-purinceptor subunit produced by alternative splicing in the pituitary and cochlea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212:501-508, 1995.

Hur, E-M; Park, T-J.; Kim, K-T. Coupling of L-type voltage-sensitive calcium channels to P2X₂ purinceptors in PC-12 cells. *Am.J.Physiol.*, 280:C1121-C1129, 2001.

Imitola, J; Park, KI; Teng, YD; Nisim, S; Lachyankar, M; Ourednik, J; Mueller, FJ; Yiou, R; Atala, A; Sidman, RL; Tuszynski, M; Khoury, SJ; Snyder, EY. Stem cells: cross-talk and developmental programs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 359(1445):823-37, 2004.

Inoue, K.; Nakazawa, K.; Fujimori, K.; Takanaka, A. Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked norepinephrine secretion not relating to voltage-gated Ca channels in pheochromocytoma PC12 cells. *Neurosci Lett*. 106(3):294-9, 1989.

Itskovitz-Eldor, J.; Schuldiner, M.; Karsenti, D.; Eden, A.; Yanuka, O.; Amit, M.; Soreq, H.; Benvenisty, N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*. 6(2):88-95, 2000.

Jayasena, S.D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*. 45(9):1628-50, 1999.

Jellinek, D.; Green, L.S.; Bell, C.; Janjic, N. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*. 33(34):10450-6, 1994.

Jo, Y.; Schlichter, R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat. Neurosci.* 2: 241-245, 1999.

Joh, T.; Darland, T.; Samuels, M.; Wu, J.X.; Adamson, E.D. Regulation of epidermal growth factor receptor gene expression in murine embryonal carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 3(5):315-25, 1992.

Jones, C.A., Chessell, I.P., Simon, J., Barnard, E.A., Miller, K.J., Michel, A.D., Humphrey, P.P.A. Functional Characterization of the P2X₄ receptor orthologues. *Brit. J. Pharmacol.* 129, 388-394, 2000.

Jones-Villeneuve, E.M.V.; McBurney, M.W.; Rogers, K.A.; Kalnins, V.I.J. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell. Biol.* 94:253-262, 1982.

Jones-Villeneuve, E.M.V.; Rudnicki, M.A., Harris, J.F., McBurney, M.W. Retinoic acid induces neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Molec. Cell. Biol.* 3:2271-2279, 1983.

Kageyama, R.; Ohtsuka, T.; Hatakeyama, J.; Ohsawa, R. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp. Cell. Res.* 306(2):343-8, 2005.

Kandel, E.E., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. The development of the Nervous System in Principles of Neural Science. Fourth edition. Ed Mc Graw Hill 2000.

Kato, F.; Kawamura, M.; Shigetomi, E.; Tanaka, J.; Inoue, K. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: synaptic purinoceptors: the stage for ATP to play its "dual-role". *J Pharmacol Sci.* 94(2):107-11, 2004.

Khakh, B.S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B.F.; North, R.A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P.P. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.* 53(1):107-18, 2001.

Khakh, B.S.; Zhou, X.; Sydes, J.; Galligan, J.J.; Lester, H.A. State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature.* 406: 405-410, 2000.

Kim, M., Yoo, O.J., Choc, S. Molecular assembly of the extracellular domain of P2X₂, an ATP-gated ion channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:618-622, 1997.

Kitayama, T., Toneyama, M., Tamaki, K., Yoneda, Y. Regulation of Neuronal Differentiation by N-Methyl-D-Aspartate Receptors Expressed in Neural Progenitor Cells Isolated from Adult Mouse Hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 76: 599-612, 2004.

Klussmann, S.; Nolte, A.; Bald, R.; Erdmann, V.A.; Furste, J.P. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol.* 14(9):1112-5, 1996.

Kristal, O.A.; Pidoplichko, V.I. A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience.* 5:2325, 1980.

Krivoshein, A.V.; Hess, G.P. Mechanism-based approach to the successful prevention of cocaine inhibition of the neuronal (alpha 3 beta 4) nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry.* 43(2):481-9, 2004.

Kruger, G.M.; Mosher, J.T.; Tsai, Y.H.; Yeager, K.J.; Iwashita, T.; Gariépy, C.E.; Morrison, S.J. Temporally distinct requirements for endothelin receptor B in the generation and migration of gut neural crest stem cells. *Neuron*. 40(5):917-29, 2003.

Larocca, J.N.; Rodriguez-Gabin, A.G.; Rashbaum, W.K.; Weidenheim, K.M.; Lyman, W.D. Muscarinic receptor-dependent activation of phospholipase C in the developing human fetal central nervous system. *Brain Res.* 653(1-2):9-15, 1994.

Lauder, J.M. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* 16:233-240, 1993.

Le Doan, T.; Perrouault, L.; Praseuth, D.; Habhouh, N.; Decout, J.L.; Thuong, N.T.; Lhomme, J.; Helene, C. Sequence-specific recognition, photocrosslinking and cleavage of the DNA double helix by an oligo-[alpha]-thymidylate covalently linked to an azidoproflavine derivative. *Nucleic Acids Res.* 15(19):7749-60, 1987.

Le, K.T.; Paquet, M.; Nouel, D.; Babinski, K.; Seguela, P. Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system. *FEBS Lett.* 418(1-2):195-9, 1997.

Le, K.T., Babinski K, Seguela P. Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci.*, 18(18):7152-9, 1998.

Lee, J.F.; Stovall, G.M.; Ellington, A.D. Aptamer therapeutics advance. *Curr Opin Chem Biol.* 10(3):282-9, 2006.

Lee, Y.H.; Lin, C.H.; Hsu, L.W.; Hu, S.Y.; Hsiao, W.T.; Ho, Y.S. Roles of ionotropic glutamate receptors in early developing neurons derived from the P19 mouse cell line. *J Biomed Sci.* 10(2):199-207, 2003.

Lin, J.H.; Takano, T.; Arcuino, G.; Wang, X.; Hu, F.; Darzynkiewicz, Z.; Nunes, M.; Goldman, S.A.; Nedergaard, M. Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev Biol.* 302(1):356-66, 2007.

Lin, P.; Kusano, K.; Zhang, Q.; Felder, C.C.; Geiger, P.M.; Mahan, L.C. GABAA receptors modulate early spontaneous excitatory activity in differentiating P19 neurons. *J Neurochem.* 66(1):233-42, 1996.

Listerud, M.D.; Brussaard, A.B.; Devay, O.; Coleman, D.R.; Role, I.W. Functional contribution of individual neuronal AchR subunits revealed by antisense oligonucleotides. *Science*, (254): 1518-1521, 1991.

LoTurco, J.J.; Owens, D.F.; Heath, M.J.; Davis, M.B.; Kriegstein, A.R. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*. 15(6):1287-98, 1995.

Lohman, K. Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* 17:624-625, 1929.

Lynch, K.J.; Touma, E.; Niforatos, W.; Kage, K.L.; Burgard, E.C.; Biesen, T.V.; Kowaluk, E.A.; Jarvis, M.F. Molecular and functional characterization of human P2X2 receptors. *Mol. Pharmacol.* 56:1171-1181, 1999.

Ma, W.; Maric, D.; Li, B.S.; Hu, Q.; Andreadis, J.D.; Grant, G.M.; Liu, Q.Y.; Shaffer, K.M.; Chang, Y.H.; Zhang, L.; Pancrazio, J.J.; Pant, H.C.; Stenger, D.A.; Barker, J.L.

Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation in vitro via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation. *Eur J Neurosci.* 12(4):1227-40, 2000.

McCain, D.F.; Wu, L.; Nickel, P.; Kassack, M.U.; Kreimeyer, A.; Gagliardi, A.; Collins, D.C.; Zhang, Z.Y. Suramin derivatives as inhibitors and activators of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem.* 279(15):14713-25, 2004.

MacPherson, P.A.; Jones, S.; Pawson, P.A.; Marshall, K.C.; McBurney, M.W. P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons *in vitro*. *Neuroscience*, 80:487-499, 1997.

MacKenzie, A.B.; Surprenant, A., North, R.A. Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 868:716-729, 1999.

Majumder, P.; Faria, M.; Ulrich, H. Targeting DNA Associated Processes for Cancer Therapy by the Use of SELEX and Anti-gene Approaches – When Selection Meets Rational Design. *Medicinal Chemistry Reviews On Line.* 2 (3):. 257-264, 2005.

Marrero, M.B.; Venema, V.J.; Ju, H.; He, H.; Liang, H.; Caldwell, R.B.; Venema, R.C. Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors *Biochem J.*, 335-40, 1999.

Martin, G.R. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* 209:768–776, 1980.

Martins, A.H.; Resende, R.R.; Majumder, P.; Faria, M.; Casarini, D.E.; Tarnok, A.; Colli, W.; Pesquero, J.B.; Ulrich, H. Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells modulates kinin B2 receptor gene expression and function. *J Biol Chem.* 280(20):19576-86. 2005.

Masin, M.; Kerschensteiner, D.; Dumke, K.; Rubio, M.E.; Soto, F. FE65 interacts with P2X2 subunits at excitatory synapse and modulates receptor function. *J.Biol. Chem.* 281(7):4100-8, 2005.

Mayer, G.; Blind, M.; Nagel, W.; Bohm, T.; Knorr, T.; Jackson, C.L.; Kolanus, W.; Famulok, M. Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(9):4961-4965, 2001.

McBurney, M.W., Jones-Villeneuve, E.M.V.; Edwards, M., Anderson, P. Controlled differentiation of teratocarcinoma cells in culture. *Nature*, 299:165-167, 1982.

McBurney, M.W., Reuhl, K.R., Ally, A.I., Nasipuri, S., Bell, J.C., Craig, J. Differentiation and maturation of Embryonal Carcinoma-Derived Neurons in Cell Culture. *The J. Neurosc.*, 8(3), 1063-1073, 1988.

McBurney, M.W. P19 embryonal carcinoma cells. *Int.J.Devl.Biol.*, 37:135-140, 1993.

McWhir, J.; Schnieke, A.E.; Ansell, R.; Wallace, H.; Colman, A.; Scott, A.R.; Kind, A.J. Selective ablation of differentiated cells permits isolation of embryonic stem cell lines from murine embryos with a non-permissive genetic background. *Nat Genet.* 14(2):223-6, 1996.

Melnikova, I.N.; Gardner, P.D. The signal transduction pathway underlying ion channel gene regulation by SP1-C-Jun interactions. *J Biol Chem.*, 276(22):19040-19045, 2001.

Michel, A.D.; Grahames, C.B.; Humphrey, P.P. Functional characterisation of P2 purinoceptors in PC12 cells by measurement of radiolabelled calcium influx. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 354(5):562-71, 1996.

Michel, A.D.; Miller, K.J.; Lundstrom, K.; Buell, G.N.; Humphrey, P.P. Radiolabeling of the rat P2X4 purinoceptor: evidence for allosteric interactions of purinoceptor antagonists and monovalent cations with P2X purinoceptors. *Mol Pharmacol.*, 51(3):524-32, 1997.

Minunni, M.; Tombelli, S.; Gullotto, A.; Luzi, E.; Mascini, M. Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein. *Biosens Bioelectron.* 20(6):1149-56, 2004.

Miranov, S.L. Metabotropic ATP receptor in hippocampal and thalamic neurones: pharmacology and modulation of Ca²⁺ mobilizing mechanisms. *Neuropharmacol.*, 33:1-13, 1994.

Mishra, S.K., Braun, N., Shukla, V., Fullgrabe, M., Schomerus, C., Korf, H-W., Gachet, C., Ikehara, Y., Sevigny, J., Robson, S.C., Zimmermann, H. Extracellular Nucleotide Signaling in Adult Neural Stem Cells: Synergism with Growth Factor- Mediated Cellular Proliferation. *Development* 133, 675-684, 2006.

Moiseiwitsch, J.R.; Raymond, J.R.; Tamir, H.; Lauder, J.M. Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. *Arch Oral Biol.*, 43(10):789-800, 1998.

Moiseiwitsch, JR; Lauder, JM. Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1; 92(16): 7182-6, 1995.

Moiseiwitsch, J.R.; Lauder, J.M. Regulation of gene expression in cultured embryonic mouse mandibular mesenchyme by serotonin antagonists. *Anat Embryol (Berl).* 195(1):71-8, 1997.

Monge, JC; Stewart, DJ; Cernacek, P; Differentiation of embryonal carcinoma cells to a neural or cardiomyocyte lineage is associated with selective expression of endothelin receptors. *J Biol Chem.* 23;270(25):15385-90, 1995.

Moore, D.J.; Chambers, J.K.; Murdock, P.R.; Emson, P.C. Human Ntera-2/D1 neuronal progenitor cells endogenously express a functional P2Y1 receptor. *Neuropharmacology*, 43(6):966-978, 2002.

Morley, P.; MacPherson, P.; Whitfield, J.F.; Harris, E.W.; McBurney, M.W. Glutamate receptor-mediated calcium surges in neurons derived from P19 cells. *J Neurochem.* 65(3):1093-1099, 1995.

Nebigil, C.G.; Choi, D.S.; Dierich, A.; Hickel, P; Le Meur, M.; Messaddeq, N.; Launay, J.M.; Maroteaux, L. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;97(17):9508-13, 2000.

Newman, M.B., Kuo, Y.P.; Lukas, R.J.; Sanberg, P.R.; Douglas Shytle, R.; McGrogan, M.P.; Zigova, T. Nicotinic acetylcholine receptors on NT2 precursor cells and hNT (NT2-N) neurons. *Brain Res Dev Brain Res.*, 139(1):73-86, 2002.

Ng, E.W.; Shima, D.T.; Calias, P.; Cunningham, E.T. Jr.; Guyer, D.R.; Adamis, A.P. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 5(2):123-32, 2006.

Nguyen, L.; Rigo, J.M.; Rocher, V.; Belachew, S.; Malgrange, B.; Rogister, B.; Leprince, P.; Moonen, G. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.* 305(2):187-202, 2001.

Nicke, A.; Baumert, H.G., Rettinger, J.; Eichele, A.; Lambrech, G.; Mulschler, E.; Schmalzing, G. P2X1 and P2X3 receptors form a stable trimers: a novel structural motif of ligant-gated ion channels. *EMBO.J.*, 17:3016-3028, 1998.

Nieber, K.; Poelchen, W.; Illes, P. Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 122: 423-430, 1997.

Niemann, S.; Schaller, H.C. Head-activator and the neuroectodermal differentiation of P19 mouse embryonal carcinoma cells. *Neuroscience letters*, 207: 49-52, 1996.

Nishi, R. Target-mediated control of neural differentiation. *Prog Neurobiol.* 69(4):213-27, 2003.

North, R.A., Suprenant, A. Pharmacology of cloned P2X. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:563-580, 2000.

O'Rourke, N.A.; Dailey, M.E.; Smith, S.J.; McConnell, S.M. Diverse Migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science*, 258: 299-302, 1992.

O'Shea, K.S. Embryonic stem cell models of development. *The anatomical record (new anal)*, 257:32-41, 1999.

Okamoto, S.; Sherman, K.; Lipton, S.A. Absence of binding activity of neuron-restrictive silencer factor is necessary, but not sufficient for transcription of NMDA receptor subunit type 1 in neuronal cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 74(1-2):44-54, 1999.

Orriss, I.R.; Knight, G.E.; Ranasinghe S, Burnstock G, Arnett TR. Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation. *Bone.* (2):300-9, .2006.

Owens, D.F.; Flint, A.C.; Dammerman, R.S.; Kriegstein, A.R. Calcium dynamics of neocortical ventricular zone cells. *Dev Neurosci.* 22(1-2):25-33, 2000.

Pagratís NC, Bell C, Chang YF, Jennings S, Fitzwater T, Jellinek D, Dang C. Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor. *Nat Biotechnol.* 15(1):68-73, 1997.

Pankratov, Y.V.; Lalo, U.V.; Krishtal, O.A. Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci.* 22(19):8363-9, 2002.

Parnas, D.; Heldman, E.; Branski, L.; Feinstein, N.; Linial, M. Expression and localization of muscarinic receptors in P19-derived neurons. *J Mol Neurosci.* 10(1):17-29, 1998.

Parnas, D.; Linial, M. Acceleration of neuronal maturation of P19 cells by increasing culture density. *Brain Res Dev.* 101(1-2):115-24, 1997.

Parr, C.E.; Sullivan, D.M.; Paradiso, A.M.; Lazarowski, E.R.; Burch, L.H.; Olsen, J.C.; Erb, L.; Weisman, G.A.; Boucher, R.C.; Turner, J.T. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(26):13067, 1994.

Paterno, G.D.; Gillespie, L.L.; Julien, J.P.; Skup, D. Regulation of neurofilament L, M and H gene expression during retinoic acid-induced neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Brain Res Mol Brain Res.*, 49(1-2):247-54, 1997.

Paterson, B.M.; Roberts, B.E.; Kuff, E.L. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(10):4370-4, 1977.

Pevny, L.; Placzek, M. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol.* 15(1):7-13, 2005.

Pozzan, T.; Di Virgilio, F.; Vicentini, L.M.; Meldolesi, J. Activation of muscarinic receptors in PC12 cells. Stimulation of Ca²⁺ influx and redistribution. *Biochem J.*, 234(3):547-53, 1986.

Puga, A., Tomlinson, C.R., Xia, Y. Ah Receptor Signals Cross Talk with Multiple Developmental Pathways. *Biochemical Pharmacology*, 69: 199-207, 2005.

Pyle, S.J., a, Kathleen G. Roberts and Kenneth R. Reuhl. Delayed expression of the NFH subunit in differentiating P19 cells. *Developmental Brain Research*, 132 (1), 103-106, 2001.

Rathbone, M.P.; Middlemiss, P.J.; Gysbers, J.W.; Andrew, C.; Herman, M.A.R.; Reed, J.K.; Ciccarelli, R.; Di-Iorio, P.; Caciagli, F. Thopfic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in neurobiology*, 59: 663-690, 1999.

Rathjen, J. Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod.Fertil.Dev.*, 10: 31-47, 1998.

Ray, W.J.; Gottlieb, D.I. Expression of ionotropic glutamate receptor genes by P19 embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 197(3):1475-82, 1993.

Reis, E.M.; Nakaya, H.I.; Louro, R.; Canavez, F.C.; Flatschart, A.V.; Almeida, G.T.; Egidio, C.M.; Paquola, A.C.; Machado, A.A.; Festa, F.; Yamamoto, D.; Alvarenga, R.; da Silva, C.C.; Brito, G.C.; Simon, S.D.; Moreira-Filho, C.A.; Leite, K.R.; Camara-Lopes, L.H.; Campos, F.S.; Gimba, E.; Vignal, G.M.; El-Dorry, H.; Sogayar, M.C.; Barcinski, M.A.; da Silva, A.M.; Verjovski-Almeida, S. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene.* 23(39):6684-6692, 2004.

Reiser, G.; Heumann, R.; Kemper, W.; Lautenschlager, E.; Hamprecht, B. Influence of cations on the electrical activity of neuroblastoma X glioma hybrid cells. *Brain Res.* 130(3):495-504, 1977.

a-Resende, R.R., Gomes, K.N., Adhikari, A., Britto, L.R. Ulrich, H. Mechanism of Acetylcholine-Induced Calcium Signaling During Neuronal Differentiation of P19 Embryonal Carcinoma Cells *In Vitro.* *Cell Calcium.* No Prelo, 2007.

b-Resende, R.R.; Majumder, P., Gomes, K.N., Britto, L.R.G., Ulrich, H. P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of NMDA-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience*, 146(3):1169-81, 2007.

Reynolds, J.N.; Prasad, A.; Gillespie, L.L.; Paterno, G.D. Developmental expression of functional GABAA receptors containing the gamma 2 subunit in neurons derived from embryonal carcinoma (P19) cells. *Brain Res Mol.* 35(1-2):11-8, 1996.

Reynolds, J.N.; Ryan, P.J.; Prasad, A.; Paterno, G.D. Neurons derived from embryonal carcinoma (P19) cells express multiple GABAA receptor subunits and fully functional GABAA receptors. *Neurosci Lett.* 165(1-2):129-32, 1994.

Robertson, D.L., Joyce, G.F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature.* 344: 467-468, 1990.

Rowe, S.J.; Messenger, N.J.; Warner, A.E. The role of noradrenaline in the differentiation of amphibian embryonic neurons. *Development*, 119: 1343-1357, 1993.

Royle, S.J.; Bobanovic, L.K.; Murrell-Lagnado, R.D. Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J Biol Chem.* 277(38):35378-85, 2002.

Ruano, G.; Lewis, M.E.; Kouri, R.E. Cycled primer extension: a method for DNA amplification and labeling from templates of unknown sequence. *Anal Biochem.* 212(1):1-6, 1993.

Rubio, M.E.; Soto, F. Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J. Neurosci.*, 21:641-653, 2001.

Runden-Pran, E.; Tanso, R.; Haug, F.M.; Ottersen, O.P.; Ring, A. Neuroprotective effects of inhibiting N-methyl-D-aspartate receptors, P2X receptors and the mitogen-activated protein kinase cascade: a quantitative analysis in organotypical hippocampal slice cultures subjected to oxygen and glucose deprivation. *Neuroscience*, 136(3):795-810, 2005.

Rusconi, C.P.; Roberts, J.D.; Pitoc, G.A.; Nimjee, S.M.; White, R.R.; Quick, G. Jr.; Scardino, E.; Fay, W.P.; Sullenger, B.A. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat Biotechnol.* 22(11):1423-8, 2004.

Rusconi, C.P.; Scardino, E.; Layzer, J.; Pitoc, G.A.; Ortel, T.L.; Monroe, D.; Sullenger, B.A. RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature.* 419(6902):90-4, 2002.

Ryten, M., Dunn, P.M.; Neary, J.T.; Burnstock, G. ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X5 receptor on satellite cells. *The journal of Cell Biol.* 158 (2): 345-355, 2002.

Ryu, J.K.; Choi, H.B.; Hatori, K.; Heisel, R.L.; Pelech, S.L.; McLarnon, J.G.; Kim, S.U. Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: Role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. *J Neurosci Res.*, 72(3):352-62, 2003.

Salter, M.; Hicks, J.L. J. ATP causes release of intracellular Ca²⁺ via the phospholipase C beta/IP3 pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *Neurosci.*, 15:2961-2971, 1995.

Sandona, D.; Danieli-Betto, D.; Germinario, E.; Biral, D.; Martinello, T., Lioy, A.; Tarricone E, Gastaldello S, Betto R. The T-tubule membrane ATP-operated P2X4 receptor influences contractility of skeletal muscle. *FASEB J.*, 19(9):1184-6, 2005.

Sasahara, R.M.; Brochado, S.M.; Takahashi, C.; Oh, J.; Maria-Engler, S.S.; Granjeiro, J.M.; Noda, M.; Sogayar, M.C. Transcriptional control of the RECK. metastasis/angiogenesis suppressor gene. *Cancer Detect Prev.* 26(6):435-43, 2002.

Sassanfar, M.; Szostak, J.W. An RNA motif that binds ATP. *Nature*, 364:550-553, 1993.

Sauer, H.; Hofmann, C.; Wartenberg, M.; Wobus, A.M.; Hescheler, J. Spontaneous calcium oscillations in embryonic stem cell-derived primitive endodermal cells. *Exp Cell Res.* 238(1):13-22, 1998.

Scemes, E.; Duval, N.; Meda, P. Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43-null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells. *J Neurosci.* 23(36):11444-52, 2003.

Séguéla, P.; Haghghi, A.; Soghomonian, J-J.; Cooper, E. A novel neuronal P2X ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J. Neurosci.*, 16:448-455, 1996.

Sela, D.; Ram, E.; Atlas, D. ATP receptor. A putative receptor-operated channel in PC-12 cells. *J Biol Chem.* 266(27):17990-4, 1991.

Shi, H.; Hoffman, B.E.; Lis, J.T. A specific RNA hairpin loop structure binds the RNA recognition motifs of the Drosophila SR protein B52. *Mol Cell Biol.* 17(5):2649-57, 1997.

Shin, M.K.; Levorso, J.M.; Ingram, R.S.; Tilghman, S.M. The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature.* 402(6761): 496-501, 1999.

Shuey; D.L.; Sadler, T.W.; Lauder, J.M. Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology.* 46(4):367-78, 1992.

Shukla, V., Zimmermann, H., Wang, L., Kettenmann, H., Raab, S., Hammer, K., Sevigny, J., Robson, S., Braun, N. Functional Expression of the Ecto-ATPase NTPDase2 and Nucleotide Receptors by Neuronal Progenitor Cells in the Adult Murine Hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 80: 600-610, 2005.

Siddle, K.; Hutton, J.C. Peptide Hormone Action A Pratical Approach. Chapter 4. IRL Press at Oxford University Press.

Silinsky, E.M.; Gerzanich, V.; Vanner, S.M. ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *Br J Pharmacol* 106:762-763, 1992.

Sim, J.A.; Chaumont, S.; Jo, J.; Ulmann, L.; Young, M.T.; Cho, K.; Buell, G.; North, R.A.; Rassendren, F. Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *J Neurosci.* 26(35): 9006-9009, 2006.

Simon, J.; Kidd, E.J.; Smith, F.M.; Chessell, I.P.; Murrell-Lagnado, R.; Humphrey, P.P.; Barnard, E.A. Localization and functional expression of splice variants of the P2X receptor. *Mol.Pharmacol.*, 52:237-248, 1997.

Slotkin, T.A.; Southard, M.C.; Adam, S.J.; Cousins, M.M.; Seidler, F.J. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors targeted by cholinergic developmental neurotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Brain Res Bull.* 64(3):227-35, 2004.

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1):76-85, 1985.

Soltoff, S.P.; Avraham, H.; Avraham, S.; Cantley, L.C. Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *J Biol Chem.* 273(5):2653-60, 1998.

Sommer, L.; Rao, M. Neural stem cells and regulation of cell number. *Prog Neurobiol.* 66(1):1-18, 2002.

Song, H-J., Stevens, C.F., Gage, F.H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature Neuroscience*, 5(5): 438-445, 2002.

Soto, F.; Garcia-Guzman, M.; Gomez-Hernandez, J.M., Hollmann, M., Karschin, C.; Stümer, W. P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3684-3688, 1996.

Spitzer, N.C.; Root, C.M. Borodinsky, L.N. Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca²⁺ spikes specify transmitter choice. *Trends Neurosci.* 27(7):415-21, 2004.

Squires PE, Wakeman JA, Chapman H, Kumpf S, Fidock MD, Andrews PW, Dunne MJ. Regulation of intracellular Ca²⁺ in response to muscarinic and glutamate receptor agonists during the differentiation of NTERA2 human embryonal carcinoma cells into neurons. *Eur J Neurosci.*, 8(4):783-93, 1996.

Staines WA, Craig J, Reuhl K, McBurney MW. Retinoic acid treated P19 embryonal carcinoma cells differentiate into oligodendrocytes capable of myelination. *Neuroscience*, 71(3):845-53, 1996.

Staines, WA; Morassutti, DJ; Reuhl, KR; Ally, AI; McBurney, MW. Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells have varied morphologies and neurotransmitters. *Neuroscience.* 58(4):735-751, 1994.

Stewart, C.L.; Gadi, I.; Bhatt, H. Stem cells from primordial. germ cells can reenter the germ line. *Dev. Biol.* 161:626–628, 1994.

Stojilkovic, S.S.; Tomic, M.; He, M-L.; Yan, Z.; Koshimizu, T-A.; Zemkova, H. Molecular Dissection of purinergic receptor channel. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1048: 116-130, 2005.

Stoop, R.; Thomas, S.; Rassendren, F.; Kawashima, W.; Buell, G.; surprenant, A.; North, R.A. Contribution of individual subunits to the multimeric P2X2 receptors: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol Pharmacol.*; 56:973-981, 1999.

Sun, X.P.; Stanley, E.F. an ATP-activated, ligand-gated ion channel on a cholinergic presynaptic nerve terminal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:1859-1863, 1996.

Svendsen, C.;N.; ter Borg, M.G.; Armstrong, R.J.; Rosser, A.E.; Chandran, S.; Ostensfeld, T.; Caldwell, M.A. A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Meth.* 85(2):141-52, 1998.

Svendsen, C.N.; Skepper, J.; Rosser, A.E.; ter Borg, M.G.; Tyres, P.; Ryken, T. Restricted growth potential of rat neural precursors as compared to mouse. *Brain Res Dev.* 99(2):253-8, 1997.

Swanson, K.D.; Reigh, C.; Landreth, G.E. ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X2 purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *J Biol Chem.* 273(32):19965-71, 1998.

Tang, K., Yang, J., Gao, X., Wang, C., Liu, L., Kitani, H., Atsumi, T., Jing, N. Wnt-1 promotes neuronal differentiation and inhibits gliogenesis in P19 cells. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 293: 167-173, 2002.

Tarnok, A.. Rare-event sorting by fixed-time flow cytometry based on changes in intracellular free calcium. *Cytometry.* 27(1):65-70, 1997.

Tarnok, A.; Ulrich, H. Characterization of pressure-induced calcium response in neuronal lines. *Cytometry*, 43:175-181, 2001.

Tenneti, L.; Gibbons, S.J.; Talamo, B.R. Expression and trans-synaptic regulation of P2X4 and P2Z receptors for extracellular ATP in parotid acinar cells. Effects of parasympathetic denervation. *J Biol Chem.* 273(41):26799-808, 1998.

Theis, M.G., Knorre, A., Kellersch, B., Moelleken, J., Wieland, F., Kolanus, W., Famulok, M. Discriminatory Aptamer Reveals Serum Response Element Transcription Regulated by Cytohesin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11221-11226, 2006.

Tomioka, A.; Ueno, S.; Kohama, K.; Goto, F.; Inoue, K. Propofol potentiates ATP-activated currents of recombinant P2X₄ receptor channels expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Neuroscience Letters*, 284: 167-170, 2000.

Townsend-Nicholson, A.; King, B.F.; Wildman, S.S.; Burnstock, G. Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X₄ and P2X_{4a} receptors. *Molecular Brain research*, 64: 246-254, 1999.

Trincavelli, M.L.; Falleni, A.; Chelli, B.; Tuscano, D.; Costa, B.; Gremigni, V.; Lucacchini, A.; Martini, C. A2A adenosine receptor ligands and proinflammatory cytokines induce PC 12 cell death through apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 66:1953-1962, 2003.

Trujillo CA, Nery AA, Martins AH, Majumder P, Gonzalez FA, Ulrich H. Inhibition mechanism of the recombinant rat P2X(2) receptor in glial cells by suramin and TNP-ATP. *Biochemistry*,45(1):224-33, 2006.

Tu, M.T., Luo, S.F, Wang, C.C., Chien, C.S., Chiu, C.T., Lin, C.C., Yang, C.M. P2Y(2) receptor-mediated proliferation of C(6) glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway, *Br. J. Pharmacol.* 129 (2000), pp. 1481–1489.

Tuerk, C.; Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249:505-510,1990.

Turetsky, D.M.; Huettner, J.E.; Gottlieb, D.I.; Goldberg, M.P.; Choi, D.W. Glutamate receptor-mediated currents and toxicity in embryonal carcinoma cells. *J Neurobiol.* 24(9):1157-69, 1993.

Udgaonkar, J.B.; Hess, G. Chemical kinetic measurements of a mammalian acetylcholine receptor by a fast-reaction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8758, 1987.

Ulrich, H. Signaltransduktion bei der proliferationsstimulierung durch das neuropeptid kopfaktivator, dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie der Unibersität Hamburg, (1995)

Ulrich, H., Magdesian, M.H., Alves, M.J.M. and Colli, W. *In vitro* selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J. Biol. Chem.* 277, 20756-62, 2002.

Ulrich, H.; Gameiro, A.M. Aptamers as tools to study dysfunction in the neuronal system. *Curr.Med. Chem-central nervous system agents*, 1:1-8, 2001.

Ulrich, H.; Ippolito, J.E.; Pagán, O.R.; Eterovík, V.A.; Hann, R.M.; Shi, H.; Lis, J.T.; Eldefrawi, M.E.; Hess, G.P. In vitro selection of RNA molecules that displace cocaine from the membrane-bound nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95:14051-14056, 1998.

Ulrich, H.; Majumder, P. Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications. *Cell Prolif.* 39(4):281-300, 2006.

Ulrich, H.; Martins, A.H.; Pesquero, J.B. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. *Cytometry A.* 59(2):220-31, 2004.

Ulrich, H.; Tárnok, A.; Schaller, H.C. Head-activator induced mitosis of NH15-CA2 cells requires calcium influx and hyperpolarization. *J. Physiology*, 90:85-94, 1996.

Ulrich, H.; Trujillo, C.A.; Nery, A.A.; Alves, J.M.; Majumder, P.; Resende, R.R.; Martins, A.H. DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications. *Comb Chem High Throughput Screen.* 9(8):619-32, 2006.

Virginio, C.; MacKenzie, A.; Rassendren, F.A.; Noth, R.A.; Surprenant, A. Pore dilation of neuronal P2X receptors channels. *Nature neuroscience*, V2 (4) : 315-321, 1999.

Von Kugelgen, I.; Wetter, A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362(4-5):310-323, 2000.

Wallen, A; Perlmann, T. Transcriptional control of dopamine neuron development. *Ann N Y Acad Sci.* 991:48-60, 2003.

Wang L, Jacobsen SE, Bengtsson A, Erlinge D. P2 receptor RNAm expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC Immunol.*, 5(1):16, 2004.

Wang, C.; Zhang, M.; Yang, G.; Zhang, D.; Ding, H.; Wang, H.; Fan, M.; Shen, B.; Shao, N. Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *J Biotechnol.* 102(1):15-22, 2003.

Wang, C-Z.; Namba, N.; Gonoï, T.; Inagaki, N.; Seino, S. Cloning and pharmacological characterization of fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochem. Biophys.Res.Commun.*, 220:196-202, 1996.

Webb, S.E.; Miller, A.L. Ca²⁺ signaling and early embryonic patterning during the blastula and gastrula periods of zebrafish and *Xenopus* development. *Biochim Biophys Acta.* 1763(11):1192-208, 2006.

Weissman, T.A.; Riquelme, P.A.; Ivic, L.; Flint, A.C.; Kriegstein, A.R. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43(5):647-61, 2004.

Werstuck, G.; Green, M.R. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science.* 282(5387):296-8, 1998.

Weston, J.A. The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv Morphog.* 8:41-114, 1970.

Williams, BP; Milligan, CJ; Street, M; Hornby, FM; Deuchars, J; Buckley, NJ. Transcription of the M1 muscarinic receptor gene in neurons and neuronal progenitors of the embryonic rat forebrain. *J Neurochem.* 88(1):70-7, 2004.

Willis, M.C.; Collins, B.D.; Zhang, T.; Green, L.S.; Sebesta, D.P.; Bell, C.; Kellogg, E.; Gill, S.C.; Magallanez, A.; Knauer, S.; Bendele, R.A.; Gill, P.S.; Janjic, N. Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjug Chem.*, 9(5):573-82, 1998.

Yamamoto, K., Korenaga, R., Kamiya, A., Ando, J. Fluid shear stress activates Ca²⁺ influx into human endothelial cells via P2X₄ purinoreceptors. *Circulation Research*, 87:385-391, 2000.

Yamamoto, K., Korenaga, R., Kamiya, A., Qi, Z., sokabe, M., Ando, J. P2X₄ receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.*, 279, H285-292, 2000.

Yamamoto, K.; Sokabe, T.; Matsumoto, T.; Yoshimura, K.; Shibata, M.; Ohura, N.; Fukuda, T.; Sato, T.; Sekine, K.; Kato, S.; Isshiki, M.; Fujita, T.; Kobayashi, M.; Kawamura, K.; Masuda, H.; Kamiya, A.; Ando, J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X₄-deficient mice. *Nat Med.* 12(1):133-7, 2006.

Yamashita H, Nakamura S. Nicotine rescues PC12 cells from death induced by nerve growth factor deprivation. *Neurosci Lett.*, 213(2):145-7, 1996.

Yavarone, MS; Shuey, DL; Tamir, H; Sadler, TW; Lauder, JM. Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology.* 47(6):573-84, 1993

Ye, W; Shimamura, K; Rubenstein, JL; Hynes, MA; Rosenthal, A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell.* 93(5):755-66, 1998.

Zhao, H.; Giver, L.; Shao, Z.; Affholter, J.A.; Arnold, F.H. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol.* 16(3):258-61, 1998.

Zuker, M. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*, 244, 48–52, 1989.

Súmula curricular

9. SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Paromita Majumder

Local e data de nascimento: São Paulo, 11/10/1975

EDUCAÇÃO

Colégio Bandeirantes, São Paulo (1990-1992)

Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas- Bacharelado em Ciências Biológicas, modalidade Biologia Molecular (1994-1997)

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)-Mestrado em Biologia Molecular, Mestrado sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo Krieger (1999-2001)

Instituto de Química, Universidade de São Paulo-Pós-graduação em Bioquímica, Doutorado sob orientação do Prof. Dr. Henning Ulrich (2002-2007).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Estágio no Sick Children Hospital, University of Toronto, Canada- sob supervisão do Dr. Steven Scherer (Abril- Junho, 1998)

Cornell University sob supervisão do Dr. George P. Hess, Nova York, EUA (Julho de 2002).

Cornell University sob supervisão do Dr. Manfred Lindau , Nova York, EUA (Fevereiro- Marco de 2005).

University of Texas sob supervisão do Dr. Vasanthi Jayaraman e do Dr. Roger G. O`Neil, Texas, EUA (Marco- Junho de 2006)

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado FAPESP, de 03/02 a 02/06 processo número: 01/14370-7

Monitoria: Participação na disciplina QBQ-220 noturno- Bioquímica para Biologia em 2003 e 2004 bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos)

de Souza SJ, Camargo AA, Briones MR, Costa FF, ..., **Majumder P**, ..., Brentani RR, Reis FL, Dias-Neto E, Simpson AJ. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2000; 97(23):12690-3.

Camargo AA, Dias-Neto E, Simão DF, ..., **Majumder P**, ..., , Reis LF, Brentani RR, Simpson AJ, de Souza SJ. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2001; 98(21):12103-8..

Martins AH, Resende RR, **Majumder P**, Faria M, Casarini DE, Tarnok A, Colli W, Pesquero JB, Ulrich H.* Neuronal Differentiation of P19 Embryonal Carcinoma Cells Modulates Kinin B2 Receptor Gene Expression and Function. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(20):19576-86.

Majumder P; Faria M; Ulrich H.* Targeting DNA associated processes for cancer therapy by the use of SELEX and anti-gene approaches - when selection meets rational design. *Medicinal Chemistry Reviews-Online* 2005,. 2 (3):. 257-264.

Trujillo CA., Nery AA., Martins AH, **Majumder P**, Gonzale, FA, Ulrich H* Inhibition Mechanism of the Recombinant Rat P2X₂ Receptor in Glial Cells by Suramin and TNP-ATP. *Biochemistry.* 2006; 45(1):224-33.

Ulrich, H.* & **Majumder, P**. Embryonal carcinoma and stem cells: From basic research of neuronal differentiation towards clinical applications. *Cell Proliferation* 2006; 39(4):281-300.

Ulrich H*, Trujillo CA, Nery AA, Alves JM, **Majumder P**, Resende RR, Martins AH. DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2006;9(8):619-32.

Trujillo CA; **Majumder P**; Gonzalez FA; Moaddel R; Ulrich H.* Immobilized P2X₂ Purinergic Receptor Stationary Phase for Chromatographic Determination of Pharmacological Properties and Drugs Screening. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 44(3):701-10.

Resende RR; **Majumder P**, Gomes KN, Britto LRG, Ulrich H.* P19 embryonal carcinoma cells as *in vitro* model for studying purinergic receptor expression and modulation of NMDA-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience*, 2007, 146(3):1169-81.

BOLSAS/PRÊMIOS:

2006-IDENTIFICATION OF SPECIFIC INHIBITORS DIFFERENTIATING BETWEEN P2X₂ AND P2X₄ RECEPTOR SUBTYPES BY USING THE SELEX TECHNIQUE. **Paromita Majumder**, Cleber Augusto Trujillo, and Henning Ulrich*. O trabalho foi pré-selecionado na competição de melhor pôster na 35^o reunião anual da sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, SP.

2005- CHARACTERIZATION OF RNA APTAMERS AS SPECIFIC INHIBITORS OF P2X₄ RECEPTORS. **Paromita Majumder**, Cleber Augusto Trujillo, and Henning Ulrich.* O trabalho recebeu o prêmio de melhor pôster na 34^o reunião anual da sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, SP.

2005- CHARACTERIZATION OF RNA APTAMERS AS SPECIFIC INHIBITORS OF P2X₄ RECEPTORS. **Paromita Majumder**, Cleber Augusto Trujillo, and Henning Ulrich*. Este trabalho ganhou menção honrosa na 12^o reunião anual da Fesbe, Águas de Lindóia, SP.

2004- CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR PURINÉRGICO P2X₂ EM CÉLULA GLIAL 1321N1 TRANSFECTADAS. Cleber Augusto Trujillo, **Paromita Majumder** e Henning Ulrich*. SIICUSP. Este trabalho ganhou menção honrosa na 12^o no SICUSP (USP).

APRESENTAÇÕES ORAIS

2006-INHIBITORS OF PURINERGIC RECEPTORS DURING NEURONAL DIFFERENTIATION OF P19 CELLS ALTERS EXPRESSION AND ACTIVITY OF

MUSCARINIC ACETYLCHOLINE AND NMDA RECEPTORS. **Majumder, P.** & Ulrich, H*. O trabalho foi apresentado na 13^o reunião anual da FesBE, Aguas de Lindóia, SP.

2005- *CHARACTERIZATION OF RNA APTAMERS AS SPECIFIC INHIBITORS OF P2X₄ RECEPTORS.* **Majumder, P.**, Trujillo, C.A., and Ulrich, H*. O trabalho foi apresentado na XX reunião anual da FesBE, Aguas de Lindóia, SP.

2004 *SELEX FOR NUCLEASE-RESISTANT APTAMERS THAT INHIBIT P2X₄ RECEPTOR FUNCTION.* **Majumder, P.**, Gonzalez, F.A, Ulrich, H*. O trabalho foi apresentado na XXXIII reunião anual da sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, SP.