

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

Rodrigo La Banca de Oliveira

**Sinergia entre os receptores purinérgicos e o fator de
crescimento de nervos (NGF) na diferenciação e
proliferação de células tronco neurais**

**Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secreteria da Pós-graduação do
IQ-USP**

São Paulo

20/08/2013

Rodrigo La Banca de Oliveira

**Sinergia entre os receptores purinérgicos e o fator de
crescimento de nervos (NGF) na diferenciação e
proliferação de células tronco neurais**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48s Oliveira, Rodrigo La Banca de
Sinergia entre os receptores purinérgicos e o fator de crescimento
de nervos (NGF) na diferenciação e proliferação de células tronco
neurais / Rodrigo La Banca de Oliveira. -- São Paulo, 2013.
65p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Ulrich, Alexander Henning

1. Química biológica 2. Diferenciação celular : Fisiologia I.
T. II. Ulrich, Alexander Henning, orientador.

574.192 CDD

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente aos meus pais, Adelaide Marina La Banca e Nelson Kaminski por todo o apoio que recebi tanto na minha carreira quanto em minha vida pessoal.

Também gostaria de agradecer ao professor Henning Ulrich pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela orientação durante o desenvolvimento do projeto.

Também devo muito aos colegas do laboratório de neurociências, especialmente à Michele Mainardi Pillat e Arquimedes Cheffer, que me ensinaram muito dentro do laboratório, mas também foram e continuam sendo grandes amigos fora dele.

Agradeço também à professora Telma Schwindt, que apesar de não fazer parte de meu projeto, me ensinou muito do que precisei para desenvolvê-lo.

Finalmente agradeço a todos que não foram citados aqui, mas que me apoiaram e ajudaram durante esses anos e também ao CNPq e FAPESP por financiarem esse projeto.

RESUMO

(Oliveira, R. L.) **Sinergia entre os receptores purinérgicos e o fator de crescimento de nervos (NGF) na diferenciação e proliferação de células tronco neurais.** 2013. 65p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os receptores purinérgicos são divididos em receptores P1 e P2 de acordo com o seu agonista endógeno, os receptores metabotrópicos P1 são ativados por adenosina, enquanto os metabotrópicos P2Y e ionotrópicos P2X são estimulados através do ATP e outros nucleotídeos. Além de sua função bem estabelecida na neurotransmissão, a sinalização purinérgica tem despertado crescente interesse científico devido à sua importância nas funções no metabolismo celular, incluindo os processos de desenvolvimento embrionário e reparação de tecidos. Isso ocorre especialmente no sistema nervoso central, onde eles controlam a proliferação, diferenciação, apoptose e a liberação de fatores neurotróficos. Nesse trabalho nós focamos nas ações sinérgicas entre a sinalização purinérgica e o fator de crescimento de nervos (NGF), tendo em vista três formas conhecidas de interação entre o NGF e os receptores purinérgicos, a potencialização dos efeitos do NGF através de uma ligação cruzada entre as vias, a regulação da expressão dos receptores purinérgicos pelo NGF e regulação da liberação de NGF pela adenosina. Com o objetivo de investigar estes processos sinérgicos na regulação da proliferação, migração e determinação fenotípica, células precursoras neurais foram obtidas do telencéfalo de embriões de rato e cultivadas na forma de neuroesferas, sendo então submetidas a tratamentos com agonistas e antagonistas dos receptores purinérgicos, em associação com o NGF, ao longo da diferenciação. Os efeitos desses tratamentos foram analisados por citometria de fluxo. Nós mostramos que o NGF age sobre as células

aumentando a proliferação, migração e população de células indiferenciadas e diminuindo a apoptose. A ativação dos receptores P1 levou à diminuição da gliogênese e ao aumento da proliferação e da migração. A estimulação de receptores P2 resultou em aumento da proliferação e redução da taxa de apoptose. Os receptores purinérgicos potenciaram a proliferação mediada por NGF, resultando assim num aumento da população de células indiferenciadas. Neste último efeito percebemos a participação do receptor P2Y₂ na sinergia. Os resultados aqui apresentados revelam novos mecanismos para a interação entre o NGF e a sinalização purinérgica na biologia de células tronco neurais.

Palavras-chave: receptores purinérgicos, NGF, diferenciação neural, proliferação

ABSTRACT

(Oliveira, R. L.) **Synergy between purinergic receptors and nerve growth factor (NGF) in the differentiation and proliferation of neural stem cells.** 2013. 65p. MSc Thesis – Graduate program in biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Purinergic receptors are divided into P1 and P2 receptors according to agonist selectivity, G-protein-coupled P1 receptors are activated by adenosine, while metabotropic P2Y and ionotropic P2X subtypes are stimulated by ATP and other nucleotides. In addition to its well-established function in neurotransmission, purinergic signaling has raised increasing scientific interest due to its importance in essential cellular functions and metabolism including embryonic developmental processes and tissue repair, specially in the central nervous system, where they control proliferation, differentiation, apoptosis and the release of neurotrophic factors. Here we focus on synergistic actions between purinergic P1 and P2 receptor-mediated signaling and the nerve growth factor (NGF), in view of three recognized forms of interaction between NGF and purinergic signaling, the potencialization of NGF-mediated effects through a crosstalk, the regulation of purinergic receptor expression by NGF and the regulation of NGF release by adenosine. With the objective to investigate such synergistic processes in regulating proliferation, neural migration and phenotype determination, neurospheres obtained as proliferating neural stem and progenitor from rat embryonic telencephalon were subjected to treatments with purinergic receptor agonists and antagonists in association with NGF along differentiation. Effects of these treatments were analyzed by flow cytometry. We show that NGF acted on cells by increasing the population of undifferentiated cells, proliferation, migration and reducing apoptosis. P1 receptor activation led to decreased gliogenesis, increased proliferation and migration. Stimulation of P2 receptors resulted in increased proliferation and decreased apoptosis rates. Purinergic receptors potentiated NGF-mediated

proliferation, thereby resulting in increased population of undifferentiated cells, in this latter effect, the P2Y₂ receptor subtype participated in synergistic processes. The herein presented results reveal novel mechanisms for the interaction of NGF and purinergic signaling in neural stem cell biology.

Keywords: purinergic receptors, NGF, neural differentiation, proliferation

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 SISTEMA PURINÉRGICO.....	10
1.1.1 ATP como um Neurotransmissor.....	10
1.1.2 Estrutura e Classificação dos Receptores Purinérgicos.....	11
1.1.3 Degradação do ATP na Fenda Sináptica.....	14
1.1.4 Receptores Purinérgicos no Desenvolvimento Embrionário.....	16
1.1.4.1 Receptores purinérgicos no desenvolvimento do sistema nervoso central.....	17
1.2 FATOR DE CRESCIMENTO DE NERVOS.....	19
1.2.1 Descoberta do NGF.....	19
1.2.2 Neurotrofinas.....	20
1.2.3 Fator de Crescimento de Nervos em Células Tronco Neurais.....	22
1.2.4 Interação Entre o Fator de Crescimento de Nervos e os Receptores Purinérgicos.....	23
1.3 DIFERENCIAÇÃO DO TECIDO NERVOSO.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 EXTRAÇÃO DE NEUROESFERAS.....	28
3.2 DIFERENCIAÇÃO DAS NEUROESFERAS.....	28
3.3 DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA.....	29
3.4 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE BRDU.....	31
3.5 ENSAIO DE TUNEL.....	31
3.6 MEDIDA DA MIGRAÇÃO.....	32
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32

4. RESULTADOS	33
4.1 EFEITO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS PURINÉRGICOS E NGF NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURAIIS.....	33
4.2 EFEITO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS PURINÉRGICOS E NGF NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURAIIS.....	36
4.3 EFEITO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS PURINÉRGICOS E NGF NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURAIIS.....	39
4.4 EFEITO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS PURINÉRGICOS E NGF NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURAIIS.....	39
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS	49
8. LISTA DE ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA PURINÉRGICO

1.1.1 ATP como um Neurotransmissor

A estrutura do ATP e o seu papel no metabolismo energético já é conhecido desde o final da década de 1920 (FISKE; SUBBAROW, 1929; LOHMANN, 1929). As primeiras observações que podem ser atribuídas ao sistema purinérgico na neurotransmissão ocorreram no sistema nervoso autônomo, ainda no século XIX, ao se observar o relaxamento do estômago de gatos após a estimulação do nervo vago (LANGLEY, 1898), mas esse efeito inicialmente atribuído à inervação simpática (BURNSTOCK, 1972) e mais tarde aos receptores adrenérgicos (AMBACHE; EDWARDS, 1951). Na década de 1960 foi demonstrado que o efeito também não era mediado pelo sistema adrenérgico (GREEFF; MENG; MOOG, 1962), mas houve bastante resistência a essa descoberta, apenas após vários estudos mais detalhados a ideia que se tratava de uma sinalização não colinérgica e não adrenérgica passou a ser aceita (BULBRING; TOMITA, 1967; KURIYAMA, 1963). Em vista disso várias substâncias foram exploradas como possíveis neurotransmissores, incluindo as catecolaminas, serotonina, AMP cíclico, histamina, prostaglandinas, bradicinina e vários aminoácidos (BURNSTOCK, 1972).

Durante o início da segunda metade do século XX várias evidências do papel do ATP como o neurotransmissor não adrenérgico não colinérgico surgiram. Estudos usando marcadores radioativos demonstraram a captação de AMP, ADP e ATP por células nervosas, onde são convertidos em ATP e estocados (BENNETT; ROGERS, 1967), sendo que mais ATP é estocado no tecido nervoso do que em qualquer outro tecido, incluindo o tecido muscular (SU; BEVAN; BURNSTOCK, 1971). Em 1959 Pamela Holton demonstrou que existe liberação de ATP no espaço extracelular em quantidade suficiente para ter efeitos fisiológicos, após estimulação do

nervo auricular maior o ATP é liberado em quantidade suficiente para causar vasodilatação (HOLTON, 1959). Foi questionado se o ATP não teria seu efeito através de mecanismo indireto, mas essa possibilidade foi refutada após Geoffrey Burnstock demonstrar que o efeito inibitório do ATP no intestino de porquinhos-da-índia era abolido pela tetrodotoxina, uma neurotoxina que bloqueia os potenciais de ação ao se ligar a canais de sódio voltagem dependentes (BURNSTOCK et al., 1970).

A existência de receptores purinérgicos foi finalmente proposta por Burnstock em 1976 (BURNSTOCK, 1976), inicialmente houve uma resistência muito grande à ideia de que o ATP, já classicamente associado à síntese de ácidos nucleicos e ao metabolismo energético, poderia também atuar como um neurotransmissor, mas após quatro décadas de pesquisas a importância do sistema purinérgico se torna cada vez mais clara.

1.1.2 Estrutura e Classificação dos Receptores Purinérgicos

Quando propôs a existência de receptores purinérgicos, Burnstock já sugeria a existência de receptores diferentes tendo o ATP e a adenosina como agonistas endógenos, a confirmação veio dois anos depois, sendo os receptores de adenosina classificados como P1 e os receptores de ATP classificados como P2 (BURNSTOCK, 1978).

No ano seguinte Dietrich van Calker sugeriu a existência de dois subtipos diferentes de receptores P1, os receptores A_1 e A_2 , com base na resposta a diferentes drogas (VAN CALKER; MULLER; HAMPRECHT, 1979). A existência do receptor A_3 foi proposta apenas em 1986, provavelmente devido a sua baixa afinidade à adenosina (RIBEIRO; SEBASTIAO, 1986). Em 1992 Jörg Stehle propôs a separação dos receptores A_{2A} e A_{2B} com base na sequência de DNA (STEHLE et al., 1992), chegando na classificação utilizada hoje.

Enquanto isso os receptores P2 foram sendo subdivididos de acordo com sua afinidade a diferentes agonistas e antagonistas, chegando a um ponto em que haviam receptores P2X, P2Y, P2T, P2S, P2N, P2U, P2Z e P2D (FREDHOLM et al., 1994). Em 1994 Burnstock e Maria Abbracchio sugeriram uma nova classificação para os receptores P2 com base em sua estrutura e não na farmacologia, estabelecendo assim os receptores P2X e P2Y, que são receptores de canais iônicos e receptores metabotrópicos, respectivamente (ABBACCHIO; BURNSTOCK, 1994). Hoje já são reconhecidas sete subunidades diferentes de receptores P2X (P2X₁₋₇) e oito subtipos de receptores P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄) (BURNSTOCK, 2007).

Os receptores P1 possuem sete α -hélices transmembranas, com segmento amino-terminal extracelular e o segmento carboxi-terminal citoplasmático. O segmento citoplasmático dos receptores P1 se liga a proteína G (BURNSTOCK, 2007). Os receptores A₁ e A₃ ligam-se a proteína G_{i/o}, causando a diminuição da concentração intracelular de AMPc quando ativados, enquanto os receptores A_{2A} e A_{2B} se ligam a proteína G_s, aumentando a concentração de AMPc após ativação. A afinidade dos receptores A₁ e A_{2A} para a adenosina é bastante alta, sendo ativados em concentrações de poucos η M, a afinidade do receptor A_{2B} é considerada intermediária e do receptor A₃ baixa, o que leva a acreditar que apenas os receptores A₁ e A_{2A} são ativados em condições fisiológicas (FREDHOLM et al., 1994).

Já foi demonstrada a formação de complexos entre os receptores P1 e receptores de dopamina (FUXE et al., 2007).

Os receptores P2X são multímeros formados por três subunidades cujo agonista endógeno é o ATP. Cada subunidade é formada por dois segmentos transmembranas com ambos os segmentos terminais citoplasmáticos. Esses receptores são canais iônicos, todos permeáveis ao íon Ca²⁺, mas alguns também à Na⁺, K⁺ e Cl⁻ (BURNSTOCK, 2007). A afinidade da maioria dos receptores P2X ao ATP se encontra na faixa de 1 a 10 μ M para a maioria dos receptores, sendo

o receptor P2X₇ a única exceção, tendo uma afinidade bem menor, na faixa de 100 a 1000 μ M (ABBRACCHIO et al., 2009).

Os receptores P2X também podem formar heteromultímeros. Já foram identificados receptores P2X_{1/2,1/4,1/5,2/3,2/6,4/6,4/7}, a subunidade P2X₆ é incapaz de formar homomultímeros funcionais (ABBRACCHIO et al., 2009).

Os receptores P2Y são, assim como os receptores P1, receptores metabotrópicos com sete segmentos transmembrana, com o amino-terminal no lado extracelular e o carboxi-terminal no lado intracelular. Também são receptores ligados à proteína G, os receptores P2Y_{1,2,4,6} se ligam à proteína G_{q/11}, o receptor P2Y₁₁ tanto à G_{q/11} quanto à G_s, os receptores P2Y_{12,13} à proteína G_i e o P2Y₁₄ à proteína G_{i/o} (BURNSTOCK, 2007). Diferente dos receptores P1 e P2X, os receptores P2Y possuem uma variedade grande com relação aos seus ligantes endógenos apresentados, incluindo ADP, UTP, UDP, NAD⁺, NAADP⁺, UDP-glucose e UDP-galactose (ABBRACCHIO et al., 2009). Foi sugerida a existência do receptor P2Y₈, isolado do embrião de sapos (BOGDANOV et al., 1997), mas não foi encontrado nenhum homólogo em mamíferos (ADRIAN et al., 2000). Também já foi sugerido que os receptores P2Y podem ser divididos em dois subgrupos, com relação à filogenia e à sequência de DNA, um subgrupo formado pelos receptores P2Y_{1,2,4,6,11} e outro pelos receptores P2Y_{12,13,14}. Quando ativados, os receptores do primeiro subgrupo ativam a fosfolipase C β (PLC- β), mobilizando depósitos intracelulares de Ca²⁺, enquanto os do segundo subgrupo diminuem a concentração de AMPc no citosol (ABBRACCHIO et al., 2006).

Os receptores P2Y já mostraram a capacidade de formar homo ou heterodímeros com outros receptores P2Y (ECKE et al., 2008) e também com receptores P1 (FISCHER; KRUGEL, 2007).

Um resumo dessas informações pode ser encontrada na tabela 1.

Tabela 1. Classificação atual dos receptores purinérgicos, seus respectivos agonistas endógenos e as suas vias de transdução de sinal

Família	Receptor	Agonista endógeno	Transdução de sinal
P1	A ₁	Adenosina	↓ AMPc
	A _{2A}	Adenosina	↑ AMPc
	A _{2B}	Adenosina	↑ AMPc
	A ₃	Adenosina	↓ AMPc e ativação da PLC-β
P2X	P2X ₁	ATP	Canais iônicos
	P2X ₂	ATP	Canais iônicos
	P2X ₃	ATP	Canais iônicos
	P2X ₄	ATP	Canais iônicos
	P2X ₅	ATP	Canais iônicos
	P2X ₆	ATP	Canais iônicos
	P2X ₇	ATP	Canais iônicos e formação de poro
P2Y	P2Y ₁	ADP	Ativação da PLC-β
	P2Y ₂	ATP, UTP	Ativação da PLC-β
	P2Y ₄	UTP	Ativação da PLC-β
	P2Y ₆	UDP	Ativação da PLC-β
	P2Y ₁₁	ATP, NAD ⁺ , NAADP ⁺	↑ AMPc e ativação da PLC-β
	P2Y ₁₂	ADP	↓ AMPc
	P2Y ₁₃	ADP	↓ AMPc
	P2Y ₁₄	UDP-glucose, UDP-galactose	↓ AMPc

1.1.3 Degradação do ATP na Fenda Sináptica

O ATP liberado na fenda sináptica pode sofrer hidrólise enzimática para formar ADP, AMP ou adenosina. Isso é importante não apenas para cessar o sinal já enviado, mas também para sejam enviados sinais através de receptores P1 e P2Y_{1,12,13}. As enzimas que catalisam essa hidrólise são conhecidas como ecto-nucleotidases. Existem quatro famílias principais de ectonucleotidases, as ecto-nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDases), as ecto-nucleotídeo pirofosfato fosfodiesterase (ENPPs), as fosfatases alcalinas e a ecto-5'-nucleotidase (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRATER, 2012).

As E-NTPDases também são conhecidas como CD39, existem oito enzimas diferentes reconhecidos em humanos. Essas enzimas catalisam a hidrólise de nucleotídeos trifosfato e difosfato a nucleotídeos monofosfato. O papel de hidrolisar os nucleotídeos monofosfato a

nucleosídeos muitas vezes é feito pela ecto-5'-nucleotidase, também conhecida por CD73 (ZIMMERMANN et al., 2012).

As outras duas famílias não possuem a mesma especificidade da E-NTPDases e da ecto-5'-nucleotidase. As ENPPs hidrolisam nucleotídeos trifosfato e difosfato a nucleotídeos monofosfato, como as E-NTPDases, mas também atuam sobre dinucleotídeos polifosfato, ADP-ribose, derivados do ácido nicotínico e fosfolípídeos, existem sete enzimas reconhecidas em seres humanos. As fosfatases alcalinas hidrolisam os nucleotídeos trifosfato, difosfato, monofosfato e uma grande variedade de monoésteres do ácido fosfórico, são conhecidas três enzimas nessa família (ZIMMERMANN et al., 2012). A figura 1 mostra um esquema da degradação do ATP.

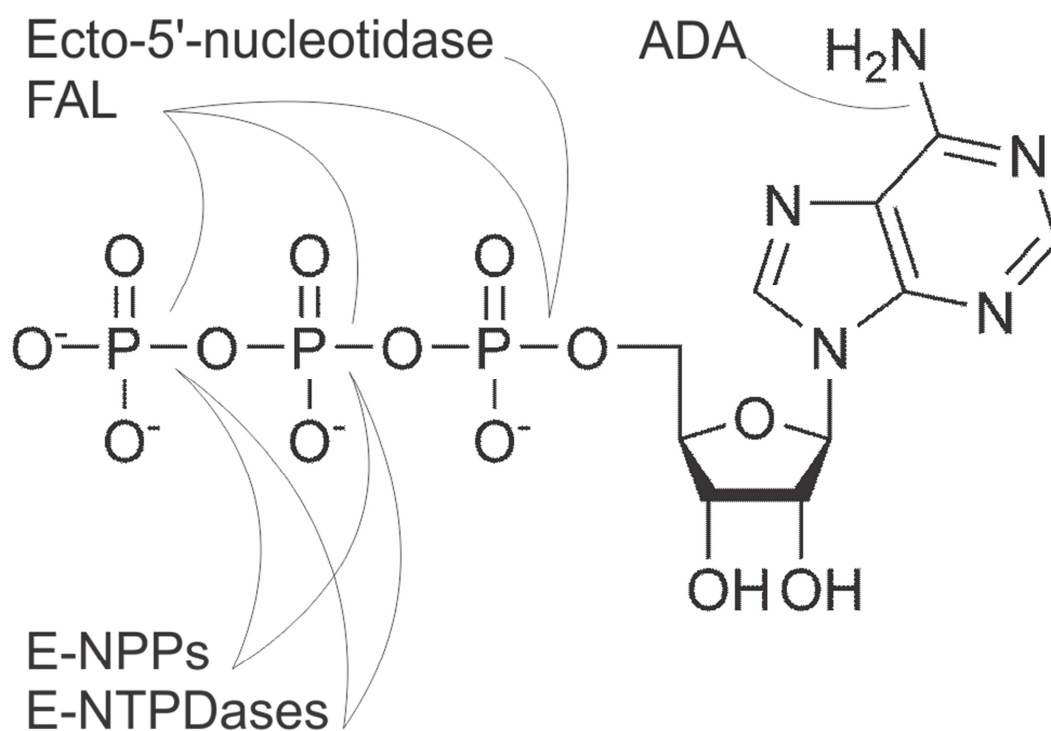


Figura 1. Esquema mostrando a degradação do ATP. As flechas indicam os sítios da hidrólise do ATP, ADP e AMP. Também demonstra a desaminação da adenosina pela adenosina desaminase. E-NTPDases = Ecto-nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase. ENPPs = Ecto-nucleotídeo pirofosfato fosfodiesterase. FAL = Fosfatases alcalina. ADA = Adenosina desaminase.

Já foi demonstrado em vários tecidos, inclusive no sistema nervoso, a presença da enzima adenosina desaminase, que converte a adenosina à inosina, cessando a transmissão através de receptores P1 (SCHRADER; WEST; STROMINGER, 1987; YAMAMOTO et al., 1987).

1.1.4 Receptores Purinérgicos no Desenvolvimento Embrionário

A sinalização através de receptores purinérgicos está presente desde muito cedo no período embrionário. Na verdade existem boas indicações de que seu papel se inicia antes mesmo da formação do embrião, durante a fertilização. Já foi demonstrado que o influxo de sódio que media a sinalização espermatozoide-óvulo é desencadeado pelo ATP (KUPITZ; ATLAS, 1993), assim como a ativação do acrossomo nos espermatozoides (FORESTA; ROSSATO; DI VIRGILIO, 1992).

Junto com os receptores muscarínicos, os receptores purinérgicos são os primeiros a ser expressos em embriões de galinhas. O aumento na concentração citosólica de Ca^{2+} desencadeada pelo ATP nas células da gástrula nesses animais é comparável com a desencadeada pela acetilcolina e mais alta do que a desencadeada por catecolaminas e neuropeptídios (LAASBERG, 1990). Em anfíbios, onde a aplicação de suramina, um inibidor inespecífico de receptores P2, impede a formação da cabeça, do tronco e, em alguns casos, até a cauda (GERHART et al., 1989). Em mamíferos o efeito pode ser observado ainda mais cedo, com a adenosina inibindo a segunda e terceira clivagem do zigoto (NUREDDIN; EPSARO; KIESSLING, 1990), mas esse efeito desaparece após 34 horas da fertilização (LOUTRADIS; JOHN; KIESSLING, 1987). O fato desse efeito ser revertido por drogas que aumentam a concentração intracelular de AMPc (FISSORE; O'KEEFE; KIESSLING, 1992) indicam a possível participação dos receptores A1 ou A3. Esses fatos em conjunto indicam uma importância grande da sinalização através de purinas no desenvolvimento inicial do embrião (BURNSTOCK; ULRICH, 2011).

Além desse efeito nas fases iniciais do desenvolvimento, os receptores purinérgicos parecem participar na modulação de vários processos no desenvolvimento de vários tecidos, como a função cardíaca (EGERMAN; BISSONNETTE; HOHIMER, 1993), desenvolvimento das junções neuromusculares (FU, 1995), crescimento de neuritos e sobrevivência de neurônios no sistema nervoso periférico (WAKADE et al., 1995), início do desenvolvimento dos olhos (MASSE et al., 2007), inervação do ouvido interno e morfogênese da cóclea (NIKOLIC et al., 2001).

1.1.4.1 Receptores purinérgicos no desenvolvimento do sistema nervoso central

Os receptores purinérgicos possuem um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, induzindo a diferenciação celular, apoptose, proliferação, síntese e liberação de fatores neurotróficos (NEARY, J. T. et al., 1996; RATHBONE et al., 1999). Evidências mostram que esse papel se dá em grande parte graças ao aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} (GLASER; RESENDE; ULRICH, 2013).

Um papel bastante importante se dá através do receptor $P2Y_1$, a migração dos neuroblastos para a região do neocórtex se dá principalmente através das glias radiais, estimulada por ondas de cálcio propagadas através desses receptores. As glias radiais produzem os neuroblastos e astrócitos através de divisão assimétrica, e a passagem da fase G1 para S também é mediada por esse receptor (WEISSMAN et al., 2004). Esse efeito é potenciado pela alta expressão da NTPDase 2 nas glias radiais, que possui mais afinidade por nucleotídeos trifosfato do que os difosfato, produzindo assim ADP, agonista endógeno do receptor $P2Y_1$ (BRAUN et al., 2003). A expressão dessa ectonucleotidase ocorre após a diferenciação das glias radiais à astrócitos (MISSION; TAKAHASHI; CAVINESS, 1991).

Estudos usando RNA de interferência para inibir a expressão de $P2X_2$ indicam um papel importante desse receptor na neurogênese, já que levou a um aumento da proliferação

associado a uma diminuição da população de células que expressão o marcador neuronal β 3-tubulina, enquanto a inibição da expressão do receptor P2X₇ levou a uma menor expressão do marcador glial GFAP (YUAHASI et al., 2012). Outro receptor P2X que parece ter importância no processo de diferenciação é o P2X₆, especialmente uma variante de splicing presente e proporção maior durante o período embrionário (DA SILVA; RESENDE; ULRICH, 2007). É possível que os receptores purinérgicos exerçam seus efeitos interagindo com outras vias de sinalização, já que a inibição dos receptores P2Y₁ e P2X₂ levam a uma perda de ação dos receptores NMDA ao final da diferenciação, enquanto a inibição dos receptores P2Y₂ e P2X₂ leva ao mesmo efeito nos receptores colinérgicos (RESENDE et al., 2007).

Os receptores P2 estão bastante associados ao crescimento de neuritos em células de feocromocitoma PC12, aparentemente mediado por receptores P2Y (BELLIVEAU et al., 2006), mas o efeito contrário foi demonstrado em neurônios motores, mediado por receptores P2X₃ (CHEUNG; CHAN; BURNSTOCK, 2005). Em células de neuroblastoma SH-SY5Y o crescimento foi estimulado por UTP via receptores P2Y₄, que também levou a diferenciação e, em doses maiores, apoptose (CAVALIERE et al., 2005), a ativação de receptores A₁ e A_{2A} também levou a esse efeito nessas células (CANALS et al., 2005).

As células gliais expressam uma variedade bastante grande de receptores purinérgicos (ZIMMERMANN, 2006). Em astrócitos, o ATP e o UTP promovem a migração e proliferação (NEARY, J.T. et al., 2001), por outro lado a adenosina induz apoptose (DI IORIO et al., 2002). Estudos com RNA de interferência indicam que o receptor P2X₇ tem um papel importante na gliogênese . (YUAHASI et al., 2012) Em células precursoras de oligodendrócitos a ativação de receptores P2Y aumenta a migração, mas inibe os efeitos mitogênicos do PDGF (AGRESTI et al., 2005), a ativação dos receptores A₁ também aumenta a migração (OTHMAN; YAN; RIVKEES, 2003). Em células de Schwann, tanto o ATP quanto a adenosina inibem a proliferação, mas

apenas o ATP inibe a diferenciação e mielinização (STEVENS; FIELDS, 2000; STEVENS et al., 2004).

Em conjunto essas informações demonstram que os receptores purinérgicos possuem um grande papel no desenvolvimento embrionário, incluindo a formação do sistema nervoso central.

1.2 FATOR DE CRESCIMENTO DE NERVOS

1.2.1 Descoberta do NGF

A descoberta do fator de crescimento de nervos (NGF) se iniciou com uma pergunta: o que guia o crescimento dos nervos em direção ao tecidos periféricos inervados pelos mesmos? Vários estudos foram realizados removendo-se os brotos dos membros em embriões. As observações mostravam que havia um aumento na morte de neurônios imaturos. Duas hipóteses foram propostas: Viktor Hamburger propôs que havia a remoção dos brotos levava a uma falha na diferenciação das células nervosas, enquanto Rita Levi-Montalcini propôs que o que ocorria era um processo degenerativo. Em 1949, o pesquisador Elmer Bueker transplantou um sarcoma murino em um embrião de galinha e observou um crescimento exagerado de nervos na direção do sarcoma, e propôs que isso se devia ao fato do tumor ser maior que os brotos de membros. Levi-Montalcini discordou da interpretação e reproduziu o experimento, chegou aos mesmos resultados, mas os interpretou de forma diferente, sugerindo que a liberação de alguma substância pelo tumor estimulava o crescimento e diferenciação das células nervosas (ALOE, 2011).

Para testar a hipótese Levi-Montalcini e Hamburger testaram o extrato do sarcoma em culturas de neurônios sensoriais e observaram um claro aumento na neuritogênese (LEVI-

MONTALCINI; HAMBURGER, 1951). Numa tentativa de isolar o fator responsável pelo efeito Levi-Montalcini e Stanley Cohen usaram veneno de cobra (fonte rica de fosfodiesterases) para tentar separar as frações de proteína e de ácidos nucleicos, para a surpresa de ambos a fração contendo o veneno de cobra teve um efeito muito maior. Eles então procuraram um homólogo em mamíferos, e observaram um efeito ainda maior na neuritogênese com o extrato da glândula salivar submandibular de ratos, e foi dessa fonte que o NGF foi isolado pela primeira vez (LEVI-MONTALCINI; COHEN, 1960).

1.2.2 Neurotrofinas

O NGF foi apenas o primeiro fator descoberto da família das neurotrofinas, que hoje possui quatro membros conhecidos em mamíferos. Além do NGF também são conhecidos o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (BARTKOWSKA; TURLEJSKI; DJAVADIAN, 2010). Já foi identificada a neurotrofina-6 (NT-6) e a neurotrofina-7 (NT-7), mas elas não são expressas em mamíferos (GOTZ et al., 1994; LAI et al., 1998).

Todas as neurotrofinas são sintetizadas na forma de pre-pro-neurotrofinas, sendo um segmento sinalizador para a secreção (pre-proteína) e para o precursor (pro-proteína) (SEIDAH et al., 1996; THOENEN, 1995). Após a clivagem é formada a pro-neurotrofina, que pode ser processada ainda no retículo endoplasmático ou ser secretada na forma de pro-neurotrofina (SEIDAH et al., 1996), as pro-neurotrofinas podem ser processadas no meio extracelular por plasminas (PANG et al., 2004).

As neurotrofinas se ligam a três diferentes famílias de receptores, os receptores tropomiosina quinase (TrkA, TrkB e TrkC), receptores do tipo tirosina quinase, o p75NTR, um receptor da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) e à sortilina, uma proteína

transmembrana contendo o domínioVps10p (BARTKOWSKA et al., 2010). O NGF se liga ao receptor TrkA, o BDNF e o NT-4/5 ao receptor TrkB, e a NT-3 ao receptor TrkC, mas também ao TrkB e TrkA com menor afinidade. Todas as neurotrofinas se ligam ao p75NTR com menor afinidade. Todas as pro-neurotrofinas se ligam com afinidade semelhante ao p75NTR e sortilina. A figura 2 contém um esquema mostrando isso.

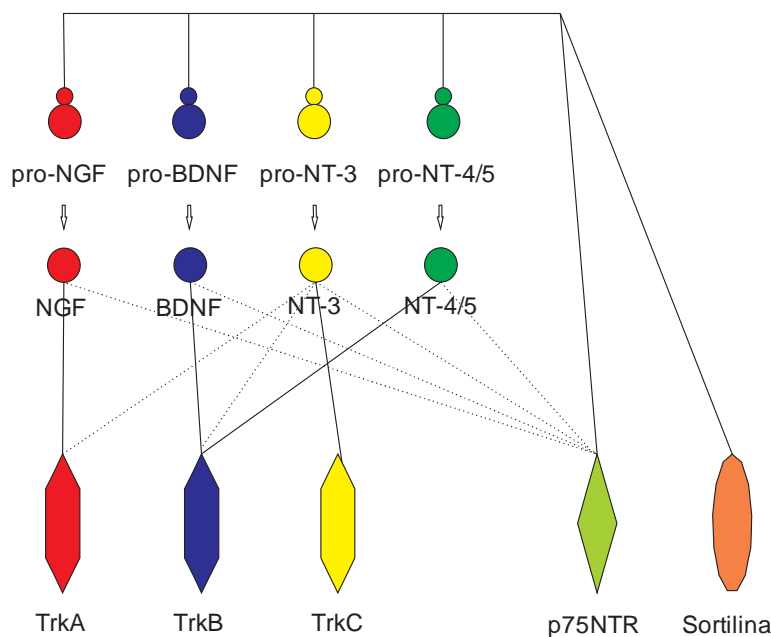


Figura 2. Ligação da neurotrofinas e pro-neurotrofinas a seus receptores. As linhas cheias definem ligação de alta afinidade, enquanto as pontilhadas baixa afinidade.

Curiosamente, parece existir uma interação entre os receptores Trk e o p75NTR. Já foi demonstrado que o bloqueio do receptor p75NTR fazendo uso de anticorpos em células PC12 diminui o efeito de crescimento de neuritos mediado por TrkA (BARKER; SHOOTER, 1994). Outro exemplo é o fato de células que co-expressam o TrkA e o p75NTR a afinidade do TrkA pelo NGF é maior, enquanto a afinidade pela NT-3 diminui (BENEDETTI; LEVI; CHAO, 1993). O mecanismo dessa interação ainda é desconhecido, mas algumas evidências interessantes já surgiram. Em um trabalho recente foi demonstrado que a expressão de um oligopeptídeo de 29 aminoácidos com a mesma sequência de um domínio intracelular do p75NTR é o suficiente para aumentar a afinidade do TrkA pelo NGF (MATUSICIA et al., 2013).

1.2.3 Fator de Crescimento de Nervos em Células Tronco Neurais

Os efeitos do NGF em células tronco neurais variam bastante de acordo com a concentração a qual as células são expostas. Um excelente exemplo disso foi o trabalho de Lei Zhang com precursoras neurais derivadas do gânglio estatoacústico. Em concentrações de 2 à 5ng/mL houve um aumento na proliferação, em concentrações de 20 à 40ng/mL houve diferenciação para neurônios glutamatérgicos e em concentrações de 100ng/mL houve inibição da apoptose (ZHANG; JIANG; HU, 2011). O padrão de expressão dos receptores tem importância, já que o receptor p75NTR parece estar ligado à apoptose, enquanto o TrkA à sobrevivência (NAUMANN et al., 2002).

O efeito do NGF na estimulação da proliferação das células tronco neurais foi observado pela primeira vez por Elena Cattaneo, que percebeu um aumento na população de células marcadas positivamente para nestina após tratamento com NGF em culturas tratadas previamente com β -FGF (fator de crescimento fibroblástico β) (CATTANEO; MCKAY, 1990). Mais tarde ficou clara a importância do tratamento prévio com β -FGF, essa exposição é necessária para que ocorra a expressão do TrkA (BENOIT et al., 2001). A proliferação induzida por NGF ocorre via fosforilação da ERK1/2 (WANG et al., 2009).

Um dos efeitos clássicos do NGF é a indução do crescimento de neuritos, observado diversas vezes em células PC12, o mesmo efeito pode ser observado em células precursoras neurais (LIN, M. et al., 2008), esse efeito é desencadeado pela regulação negativa do fator de transcrição ATF5 (ANGELASTRO et al., 2003). O sinal do NGF leva à diferenciação tanto de neurônios como de astrócitos, mas não de oligodendrócitos (CHOI et al., 2008; LACHYANKAR et al., 1997; LEVENBERG et al., 2005; NAKAJIMA et al., 2007). Dependendo da região de que

foram isoladas, precursoras neurais são induzidas a se diferenciar para neurônios glutamatérgicos, sensoriais e nociceptores (ERNSBERGER, 2009; SINGH et al., 2009; ZHANG et al., 2011). Assim como o crescimento de neuritis, a diferenciação induzida por NGF é desencadeada pela regulação negativa do ATF5 (ANGELASTRO et al., 2003), mas também pelo aumento da expressão da TIMP-2, uma inibidora de metaloproteinase (JAWORSKI; PEREZ-MARTINEZ, 2006).

Outro papel clássico do NGF é a indução de sobrevivência, observada em precursoras neurais tanto no sistema nervoso central quanto periférico (ERNSBERGER, 2009; ZHANG et al., 2011). O mecanismo envolvido na sobrevivência parece ser mediado por vias P3IK/Akt e MAPK (NGUYEN et al., 2009).

1.2.4 Interação Entre o Fator de Crescimento de Nervos e os Receptores Purinérgicos

O sistema de sinalização via receptores purinérgicos e via NGF estão bastante interligados. Isso já foi observado diversas vezes nas células de feocromocitoma PC12, um modelo de diferenciação neuronal, tanto o ATP como o UTP demonstraram potencializar o crescimento neurítico causado pelo NGF (BEHRSING; VULLIET, 2004; POOLER et al., 2005), o ATP também potencializou o efeito do NGF aumento da sobrevivência dessas células (D'AMBROSI et al., 2001; D'AMBROSI et al., 2004).

Em 2005, David B. Arthur demonstrou que o efeito na sobrevivência se dá através do receptor P2Y₂ (ARTHUR; AKASSOGLU; INSEL, 2005), no ano seguinte demonstrando que a interação entre as vias de sinalização se dá através das proteínas SFK (sarcoma family kinase). A ativação do receptor P2Y₂ leva a fosforilação das SFK via proteína G, a SFK fosforila resíduos de aminoácido no lado citoplasmático do receptor TrkA, aumentando a sua afinidade pelo NGF (ARTHUR; AKASSOGLU; INSEL, 2006).

Outras duas formas de interação foram observadas entre os receptores purinérgicos e o NGF: em 1997 Klaus Heese demonstrou que a estimulação do receptor A_{2A} leva ao aumento da produção e liberação de NGF por micróglia (HEESE et al., 1997), e Matt S. Ramer demonstrou em 2001 que o NGF aumenta a expressão de subunidades $P2X_3$ em neurônios sensoriais (RAMER; BRADBURY; MCMAHON, 2001).

1.3 DIFERENCIAÇÃO DO TECIDO NERVOSO

Para que uma célula possa ser considerada uma célula-tronco ela deve apresentar duas características, auto-renovação e capacidade de diferenciação para duas ou mais linhagens diferentes, as células que apresentam essas características e podem diferenciar-se em linhagens derivadas dos três folhetos embrionários são chamadas pluripotentes (DE FILIPPIS; BINDA, 2012). Para que uma célula pluripotente possa se diferenciar para tecido nervoso ela precisará passar por três processos: indução, especificação e diferenciação (DOTTORI; TAY; HUGHES, 2011).

A indução neural consiste em estimular as células pluripotentes a se diferenciarem apenas para neuroectoderme. *In vitro* isso pode ser obtido cultivando as células em meios contendo fatores indutores da diferenciação neural, como ácido retinóico, fatores neurotróficos, antagonistas da proteína morfogênica óssea, entre outros (DENHAM et al., 2010; DOTTORI et al., 2011; NEGRAES et al., 2012). Na especificação diferentes populações de células se comprometem com diferentes linhagens, sendo que interações complexas entre diferentes vias de sinalização estão envolvidas nesse processo. Finalmente, na diferenciação as células progenitoras é a maturação das células progenitoras para neurônios ou glia maduras (DOTTORI; PERA, 2008).

Outra abordagem possível é obter células já comprometidas com a neuroectoderme de embriões ou adultos. Por muito tempo acreditou-se que não havia células tronco neurais no sistema nervoso de adultos, mas hoje já existem evidências para a existência de células precursoras neurais em várias regiões do sistema nervoso, incluindo a zona subgranular do hipocampo, o bulbo olfatório, a zona subventricular, a zona subcalossal, o cerebelo e o gânglio da raiz dorsal (BAYER, 1985; ERIKSSON et al., 1998; LEE, A. et al., 2005; LOIS; ALVAREZ-BUYLLA, 1993; NAMAKA et al., 2001; SERI et al., 2006).

Para o estudo *in vitro* do desenvolvimento do sistema nervoso central são usados diferentes modelos experimentais, entre eles estão as neurosféricas. Neurosféricas são agregados tridimensionais de células formadas por divisão assimétrica de células tronco neurais, que podem ser obtidas tanto de embriões quanto do cérebro adulto, em meios contendo β -FGF e EGF (fator de crescimento epidermal). Cada neurosfera é formada por uma única célula que quando se divide forma uma nova célula tronco e uma célula progenitora mais diferenciada, garantindo uma pequena quantidade de células tronco que podem ser estudadas como modelo de diferenciação e desenvolvimento do sistema nervoso central (REYNOLDS; TETZLAFF; WEISS, 1992).

Quando os fatores de crescimento epidermal e fibroblástico são removidos as neurosféricas entram em processo de diferenciação. Três fenótipos principais são formados, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (MARTINS et al., 2008).

Existem outros modelos que podem ser usados em estudos sobre a embriogênese do sistema nervoso central, como células as células P19, que são células pluripotentes de uma linhagem iniciada a partir de um teratocarcinoma. A diferenciação dessas células para células neurais pode ser estimulada através da adição de ácido retinóico, passando a apresentar várias das características comuns às células neurais. Por outro lado, a origem tumoral e o cariótipo alterado são pontos negativos ao uso dessas células como modelo *in vitro* do desenvolvimento

neural, sendo preferível o uso de linhagens primárias como as neuroesferas (REYNOLDS et al., 1992).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar como a sinergia entre o fator de crescimento de nervos e receptores purinérgicos afeta a diferenciação, proliferação e morte de células progenitoras neurais do telencéfalo embrionário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos de diferentes doses de ATP, combinadas ou não com o NGF, na migração, diferenciação, proliferação e morte de células precursoras neurais.
- Investigar se os efeitos observados se devem aos receptores P1 ou P2.
- Investigar se existe interação entre receptores P2Y1 e P2Y2 com os receptores de NGF.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXTRAÇÃO DE NEUROESFERAS

O projeto temático FAPESP "Bases moleculares da diferenciação de células-tronco e progenitoras neurais", no qual esse projeto está incluso, foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do Instituto de Química da USP, no dia 16/7/2008.

Ratos da linhagem Wistar em idade reprodutiva foram acasalados e no 14^o dia da gestação, as fêmeas foram sacrificadas em câmara de CO₂ para obtenção dos fetos. Os fetos retirados foram mantidos em placa de petri contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies) gelado e então dissecados sob lupa. O tecido do telencéfalo foi incubado em solução contendo tripsina e EDTA (Life Technologies) por 1 minuto a 37^oC e, após esse período, a tripsina foi inativada com soro fetal bovino. O material obtido foi dissociado mecanicamente e filtrado em membrana de nylon de 40µm (BD) e então semeado em garrafa previamente tratada com poli-2-hidroximetilmetacrilato (Sigma-Aldrich) contendo meio DMEM/F12 (Life Technologies), 2% suplemento B27 (Life Technologies), 20ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF) (Sigma-Aldrich) e 20ng/mL de fator de crescimento fibroblástico β (β-FGF) (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em cultura a 37^oC e 5% de CO₂ por 5 dias para expansão clonal .

3.2 DIFERENCIAÇÃO DAS NEUROESFERAS

As neuroesfeas formadas foram plaqueadas em garrafas ou lamínulas previamente tratadas com 20µg/mL de laminina e 50µg/mL poli-lisina (ambos Sigma-Aldrich) em meio DMEM/F12 livre de EGF e β-FGF, para permitir a diferenciação. Para estudar o papel dos receptores purinérgicos e do NGF sobre proliferação, morte e progresso da diferenciação, nesse mesmo

meio as neuroesferas foram tratadas de acordo com a tabela 2. Como pode ser observado os primeiros tratamentos se tratam de uma curva dose resposta do ATP (Sigma Aldrich), na presença ou não de aplicação externa de NGF (Sigma Aldrich) para avaliar em que concentrações o ATP possui efeito sobre as células progenitoras neurais e em que concentrações é capaz de interagir com a sinalização via NGF. Os tratamentos com a combinação de ATP e cafeína (Sigma Aldrich), um inibidor inespecífico dos receptores P1, na dose de 250 μ M (DALY; BRUNS; SNYDER, 1981), e adenosina (Sigma Aldrich), agonista endógeno dos receptores P1, numa dose de 100 μ M (JACOBSON; GAO, 2006), visam isolar efeitos que ocorrem através dos receptores P2 ou P1, respectivamente. As combinações de ATP com MRS2179 (Sigma Aldrich), inibidor específico dos receptores P2Y₁, na dose de 100 η M (BOYER et al., 1998), visam isolar os efeitos desse receptor. Finalmente os tratamentos com 2-thio-UTP (Tocris), agonista específico do receptor P2Y₂, na dose de 35 η M (EL-TAYEB; QI; MULLER, 2006), visa observar o papel desse receptor. As neuroesferas foram diferenciadas por 7 dias e a cada três dias metade do meio foi substituído.

Tabela 2. Tratamentos a qual as neuroesferas foram submetidas durante a diferenciação

Tratamentos		
	Não Tratado	NGF 100 η g/mL
	ATP 1 μ M	ATP 1 μ M + NGF 100 η g/mL
	ATP 10 μ M	ATP 10 μ M + NGF 100 η g/mL
	ATP 100 μ M	ATP 100 μ M + NGF 100 η g/mL
	ATP 1mM	ATP 1mM + NGF 100 η g/mL
Cafeína 250 μ M	Cafeína 250 μ M + ATP 10 μ M	Cafeína 250 μ M + ATP 10 μ M + NGF 100 η g/mL
	Adenosina 100 μ M	Adenosina 100 μ M + NGF 100 η g/mL
MRS2179 100 η M	MRS2179 100 η M + ATP 10 μ M	MRS2179 100 η M + ATP 10 μ M + NGF 100 η g/mL
	2-thio-UTP 35 η M	2-thio-UTP 35 η M + NGF 100 η g/mL

3.3 DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA

As neuroesferas foram incubadas em solução de tripsina e EDTA (Life Technologies), que foi neutralizada com soro fetal bovino, dissociadas com ponteiras e filtradas através de membrana de nylon. As células foram sedimentadas por centrifugação por 5 minutos a 200 G. Então foram fixadas em solução PBS/1% em formaldeído por 20 minutos no gelo. As células

foram lavadas com PBS e incubadas em solução PBS/SFB2%/Triton X-100 0,5% e os anticorpos primários (anti- β -3 tubulina [Sigma Aldrich], anti-GFAP [Dako] e anti-Nestina [Milipore]), em diluição 1:700, 1:5000 e 1:500, respectivamente. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com os anticorpos secundários (Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 555, Molecular Probes), em diluição 1/1000. Após lavagem com PBS, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (Attune) utilizando-se dos lasers azul (488nm) e vermelho (638nm), detectada a faixa de luz laser em incidência direta (FSC) e perpendicular (SSC). As voltagens utilizadas foram 2100mV para a incidência direta, 2880mV para a incidência perpendicular, 1250mV para o detector BL1 e 1350mV para o detector BL2. Os dados adquiridos foram analisados no software Flowing Software 2, disponível no site <http://www.flowingsoftware.com/>. Como controles negativos para determinar a posição das células não marcadas foram usadas células incubadas apenas com o anticorpo secundário ou sem anticorpos. Foi realizado gating para exclusão dos doublets, debris e marcação negativa como demonstrado na figura 3. Os resultados foram apresentados de acordo com o padrão *MIFlowCyt* adotados pela *International Society for Advancement of Cytometry* (LEE, J. A. et al., 2008).

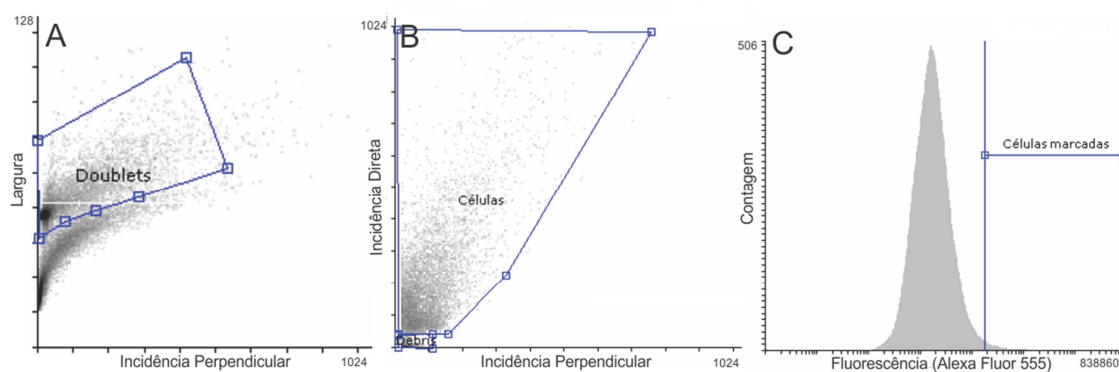


Figura 3. Exemplo de gating. A. O gating para exclusão dos doublets é realizado excluindo a população que possui o dobro da largura, mas a mesma incidência perpendicular. B. O gating para exclusão dos debris é realizado excluindo os eventos que formam uma população com a incidência direta e perpendicular muito baixa. C. O gating para definição das células marcadas é realizado selecionando as células que possuem uma fluorescência maior do que o controle negativo.

3.4 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE BRDU

Para avaliar a proliferação celular foi adicionado 0,2 μ M de BrdU (bromo-deoxiuridina) (Sigma Aldrich) às neuroesferas por 12 horas. Durante a fase S do ciclo celular o BrdU é incorporado em posições que normalmente seria inserida a timidina. As neuroesferas foram dissociadas como descrito anteriormente e fixadas em metanol gelado por 30 minutos. Após lavagem com PBS (centrifugação por 5 minutos a 200 G) as células foram incubadas em solução de HCl 1,5 M, lavadas novamente, incubadas por 2 minutos em solução 0,1 M de tetraborato de sódio. Após lavagem, as células foram bloqueadas em solução PBS/SFB4%/Triton X-100 0,1% por 45 minutos. As células foram lavadas e incubadas com o anticorpo primário anti-BrdU (Axyll, 1:200 em solução de bloqueio) por 1 hora. Após lavagem com PBS, foram incubadas com anticorpo secundário (Alexa 488 anti-rato 1:1000) por 45 minutos. Após lavagem com PBS, as células foram analisadas em citômetro de fluxo como descrito acima (OLIVEIRA et al., 2013).

3.5 ENSAIO DE TUNEL

O ensaio foi realizado usando o kit *In situ* cell death detection kit, TMR red, de acordo com as instruções do fabricante, disponível no site do fabricante: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/12156792910_en_11.pdf e analisadas em citômetro de fluxo como descrito anteriormente. O ensaio consiste na incubação das células na presença da enzima terminal desoxinucleotidil transferase e de nucleotídeos marcados com o fluoróforo TMR red. A terminal desoxinucleotidil transferase liga os nucleotídeos marcados nos terminais 3' livres do DNA. Considerando que durante o processo apoptótico existe a clivagem do DNA internucleossomal existem muito mais terminais 3' livres a fluorescência dessas células será maior.

3.6 MEDIDA DA MIGRAÇÃO

As neuroesferas foram cultivadas em garrafas transparentes até o sétimo dia de diferenciação e foram feitas fotomicrografias utilizando microscópio invertido em um aumento de 100 vezes. Foram utilizadas neuroesferas de tamanho similar. A migração foi medida da borda da neuroesfera até as últimas células que migraram dessa neuroesfera utilizando o programa gratuito Image J, disponível no site: <http://rsbweb.nih.gov/ij/> (TRUJILLO et al., 2012). O n experimental foi três, sendo que em cada n foram feitas dez fotomicrografias, totalizando trinta ao final do experimento.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados usando o modelo ANOVA, usando análise post-hoc Tukey.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS PURINÉRGICOS E NGF NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURAIAS

Para avaliar o papel dos receptores purinérgicos e do NGF sobre a diferenciação das células precursoras neurais foi utilizada a citometria de fluxo usando a β 3-tubulina como marcador de diferenciação para a linhagem neuronal, o GFAP como marcador de diferenciação para a linhagem glial e a nestina como marcador de células precursoras indiferenciadas (TRUJILLO et al., 2012)

Os resultados indicam que nas condições em que as neuroesferas foram cultivadas 76 \pm 5% das células tendem a diferenciar para a linhagem neuronal após sete dias de diferenciação.

O tratamento com ATP não alterou o padrão de neurogênese em nenhuma das quatro doses utilizadas, quer na presença ou na ausência da aplicação de NGF (75 \pm 2%). Os tratamentos com adenosina e a combinação do ATP e cafeína, assim como os tratamentos com MRS2179 e 2-thio-UTP parecem confirmar a ideia de que não existe uma grande participação dos receptores purinérgicos na neurogênese. O NGF, combinado ou não às drogas também não teve efeito sobre as taxas de expressão de β 3-tubulina. Os resultados são apresentados na figura 4.

Nas mesmas condições 30 \pm 1% das células diferenciaram para a linhagem glial. O tratamento com ATP na dose de 1 μ M não causou diferença na expressão de GFAP, mas em concentrações maiores levou a uma diminuição, sendo que a porcentagem da população GFAP⁺ é inversamente proporcional à dose de ATP aplicada. A aplicação de cafeína e adenosina levou a um pequeno aumento e uma pequena diminuição na expressão de GFAP, respectivamente. Os tratamentos com MRS2179 e 2-thio-UTP, assim como a presença ou não de NGF exógeno, não causaram alterações na expressão de GFAP. Os resultados estão representados na figura 5.

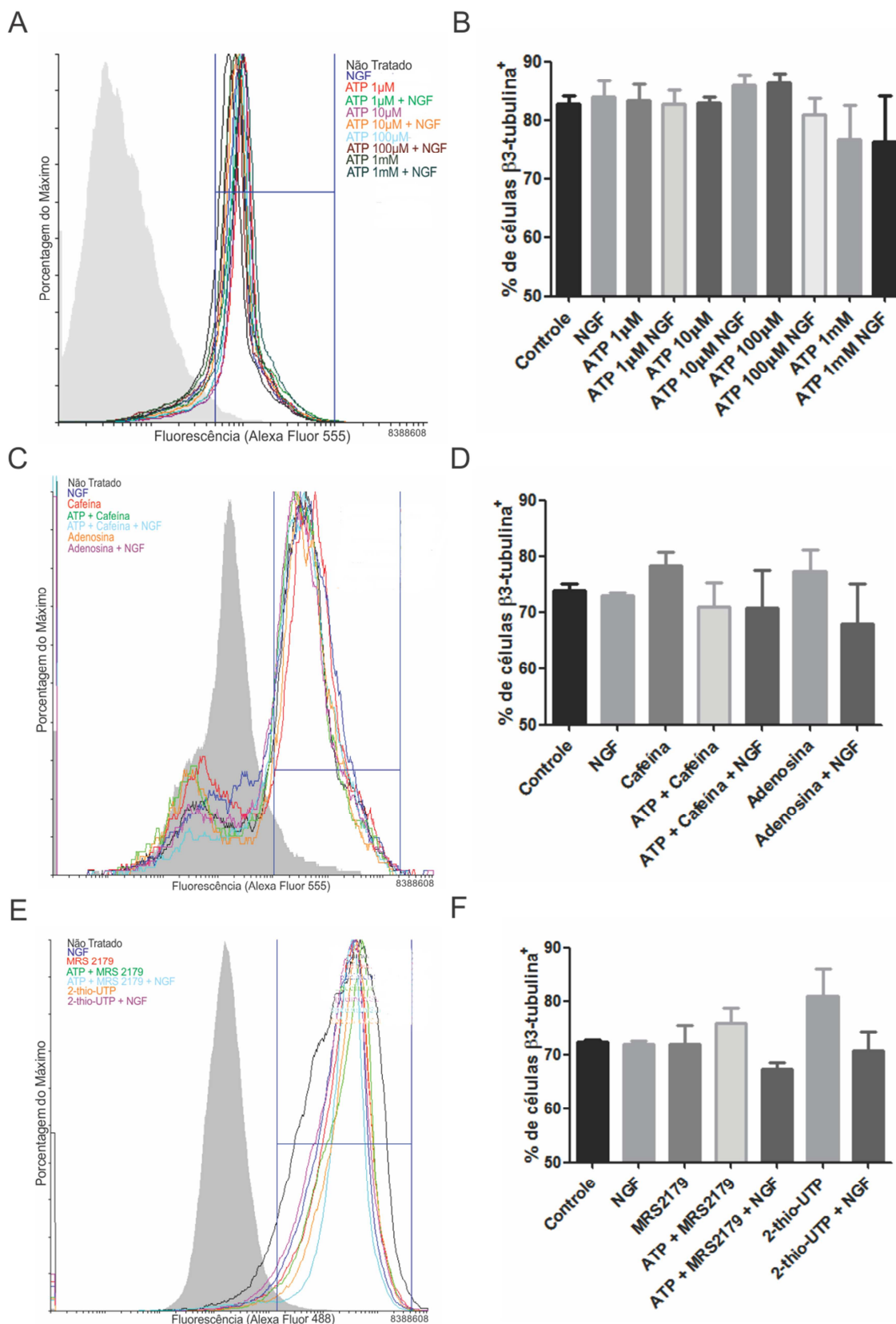


Figura 4. A expressão de $\beta 3$ -tubulina não se altera com os tratamentos. A, B. População $\beta 3$ -tubulina⁺ na curva dose-resposta do ATP na presença e ausência de NGF. **C, D.** População $\beta 3$ -tubulina⁺ nos tratamentos com cafeína e adenosina na presença e ausência de NGF. **E, F.** População $\beta 3$ -tubulina⁺ nos tratamentos com MRS2179 e 2-thio-UTP na presença e ausência de NGF. (n=3). Os picos cinzas são o controle negativo.

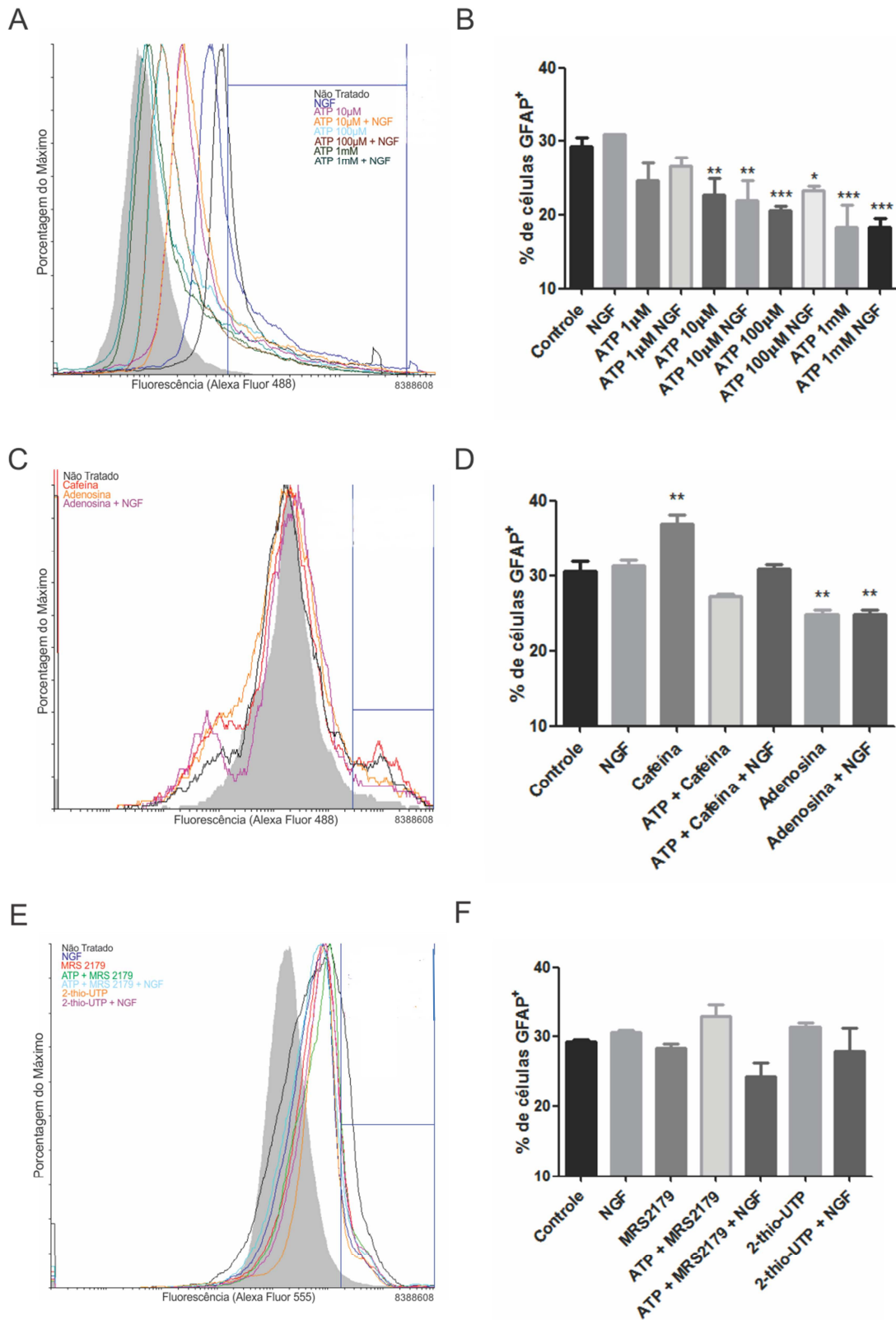


Figura 5. Diminuição da população GFAP⁺ induzida por ATP e adenosina. A, B. População GFAP⁺ na curva dose-resposta do ATP na presença e ausência de NGF. C, D. População GFAP⁺ nos tratamentos com cafeína e adenosina na presença e ausência de NGF. E, F. População GFAP⁺ nos tratamentos com MRS2179 e 2-thio-UTP na presença e ausência de NGF. (n=3), *(p<0,05), **(p<0,01), ***(p<0,001) em comparação com o controle. Os picos cinzas são o controle negativo.

Nas condições de cultivo $39\pm 3\%$ expressam nestina após 7 dias de diferenciação.

A expressão de nestina não foi alterada por nenhuma das concentrações de ATP, mas foi aumentada pelo tratamento com NGF. Curiosamente as doses de 1 e $10\mu\text{M}$ de ATP inibiram o efeito causado pelo NGF, mas não as doses de $100\mu\text{M}$ e 1mM . O tratamento com cafeína também levou a um aumento da expressão de nestina, mas as combinações dela com ATP e ATP e NGF, assim como os tratamentos com adenosina, não levaram a nenhuma alteração estatisticamente significativa. Os tratamentos com MRS2179, antagonista do receptor P2Y_1 , não causaram alteração, assim como o tratamento com 2-thio-UTP, mas a combinação de 2-thio-UTP com NGF levou a um aumento significativamente maior que apenas com o NGF. Os resultados podem ser vistos na figura 6.

4.2 EFEITO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS PURINÉRGICOS E NGF NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURAIIS

Para avaliar a proliferação das células precursoras neurais foi utilizado o ensaio de incorporação de BrdU, usando a incorporação desse análogo da timidina no DNA durante a duplicação para marcar as células que passaram pela proliferação. Após 12 horas de incubação, no sétimo dia de diferenciação, $11\pm 2\%$ das células precursoras neurais haviam incorporado BrdU. Os resultados podem ser vistos na figura 8.

Todas as doses de ATP, assim como o NGF, aumentaram a proliferação das células precursoras neurais, a combinação de NGF com todas as doses de ATP gerou um aumento na proliferação significativamente maior que o tratamento apenas com o NGF. Todos os tratamentos com cafeína e adenosina também aumentaram a proliferação, sendo que apenas a cafeína e a combinação de cafeína, ATP e NGF aumentaram mais que o NGF isolado. Os tratamentos com o 2-thio-UTP aumentaram, assim como os tratamentos com ATP e MRS2179, a proliferação,

sendo que o tratamento ATP, MRS2179 e NGF levou a um aumento significativamente maior que apenas o NGF.

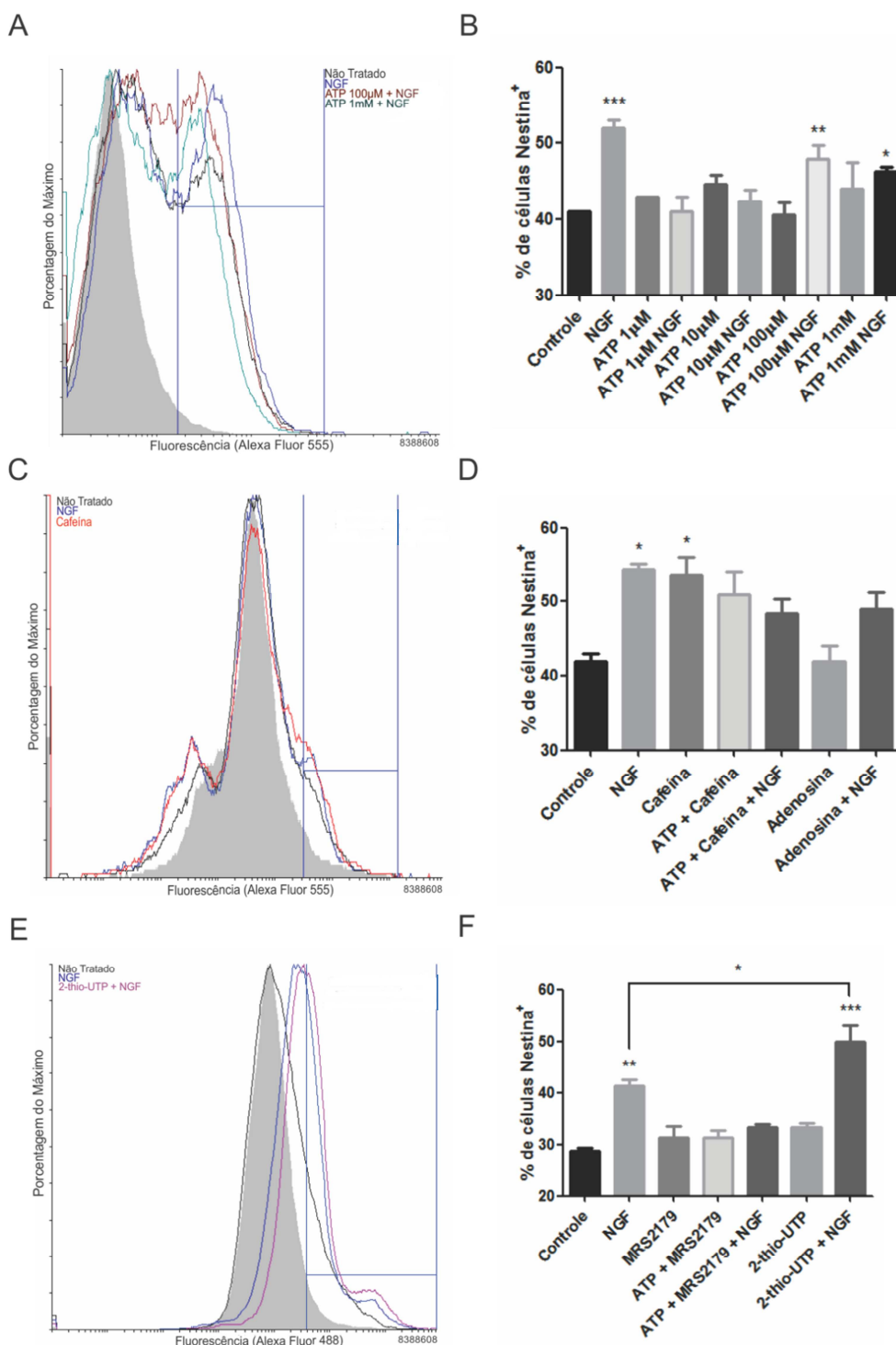


Figura 6. Aumento da população nestina⁺ induzido por NGF e 2-thio-UTP e NGF. A, B. População nestina⁺ na curva dose-resposta do ATP na presença e ausência de NGF. **C, D.** População nestina⁺ nos tratamentos com cafeína e adenosina na presença e ausência de NGF. **E, F.** População nestina⁺ nos tratamentos com MRS2179 e 2-thio-UTP na presença e ausência de NGF. (n=3), *(p<0,05), **(p<0,01), ***(p<0,001). Os picos cinzas são o controle negativo.

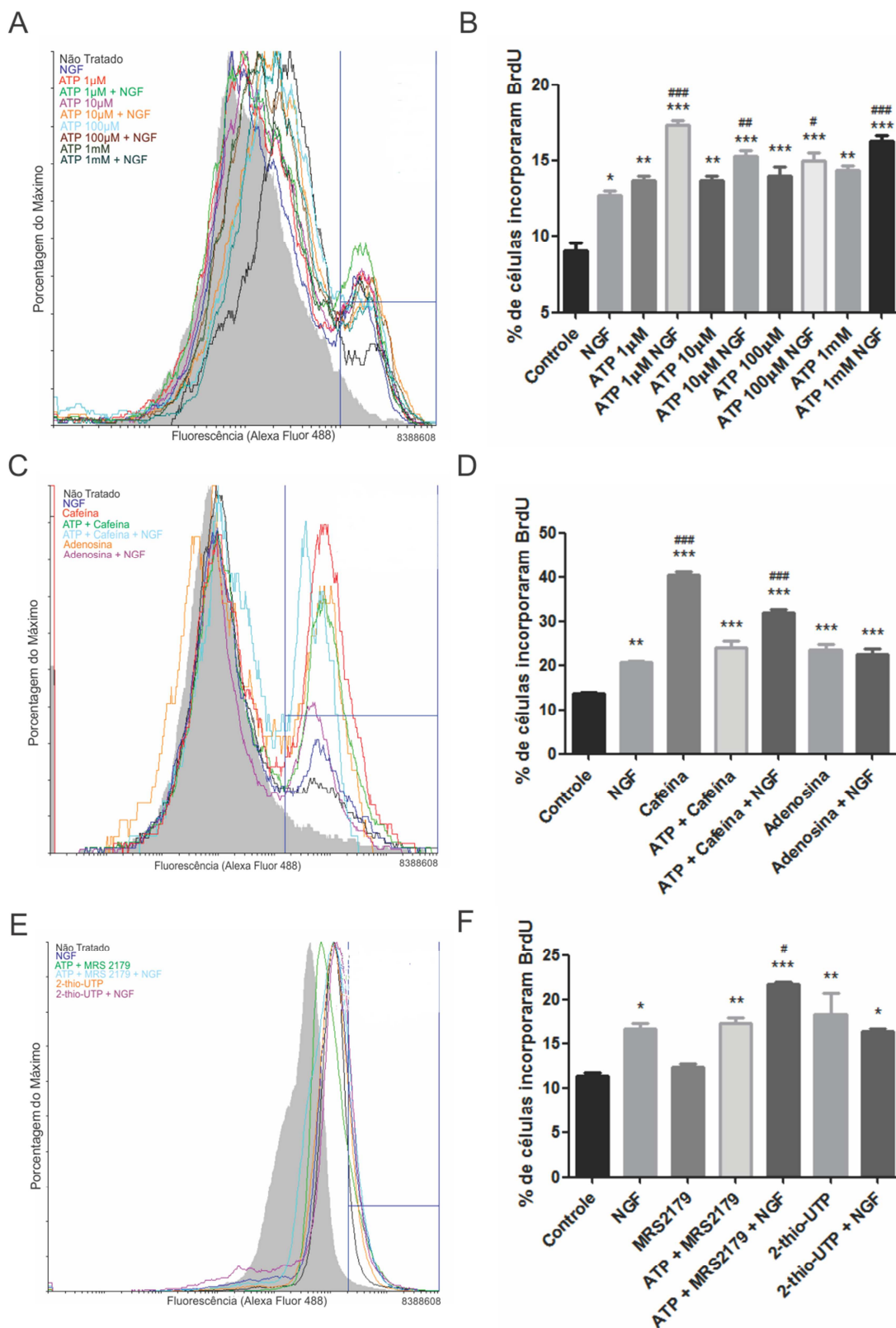


Figura 7. Aumento da proliferação causada por ATP, drogas purinérgicas e NGF. A, B. População BrdU⁺ na curva dose-resposta do ATP na presença e ausência de NGF. C, D. População BrdU⁺ nos tratamentos com cafeína e adenosina na presença e ausência de NGF. E, F. População BrdU⁺ nos tratamentos com MRS2179 e 2-thio-UTP na presença e ausência de NGF. (n=3), *(p<0,05), **(p<0,01), *** (p<0,001) em relação ao controle, # (p<0,05), ## (p<0,01), ### (p<0,001) em relação ao tratamento com NGF. Os picos cinzas são o controle negativo.

4.3 EFEITO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS PURINÉRGICOS E NGF NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURAIAS

Para avaliar o processo de apoptose nas células precursoras neurais foi usado o ensaio de TUNEL. Após sete dias de diferenciação nas condições já descritas na seção de materiais e métodos, $63 \pm 2\%$ das células marcaram positivamente para apoptose.

O efeito do ATP na morte celular se mostrou diferente de acordo com a dose, na concentração de $1 \mu\text{M}$ houve um aumento na morte em relação ao controle, nas doses intermediárias de 10 e $100 \mu\text{M}$ houve um efeito protetor e na dose mais alta de 1mM não houve diferença com relação ao controle. O NGF aumentou a sobrevivência das células em todos os tratamentos em que foi aplicado, inclusive no tratamento com $1 \mu\text{M}$ de ATP. Nem a cafeína nem a adenosina afetaram a sobrevivência celular, mas a combinação do ATP com a cafeína apresentou efeito protetor, indicando uma participação dos receptores P2. Tanto os tratamentos com MRS2179 e ATP e com 2-thio-UTP levaram a um pequeno aumento na sobrevivência. Os resultados estão na figura 8.

4.4 EFEITO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS PURINÉRGICOS E NGF NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURAIAS

Nas condições de cultivo, após sete dias de diferenciação, as células migraram aproximadamente $450 \mu\text{M}$ a partir da borda da neuroesfera.

O tratamento com NGF, assim como o tratamento com todas as doses de ATP, aumentaram a migração das células. O tratamento associado de ATP com NGF levou a um aumento comparável ao dos fatores isolados. A cafeína, assim como sua associação com ATP não causaram aumento da migração, já a adenosina levou ao aumento. Curiosamente o tratamento isolado com MRS2179 levou a um aumento, enquanto sua associação com o ATP e ATP e NGF não causou nenhum aumento. O tratamento com 2-thio-UTP não levou a migração,

mas sua combinação com o NGF levou a um aumento significativamente maior do que o NGF isolado. Os resultados são apresentados nas figuras 9 e 10.

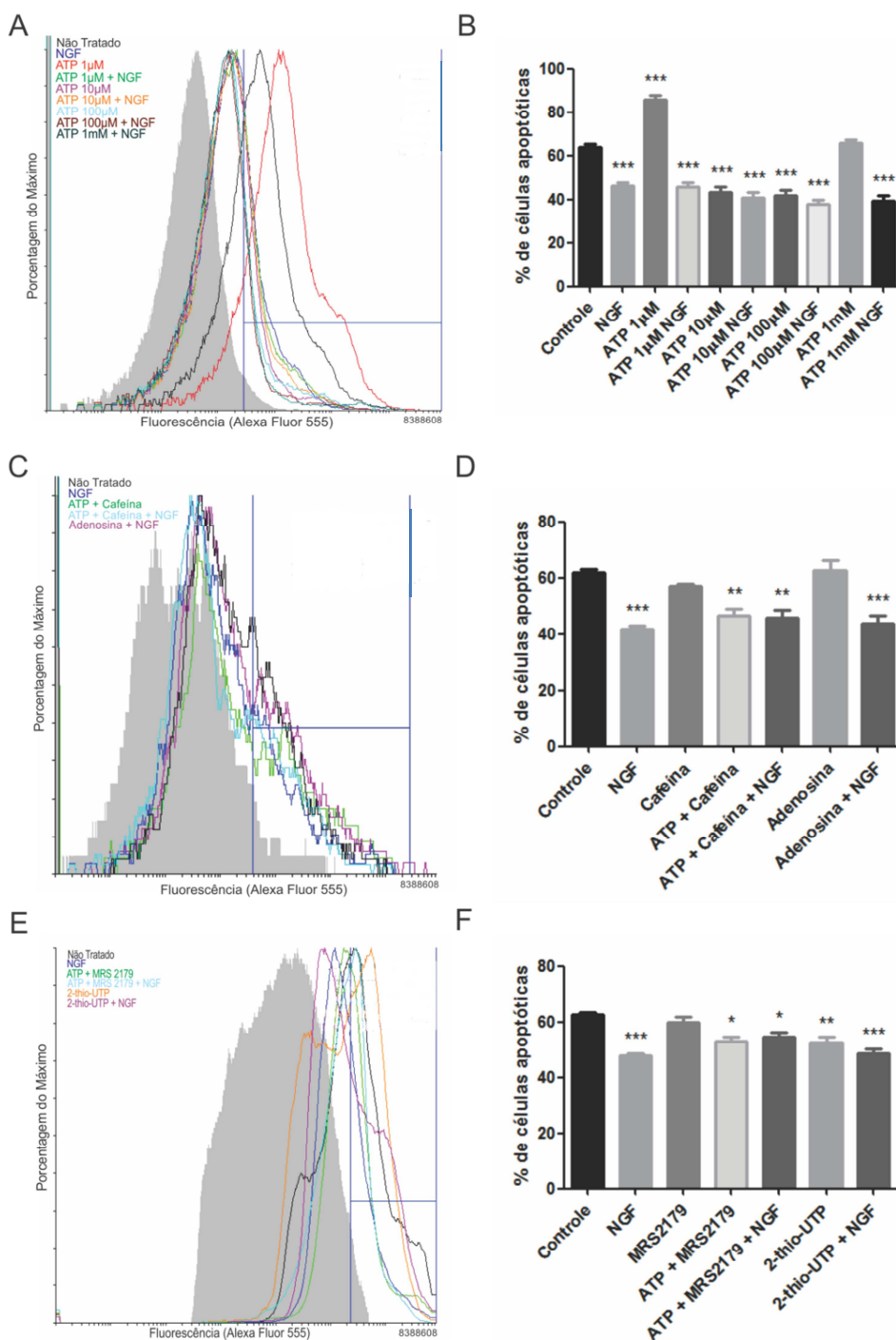


Figura 8. Diminuição da taxa de apoptose por doses intermediárias de ATP e NGF. A, B. População apoptótica na curva dose-resposta do ATP na presença e ausência de NGF. **C, D.** População apoptótica nos tratamentos com cafeína e adenosina na presença e ausência de NGF. **E, F.** População apoptótica nos tratamentos com MRS2179 e 2-thio-UTP na presença e ausência de NGF. (n=3), *(p<0,05), **(p<0,01), ***(p<0,001) em relação ao controle. Os picos cinzas são o controle negativo.

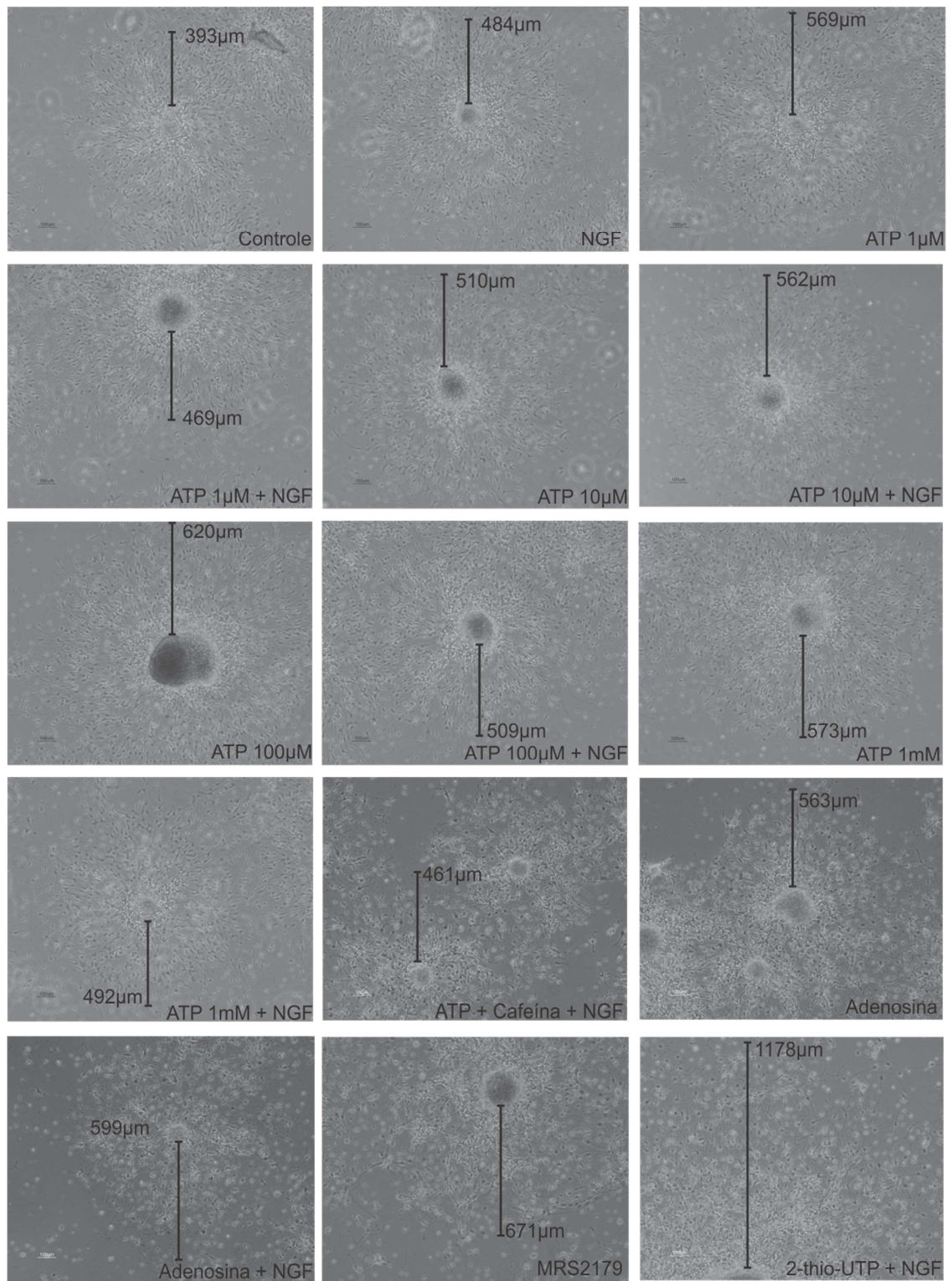


Figura 9. ATP, NGF, adenosina e MRS2179 levam a aumento da migração. A escala corresponde a 100 µm.

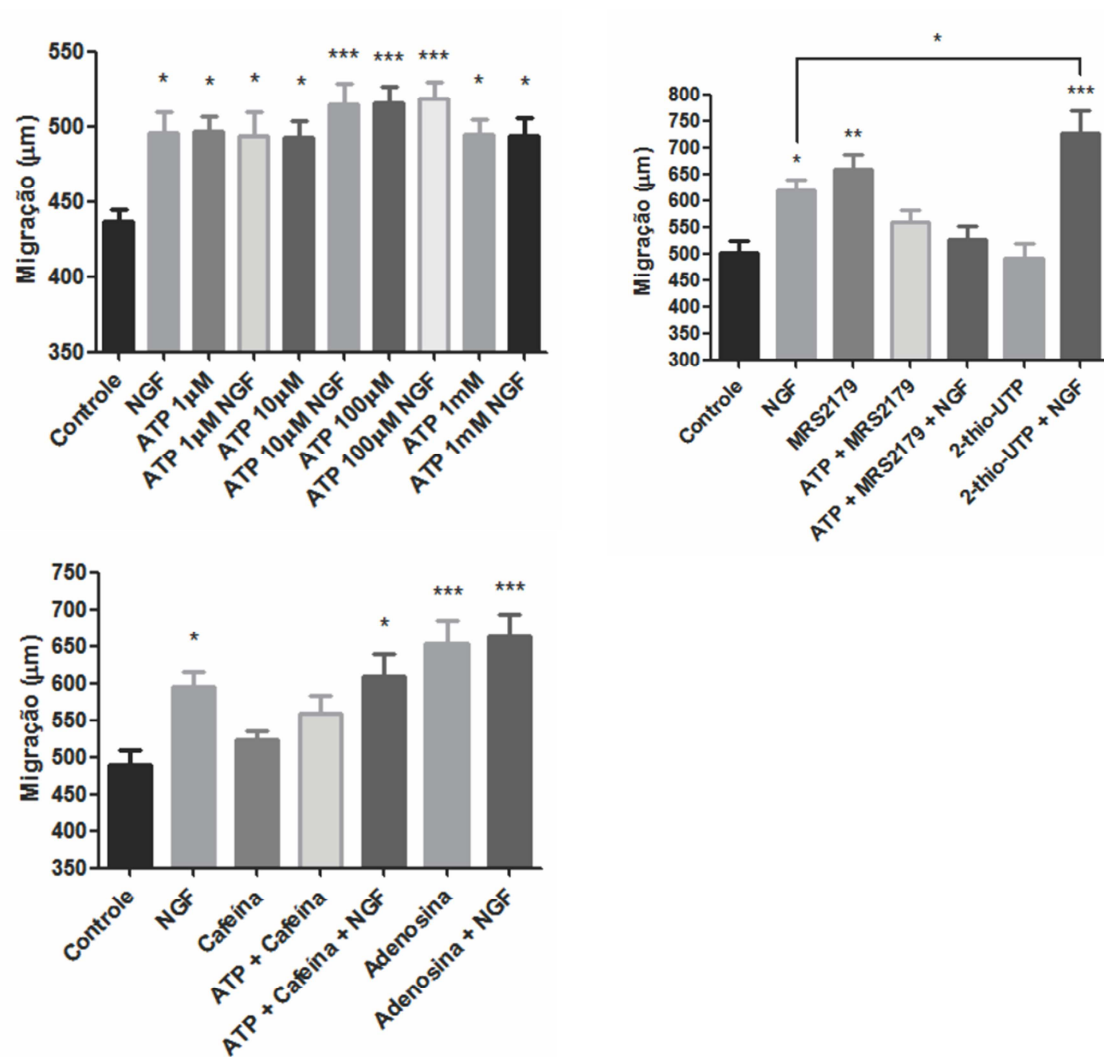


Figura 10. Aumento da migração na presença de ATP, adenosina e NGF. *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$).

5. DISCUSSÃO

Um resumo dos resultados pode ser consultado na figura 11. Foi observado que nenhum dos tratamentos utilizados levou a um aumento da população de células na linhagem neuronal. Num primeiro momento esse resultado parece contraditório com resultados obtidos no nosso próprio laboratório, que mostram um papel importante dos receptores P2Y₁, P2Y₂ e P2X₂ na diferenciação das células de teratocarcinoma murino P19 para a linhagem neuronal (RESENDE; BRITTO; ULRICH, 2008). Mas um trabalho publicado por Jasmin Delic em 2010 demonstrou em neuroesferas derivadas do mesencéfalo que a estimulação dos receptores purinérgicos leva a diferenciação para a linhagem neuronal quando as células são extraídas de embriões no dia 10,5 da gestação, mas não no dia 13,5, demonstrando assim que uma ativação tardia desses receptores não leva à neurogênese (DELIC; ZIMMERMANN, 2010). Efeitos do NGF na promoção da diferenciação também já foram relatados, mas são mais pronunciados em concentrações intermediárias (aproximadamente 20ng/mL), menores do que a que foi utilizada nesse trabalho (100ng/mL), mais associadas à sobrevivência e proliferação (ZHANG et al., 2011).

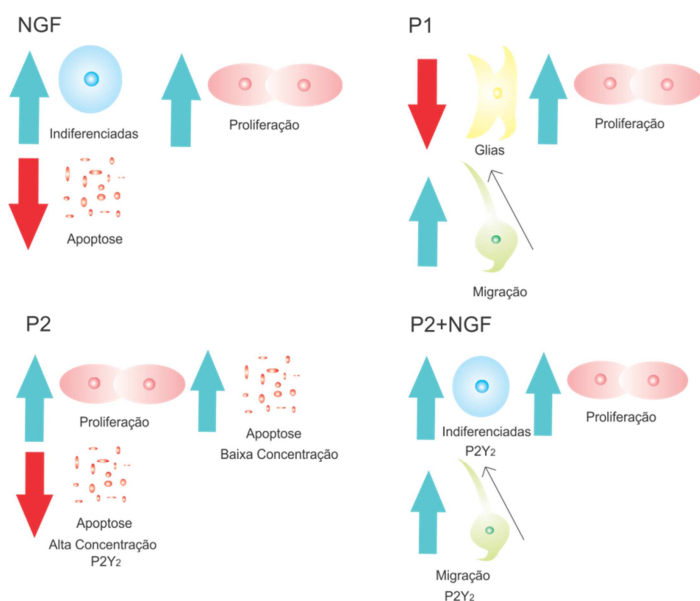


Figura 11. Resumo dos resultados. As setas azuis representam um aumento e as vermelhas uma diminuição do efeito observado.

A diminuição na expressão do GFAP em doses acima de 10 μ M de ATP muito provavelmente se deve a efeitos causados pela adenosina, e não propriamente do ATP. Já foi demonstrada a expressão das ecto-nucleotidases NTPDase 2 e fosfatase alcalina não específica em neuroesferas (MISHRA et al., 2006), o que significa que o efeito observado nos tratamentos com ATP pode ser mediado não pelo próprio ATP, mas sim pelos seus produtos de degradação. Para checar isso foram realizados os tratamentos com associação de ATP e cafeína, assim bloqueando os receptores P1 e ativando apenas os P2, e com adenosina, ativando apenas os receptores P1. Quando se observa que o tratamento associando ATP e cafeína não teve esse efeito, mas o tratamento com adenosina teve é seguro afirmar que a diminuição da população GFAP⁺ se dá através da ativação de receptores P1.

A expressão de nestina foi aumentada no tratamento com NGF, isso se deve muito provavelmente a um aumento na proliferação das células nestina⁺, um efeito já observado em neuroesferas no início da década de 90 (CATTANEO; MCKAY, 1990). A cafeína também levou a um aumento na população nestina⁺, mas como o tratamento com adenosina não levou ao efeito inverso, não é seguro dizer que esse efeito se deve a uma inibição dos receptores P1. Talvez outro efeito farmacológico conhecido da cafeína, a inibição da AMPc fosfodiesterase (SMITH; MILLS, 1970), esteja envolvida nesse efeito.

É interessante notar que o ATP em doses menores (1 e 10 μ M) bloqueou o aumento da expressão de nestina causado pelo NGF. Doses maiores (100 μ M e 1mM) não tem esse efeito, talvez sugerindo uma dessensibilização e subsequente inativação do receptor responsável. Tanto a combinação de adenosina com NGF quanto a combinação de ATP, cafeína e NGF inibiram esse efeito do NGF, indicando a participação de mais de um receptor, provavelmente um receptor de adenosina. Os receptores P2Y1 e P2Y2 provavelmente não estão envolvidos nesse efeito, já que a combinação do ATP, MRS2179 e NGF não elevou a expressão de nestina, enquanto a combinação do 2-thio-UTP com NGF não só levou a esse efeito, como foi

significativamente maior que o do NGF isoladamente, isso será discutido mais detalhadamente à frente.

O NGF levou a um aumento significativo na proliferação, como já havia sido descrito na literatura (WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2011). O mesmo foi observado em todas as doses de ATP. A estimulação da proliferação pelo ATP e UTP já havia sido observada em neuroesferas, sendo que o efeito do UTP sugere que receptores P2Y podem estar associados a esse efeito (LIN, J. H. et al., 2007), esse efeito também já foi observado *in vivo*, no hipocampo de animais adultos, onde a liberação de ATP pelos astrócitos e pelas próprias células precursoras leva a proliferação de células tronco neurais da zona sub-ventricular (CAO et al., 2013; LIN, J. H. et al., 2007). Esse efeito parece estar associado ao aumento da concentração de cálcio citosólico (RYU et al., 2003), sendo que as MAPK e a PKC são importantes mediadores (HEO; HAN, 2006)). O receptor mais comumente associado à proliferação em células tronco neurais é o P2Y₁ (SUYAMA et al., 2012), mas o receptor P2Y₂, assim como receptores P2X, como P2X₂ e P2X₃ também já foram associados à esse efeito (GAO et al., 2010); (HEO; HAN, 2006). Em meus experimentos tanto o tratamento associando ATP e cafeína quanto o tratamento com adenosina levaram a um aumento na proliferação, sugerindo que não apenas receptores P2, mas também P1 tem um efeito mitogênico, provavelmente através do receptor A1 (MIGITA et al., 2008). Os tratamentos com 2-thio-UTP e associação de ATP e MRS2179 levaram ambos a um aumento da proliferação, enquanto o MRS2179 isolado não causou alteração, esses dados indicam uma participação do receptor P2Y₂, mas não do P2Y₁ na proliferação. Uma razão pela qual o P2Y₁ não causou aumento na proliferação pode ser a ausência de EGF, não aplicado durante os sete dias de diferenciação, esse fator de crescimento já foi associado diversas vezes ao efeito proliferativo do receptor P2Y₁, tendo sido sugerido não apenas crosstalks em suas vias de transdução de sinal, mas até transativação de seus receptores (GRIMM et al., 2009); (MISHRA et al., 2006).

Os resultados também demonstram uma sinergia entre o ATP e o NGF no aumento da proliferação. Esse efeito não foi observado na associação de adenosina e NGF, mas sim na associação de ATP, cafeína e NGF, indicando que apesar da ativação de receptores P1 levar a um aumento da proliferação, a sinergia ocorre através de receptores P2. Finalmente essa mesma sinergia foi observada na associação de ATP, MRS2179 e NGF, mas não na associação de 2-thio-UTP e NGF, indicando que nem o receptor P2Y₁ nem o P2Y₂ participam na sinergia.

A cafeína, apesar de antagonizar receptores P1, também levou a um aumento considerável da proliferação. Esse efeito pode ser devido ao aumento da concentração intracelular de AMPc, especialmente quando se leva em consideração que esse aumento já foi associado à proliferação de células precursoras neurais através da via PACAP/PAC1 (NISHIMOTO et al., 2007).

O efeito do ATP na apoptose variou bastante de acordo com a dose utilizada, demonstrando a participação de vários receptores diferentes. Em doses de 1µM houve um aumento na morte, um receptor que pode estar envolvido nesse efeito é GPR17, um receptor P2Y-like que é expresso em células precursoras neurais e já foi associado à morte celular em culturas de precursoras de oligodendrócitos. A presença de fatores de crescimento diminui a expressão desse receptor, oferecendo uma possível explicação para o fato da associação de ATP nessa dose e o NGF levarem à sobrevivência, e não morte (CERUTI et al., 2011; MAREI et al., 2011)

Em doses de 10 e 100 µM o ATP teve um efeito protetor. Esse efeito foi reproduzido pelo 2-thio-UTP, demonstrando que o receptor P2Y₂ é um dos receptores envolvidos na resposta. Esse efeito já foi observado em células PC12 e foi associado à ativação de ERK e Akt, a mesma via pela qual o NGF leva à sobrevivência (ARTHUR; GEORGI; et al., 2006; NGUYEN et al., 2009). A dose de 1mM de ATP não levou a nenhuma diferença significativa na indução de morte celular, provavelmente devido à dessensibilização dos receptores envolvidos na resposta.

Tanto o NGF quanto o ATP levaram a um aumento da migração. O aumento da migração induzido por NGF já havia sido observado em células precursoras de oligodendrócitos, sendo que nessas células o efeito é mediado não pelo receptor TrkA, mas pelo p75NTR (ODERFELD-NOWAK et al., 2009). O efeito na migração causado por ATP, UTP e ADP β S já haviam sido observados em células tronco neurais (GRIMM; ULLSPERGER; ZIMMERMANN, 2010), mas os resultados aqui apresentados parecem indicar que se efeito se dá na verdade através dos receptores P1, após degradação dos nucleotídeos pelas ectonucleotidases. Outro ponto interessante a ser notado é que o 2-thio-UTP, apesar de não ter nenhum efeito sozinho, potencializou o efeito do NGF, mais uma vez mostrando uma sinergia entre o receptor P2Y₂ e o NGF.

Tanto o aumento da migração quanto o aumento da população nestina⁺ causado pelo NGF foram potencializados pela associação com o 2-thio-UTP, um agonista específico do receptor P2Y₂. A interação entre essas duas vias de sinalização já havia sido relatada e foi bastante estudada em células de feocromocitoma PC12. Nessas células a neuritogênese, a diferenciação neuronal e a sobrevivência causadas por exposição ao NGF são potenciadas por ativação do P2Y₂ (ARTHUR; AKASSOGLU; et al., 2006; D'AMBROSI et al., 2001). O mecanismo sugerido para esse efeito é a ativação das Src family kinases (SFK) que leva à fosforilação do receptor TrkA e, conseqüentemente, a um aumento de sua afinidade pelo NGF (ARTHUR; AKASSOGLU; et al., 2006), esse aumento de afinidade por sua vez reflete num aumento na atividade de MAPK (BEHRSING; VULLIET, 2004), podendo ser esse o mecanismo pelo qual a sinergia observa se dá.

6. CONCLUSÕES

- A exposição de células precursoras neurais à NGF leva a um aumento na população de células menos diferenciadas, aumento da proliferação, migração e diminuição da apoptose.
- O ATP leva a uma diminuição da expressão de GFAP, um antígeno expresso por células progenitoras e astrócitos, mediada por receptores P1.
- O ATP causa um aumento na proliferação das células precursoras neurais, mediado tanto por receptores P1 quanto P2, mas a sinergia que ocorre nesse efeito com o NGF é mediada apenas por receptores P2, sendo que os receptores P2Y₁ e P2Y₂ não estão envolvidos na mesma.
- O efeito do ATP na morte celular varia enormemente de acordo com a dose, indo desde induzir apoptose em doses mais baixas, até inibi-la em doses intermediárias. O NGF é capaz de induzir a sobrevivência mesmo quando as células precursoras neurais estão expostas a doses ATP que induzem apoptose.
- Os receptores P2Y₂ estão entre os responsáveis pela inibição da apoptose induzida por ATP.
- O ATP induz migração em células precursoras neurais, esta indução se dá através de receptores P1.
- Existe uma sinergia na sinalização através de receptores P2Y₂ e a sinalização através de NGF na migração e expressão de nestina.

7. REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? **Pharmacol Ther**, v. 64, n. 3, p. 445-75, 1994. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7724657> >.

ABBRACCHIO, M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 281-341, Sep 2006. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968944> >.

ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 1, p. 19-29, Jan 2009. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008000> >.

ADRIAN, K. et al. Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1492, n. 1, p. 127-38, Jun 21 2000. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11004484> >.

AGRESTI, C. et al. Metabotropic P2 receptor activation regulates oligodendrocyte progenitor migration and development. **Glia**, v. 50, n. 2, p. 132-44, Apr 15 2005. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15657938> >.

ALOE, L. Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor. **Arch Ital Biol**, v. 149, n. 2, p. 175-81, Jun 2011. ISSN 0003-9829 (Print)

0003-9829 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21701989> >.

AMBACHE, N.; EDWARDS, J. Reversal of nicotine action on the intestine by atropine. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 6, n. 2, p. 311-7, Jun 1951. ISSN 0366-0826 (Print)

0366-0826 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14848461> >.

ANGELASTRO, J. M. et al. Regulated expression of ATF5 is required for the progression of neural progenitor cells to neurons. **J Neurosci**, v. 23, n. 11, p. 4590-600, Jun 1 2003. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805299> >.

ARTHUR, D. B.; AKASSOGLU, K.; INSEL, P. A. P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 52, p. 19138-43, Dec 27 2005. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365320> >.

_____. P2Y2 and TrkA receptors interact with Src family kinase for neuronal differentiation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 347, n. 3, p. 678-82, Sep 1 2006. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842754> >.

ARTHUR, D. B. et al. Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. **J Neurosci**, v. 26, n. 14, p. 3798-804, Apr 5 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597733> >.

BARKER, P. A.; SHOOTER, E. M. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. **Neuron**, v. 13, n. 1, p. 203-15, Jul 1994. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7519025> >.

BARTKOWSKA, K.; TURLEJSKI, K.; DJAVADIAN, R. L. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 70, n. 4, p. 454-67, 2010. ISSN 1689-0035 (Electronic)

0065-1400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196952> >.

BAYER, S. A. Neuron production in the hippocampus and olfactory bulb of the adult rat brain: addition or replacement? **Ann N Y Acad Sci**, v. 457, p. 163-72, 1985. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3868311> >.

BEHSING, H. P.; VULLIET, P. R. Mitogen-activated protein kinase mediates purinergic-enhanced nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. **J Neurosci Res**, v. 78, n. 1, p. 64-74, Oct 1 2004. ISSN 0360-4012 (Print)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372494> >.

BELLIVEAU, D. J. et al. Enhanced neurite outgrowth in PC12 cells mediated by connexin hemichannels and ATP. **J Biol Chem**, v. 281, n. 30, p. 20920-31, Jul 28 2006. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731531> >.

BENEDETTI, M.; LEVI, A.; CHAO, M. V. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 16, p. 7859-63, Aug 15 1993. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8356095> >.

BENNETT, M. R.; ROGERS, D. C. A study of the innervation of the taenia coli. **J Cell Biol**, v. 33, n. 3, p. 573-96, Jun 1967. ISSN 0021-9525 (Print)

0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6036522> >.

BENOIT, B. O. et al. Neurotrophin channeling of neural progenitor cell differentiation. **J Neurobiol**, v. 46, n. 4, p. 265-80, Mar 2001. ISSN 0022-3034 (Print)

0022-3034 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11180154> >.

BOGDANOV, Y. D. et al. Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos. **J Biol Chem**, v. 272, n. 19, p. 12583-90, May 9 1997. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9139711> >.

BOYER, J. L. et al. Competitive and selective antagonism of P2Y1 receptors by N6-methyl 2'-deoxyadenosine 3',5'-bisphosphate. **Br J Pharmacol**, v. 124, n. 1, p. 1-3, May 1998. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630335> >.

BRAUN, N. et al. Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 1355-64, Apr 2003. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713638> >.

BULBRING, E.; TOMITA, T. Properties of the inhibitory potential of smooth muscle as observed in the response to field stimulation of the guinea-pig taenia coli. **J Physiol**, v. 189, n. 2, p. 299-315, Apr 1967. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6034115> >.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev**, v. 24, n. 3, p. 509-81, Sep 1972. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4404211> >.

_____. Purinergic receptors. **J Theor Biol**, v. 62, n. 2, p. 491-503, Oct 21 1976. ISSN 0022-5193 (Print)

0022-5193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/994531> >.

_____. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: **Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach**, p. 107-118, 1978.

_____. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev**, v. 87, n. 2, p. 659-797, Apr 2007. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429044> >.

BURNSTOCK, G. et al. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. **Br J Pharmacol**, v. 40, n. 4, p. 668-88, Dec 1970. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4322041> >.

BURNSTOCK, G.; ULRICH, H. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 8, p. 1369-94, Apr 2011. ISSN 1420-9071 (Electronic)

1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21222015> >.

CANALS, M. et al. Molecular mechanisms involved in the adenosine A and A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. **J Neurochem**, v. 92, n. 2, p. 337-48, Jan 2005. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15663481> >.

CAO, X. et al. Astrocytic ATP release regulates the proliferation of neural stem cells in the adult hippocampus. **Stem Cells**, Apr 30 2013. ISSN 1549-4918 (Electronic)

1066-5099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23630193> >.

CATTANEO, E.; MCKAY, R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 762-5, Oct 25 1990. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2172829> >.

CAVALIERE, F. et al. The metabotropic P2Y4 receptor participates in the commitment to differentiation and cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neurobiol Dis**, v. 18, n. 1, p. 100-9, Feb 2005. ISSN 0969-9961 (Print)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649700> >.

CERUTI, S. et al. Expression of the new P2Y-like receptor GPR17 during oligodendrocyte precursor cell maturation regulates sensitivity to ATP-induced death. **Glia**, v. 59, n. 3, p. 363-78, Mar 2011. ISSN 1098-1136 (Electronic)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264945> >.

CHEUNG, K. K.; CHAN, W. Y.; BURNSTOCK, G. Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. **Neuroscience**, v. 133, n. 4, p. 937-45, 2005. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964486> >.

CHOI, K. C. et al. Effect of single growth factor and growth factor combinations on differentiation of neural stem cells. **J Korean Neurosurg Soc**, v. 44, n. 6, p. 375-81, Dec 2008. ISSN 2005-3711 (Print)

1225-8245 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19137082> >.

D'AMBROSI, N. et al. Interaction between ATP and nerve growth factor signalling in the survival and neuritic outgrowth from PC12 cells. **Neuroscience**, v. 108, n. 3, p. 527-34, 2001. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738265> >.

D'AMBROSI, N. et al. Pathways of survival induced by NGF and extracellular ATP after growth factor deprivation. **Prog Brain Res**, v. 146, p. 93-100, 2004. ISSN 0079-6123 (Print)

0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14699958> >.

DA SILVA, R. L.; RESENDE, R. R.; ULRICH, H. Alternative splicing of P2X6 receptors in developing mouse brain and during in vitro neuronal differentiation. **Exp Physiol**, v. 92, n. 1, p. 139-45, Jan 2007. ISSN 0958-0670 (Print)

0958-0670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259301> >.

DALY, J. W.; BRUNS, R. F.; SNYDER, S. H. Adenosine receptors in the central nervous system: relationship to the central actions of methylxanthines. **Life Sci**, v. 28, n. 19, p. 2083-97, May 11 1981. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6114369> >.

DE FILIPPIS, L.; BINDA, E. Concise review: self-renewal in the central nervous system: neural stem cells from embryo to adult. **Stem Cells Transl Med**, v. 1, n. 4, p. 298-308, Apr 2012. ISSN 2157-6564 (Print)

2157-6564 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197809> >.

DELIC, J.; ZIMMERMANN, H. Nucleotides affect neurogenesis and dopaminergic differentiation of mouse fetal midbrain-derived neural precursor cells. **Purinergic Signal**, v. 6, n. 4, p. 417-28, Dec 2010. ISSN 1573-9546 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21437012> >.

DENHAM, M. et al. Gli1 is an inducing factor in generating floor plate progenitor cells from human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 10, p. 1805-15, Oct 2010. ISSN 1549-4918 (Electronic)

1066-5099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20799336> >.

DI IORIO, P. et al. Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes. **Glia**, v. 38, n. 3, p. 179-90, May 2002. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11968056> >.

DOTTORI, M.; PERA, M. F. Neural differentiation of human embryonic stem cells. **Methods Mol Biol**, v. 438, p. 19-30, 2008. ISSN 1064-3745 (Print)

1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369746> >.

DOTTORI, M.; TAY, C.; HUGHES, S. M. Neural development in human embryonic stem cells-applications of lentiviral vectors. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 8, p. 1955-62, Aug 2011. ISSN 1097-4644 (Electronic)

0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445864> >.

ECKE, D. et al. Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor. **Biochem J**, v. 409, n. 1, p. 107-16, Jan 1 2008. ISSN 1470-8728 (Electronic)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17824841> >.

EGERMAN, R. S.; BISSONNETTE, J. M.; HOHIMER, A. R. The effects of centrally administered adenosine on fetal sheep heart rate accelerations. **Am J Obstet Gynecol**, v. 169, n. 4, p. 866-9, Oct 1993. ISSN 0002-9378 (Print)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238140> >.

EL-TAYEB, A.; QI, A.; MULLER, C. E. Synthesis and structure-activity relationships of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptors. **J Med Chem**, v. 49, n. 24, p. 7076-87, Nov 30 2006. ISSN 0022-2623 (Print)

0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17125260> >.

ERIKSSON, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med**, v. 4, n. 11, p. 1313-7, Nov 1998. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809557> >.

ERNSBERGER, U. Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. **Cell Tissue Res**, v. 336, n. 3, p. 349-84, Jun 2009. ISSN 1432-0878 (Electronic)

0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19387688> >.

FISCHER, W.; KRUGEL, U. P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 23, p. 2429-55, 2007. ISSN 0929-8673 (Print)

0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979698> >.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. Phosphorus Compounds of Muscle and Liver. **Science**, v. 70, n. 1816, p. 381-2, Oct 18 1929. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17756191> >.

FISSORE, R.; O'KEEFE, S.; KIESSLING, A. A. Purine-induced block to mouse embryo cleavage is reversed by compounds that elevate cyclic adenosine monophosphate. **Biol Reprod**, v. 47, n. 6, p. 1105-12, Dec 1992. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1493175> >.

FORESTA, C.; ROSSATO, M.; DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. **J Biol Chem**, v. 267, n. 27, p. 19443-7, Sep 25 1992. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1527064> >.

FREDHOLM, B. B. et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 2, p. 143-56, Jun 1994. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7938164> >.

FU, W. M. Regulatory role of ATP at developing neuromuscular junctions. **Prog Neurobiol**, v. 47, n. 1, p. 31-44, Sep 1995. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8570852> >.

FUXE, K. et al. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. **Physiol Behav**, v. 92, n. 1-2, p. 210-7, Sep 10 2007. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572452> >.

GAO, L. et al. Blocking P2X receptors can inhibit the injury-induced proliferation of olfactory epithelium progenitor cells in adult mouse. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 74, n. 7, p. 747-51, Jul 2010. ISSN 1872-8464 (Electronic)

0165-5876 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20394994> >.

GERHART, J. et al. Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. **Development**, v. 107 Suppl, p. 37-51, 1989. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2699856> >.

GLASER, T.; RESENDE, R. R.; ULRICH, H. Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation. **Cell Commun Signal**, v. 11, n. 1, p. 12, 2013. ISSN 1478-811X (Electronic)

1478-811X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23414261> >.

GOTZ, R. et al. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 266-9, Nov 17 1994. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969471> >.

GREEFF, K.; MENG, K.; MOOG, E. [The effect non-toxic and toxic concentrations of cardiac glycosides on the calcium balance of an isolated heart preparation]. **Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol**, v. 244, p. 270-82, 1962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13950052> >.

GRIMM, I. et al. Coordinate pathways for nucleotide and EGF signaling in cultured adult neural progenitor cells. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 14, p. 2524-33, Jul 15 2009. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19549686> >.

GRIMM, I.; ULLSPERGER, S. N.; ZIMMERMANN, H. Nucleotides and epidermal growth factor induce parallel cytoskeletal rearrangements and migration in cultured adult murine neural stem cells. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 199, n. 2, p. 181-9, Jun 2010. ISSN 1748-1716 (Electronic)

1748-1708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20121711> >.

HEESE, K. et al. Nerve growth factor (NGF) expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors. **Neurosci Lett**, v. 231, n. 2, p. 83-6, Aug 8 1997. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9291146> >.

HEO, J. S.; HAN, H. J. ATP stimulates mouse embryonic stem cell proliferation via protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **Stem Cells**, v. 24, n. 12, p. 2637-48, Dec 2006. ISSN 1066-5099 (Print)

1066-5099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16916926> >.

HOLTON, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. **J Physiol**, v. 145, n. 3, p. 494-504, Mar 12 1959. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13642316> >.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 247-64, Mar 2006. ISSN 1474-1776 (Print)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16518376> >.

JAWORSKI, D. M.; PEREZ-MARTINEZ, L. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression is regulated by multiple neural differentiation signals. **J Neurochem**, v. 98, n. 1, p. 234-47, Jul 2006. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805810> >.

KUPITZ, Y.; ATLAS, D. A putative ATP-activated Na⁺ channel involved in sperm-induced fertilization. **Science**, v. 261, n. 5120, p. 484-6, Jul 23 1993. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8392753> >.

KURIYAMA, H. Electrophysiological Observations on the Motor Innervation of the Smooth Muscle Cells in the Guinea-Pig Vas Deferens. **J Physiol**, v. 169, p. 213-28, Nov 1963. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14078060> >.

LAASBERG, T. Ca²⁺(+)-mobilizing receptors of gastrulating chick embryo. **Comp Biochem Physiol C**, v. 97, n. 1, p. 9-12, 1990. ISSN 0742-8413 (Print)

0742-8413 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1981347> >.

LACHYANKAR, M. B. et al. Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF. **Exp Neurol**, v. 144, n. 2, p. 350-60, Apr 1997. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168835> >.

LAI, K. O. et al. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. **Mol Cell Neurosci**, v. 11, n. 1-2, p. 64-76, May 1998. ISSN 1044-7431 (Print)

1044-7431 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12546061> >.

LANGLEY, J. N. On Inhibitory Fibres in the Vagus for the end of the OEsophagus and the Stomach. **J Physiol**, v. 23, n. 5, p. 407-14, Dec 30 1898. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16992467> >.

LEE, A. et al. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 723-9, Jun 2005. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908947> >.

LEE, J. A. et al. MIFlowCyt: the minimum information about a Flow Cytometry Experiment. **Cytometry A**, v. 73, n. 10, p. 926-30, Oct 2008. ISSN 1552-4930 (Electronic)

1552-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752282> >.

LEVENBERG, S. et al. Neurotrophin-induced differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymeric scaffolds. **Tissue Eng**, v. 11, n. 3-4, p. 506-12, Mar-Apr 2005. ISSN 1076-3279 (Print)

1076-3279 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869429> >.

LEVI-MONTALCINI, R.; COHEN, S. Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. **Ann N Y Acad Sci**, v. 85, p. 324-41, Mar 29 1960. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14416187> >.

LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. **J Exp Zool**, v. 116, n. 2, p. 321-61, Mar 1951. ISSN 0022-104X (Print)

0022-104X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14824426> >.

LIN, J. H. et al. Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. **Dev Biol**, v. 302, n. 1, p. 356-66, Feb 1 2007. ISSN 0012-1606 (Print)

0012-1606 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17188262> >.

LIN, M. et al. Cloning of the eukaryotic expression vector with nerve growth factor in rats and its effects on proliferation and differentiation of mesencephal neural stem cells of fetal rats. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 28, n. 5, p. 513-6, Oct 2008. ISSN 1672-0733 (Print)

1672-0733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846328> >.

LOHMANN, K. Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. **Naturwiss**, v. 17, p. 624-625, 1929.

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 5, p. 2074-7, Mar 1 1993. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446631> >.

LOUTRADIS, D.; JOHN, D.; KIESSLING, A. A. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. **Biol Reprod**, v. 37, n. 2, p. 311-6, Sep 1987. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3676390> >.

MAREI, H. E. et al. Gene expression profiling of embryonic human neural stem cells and dopaminergic neurons from adult human substantia nigra. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28420, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22163301> >.

MARTINS, A. H. et al. Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres. **Cytometry A**, v. 73, n. 4, p. 361-8, Apr 2008. ISSN 1552-4930 (Electronic)

1552-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18302192> >.

MASSE, K. et al. Purine-mediated signalling triggers eye development. **Nature**, v. 449, n. 7165, p. 1058-62, Oct 25 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17960245> >.

MATUSICA, D. et al. An Intracellular Domain Fragment of the p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR) Enhances Tropomyosin Receptor Kinase A (TrkA) Receptor Function. **J Biol Chem**, v. 288, n. 16, p. 11144-54, Apr 19 2013. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471969> >.

MIGITA, H. et al. Activation of adenosine A1 receptor-induced neural stem cell proliferation via MEK/ERK and Akt signaling pathways. **J Neurosci Res**, v. 86, n. 13, p. 2820-8, Oct 2008. ISSN 1097-4547 (Electronic)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18618669> >.

MISHRA, S. K. et al. Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. **Development**, v. 133, n. 4, p. 675-84, Feb 2006. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436623> >.

MISSION, J. P.; TAKAHASHI, T.; CAVINESS, V. S., JR. Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. **Glia**, v. 4, n. 2, p. 138-48, 1991. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1709615> >.

NAKAJIMA, M. et al. Combinatorial protein display for the cell-based screening of biomaterials that direct neural stem cell differentiation. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p. 1048-60, Feb 2007. ISSN 0142-9612 (Print)

0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081602> >.

NAMAKA, M. P. et al. Neurogenesis in postnatal mouse dorsal root ganglia. **Exp Neurol**, v. 172, n. 1, p. 60-9, Nov 2001. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11681840> >.

NAUMANN, T. et al. Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons. **J Neurosci**, v. 22, n. 7, p. 2409-18, Apr 1 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923404> >.

NEARY, J. T. et al. Role of mitogen-activated protein kinase cascades in P2Y receptor-mediated trophic activation of astroglial cells. **Drug Development Research**, v. 53, n. 2-3, p. 158-165, 2001.

NEARY, J. T. et al. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. **Trends Neurosci**, v. 19, n. 1, p. 13-8, Jan 1996. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8787135> >.

NEGRAES, P. D. et al. Neural differentiation of P19 carcinoma cells and primary neurospheres: cell morphology, proliferation, viability, and functionality. **Curr Protoc Stem Cell Biol**, v. Chapter 2, p. Unit 2D 9, Mar 2012. ISSN 1938-8969 (Electronic)

1938-8969 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22415841> >.

NGUYEN, N. et al. Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors, activating PI3-kinase and MAPK pathways. **Neurochem Res**, v. 34, n. 5, p. 942-51, May 2009. ISSN 1573-6903 (Electronic)

0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846424> >.

NIKOLIC, P. et al. Transient expression of P2X(1) receptor subunits of ATP-gated ion channels in the developing rat cochlea. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 126, n. 2, p. 173-82, Feb 28 2001. ISSN 0165-3806 (Print)

0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248351> >.

NISHIMOTO, M. et al. PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. **Glia**, v. 55, n. 3, p. 317-27, Feb 2007. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115416> >.

NUREDDIN, A.; EPSARO, E.; KIESSLING, A. A. Purines inhibit the development of mouse embryos in vitro. **J Reprod Fertil**, v. 90, n. 2, p. 455-64, Nov 1990. ISSN 0022-4251 (Print)

0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2250245> >.

ODERFELD-NOWAK, B. et al. NG2 positive cells of rat spinal cord activated during experimental autoimmune encephalomyelitis are spatially associated with radially oriented astroglia and express p75 receptor: a role for nerve growth factor in oligodendrocyte progenitor migration? **Arch Ital Biol**, v. 147, n. 4, p. 105-15, Dec 2009. ISSN 0003-9829 (Print)

0003-9829 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20162860> >.

OLIVEIRA, S. L. et al. Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. **Cytometry A**, v. 83, n. 1, p. 76-89, Jan 2013. ISSN 1552-4930 (Electronic)

1552-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23044513> >.

OTHMAN, T.; YAN, H.; RIVKEES, S. A. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. **Glia**, v. 44, n. 2, p. 166-72, Nov 2003. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14515332> >.

PANG, P. T. et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 487-91, Oct 15 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486301> >.

POOLER, A. M. et al. Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated PC12 [corrected]. **Neuroscience**, v. 134, n. 1, p. 207-14, 2005. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939540> >.

RAMER, M. S.; BRADBURY, E. J.; MCMAHON, S. B. Nerve growth factor induces P2X(3) expression in sensory neurons. **J Neurochem**, v. 77, n. 3, p. 864-75, May 2001. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331415> >.

RATHBONE, M. P. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Prog Neurobiol**, v. 59, n. 6, p. 663-90, Dec 1999. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845757> >.

RESENDE, R. R.; BRITTO, L. R.; ULRICH, H. Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 7, p. 763-77, Nov 2008. ISSN 0736-5748 (Print)

0736-5748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675894> >.

RESENDE, R. R. et al. P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. **Neuroscience**, v. 146, n. 3, p. 1169-81, May 25 2007. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418494> >.

REYNOLDS, B. A.; TETZLAFF, W.; WEISS, S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. **J Neurosci**, v. 12, n. 11, p. 4565-74, Nov 1992. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1432110> >.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A. M. Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A3) adenosine receptor. **Prog Neurobiol**, v. 26, n. 3, p. 179-209, 1986. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2425391> >.

RYU, J. K. et al. Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: Role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. **J Neurosci Res**, v. 72, n. 3, p. 352-62, May 1 2003. ISSN 0360-4012 (Print)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692902> >.

SCHRADER, W. P.; WEST, C. A.; STROMINGER, N. L. Localization of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit brain. **J Histochem Cytochem**, v. 35, n. 4, p. 443-51, Apr 1987. ISSN 0022-1554 (Print)

0022-1554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3546489> >.

SEIDAH, N. G. et al. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. **Biochem J**, v. 314 (Pt 3), p. 951-60, Mar 15 1996. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8615794> >.

SERI, B. et al. Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. **Cereb Cortex**, v. 16 Suppl 1, p. i103-11, Jul 2006. ISSN 1047-3211 (Print)

1047-3211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16766696> >.

SINGH, R. P. et al. Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells. **Cell Transplant**, v. 18, n. 1, p. 55-68, 2009. ISSN 0963-6897 (Print)

0963-6897 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476209> >.

SMITH, J. B.; MILLS, D. C. Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase. **Biochem J**, v. 120, n. 4, p. 20P, Dec 1970. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4322637> >.

STEHLE, J. H. et al. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. **Mol Endocrinol**, v. 6, n. 3, p. 384-93, Mar 1992. ISSN 0888-8809 (Print)

0888-8809 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1584214> >.

STEVENS, B.; FIELDS, R. D. Response of Schwann cells to action potentials in development. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2267-71, Mar 24 2000. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731149> >.

STEVENS, B. et al. Adenosine: an activity-dependent axonal signal regulating MAP kinase and proliferation in developing Schwann cells. **Neuron Glia Biol**, v. 1, n. 1, p. 23-34, Feb 2004. ISSN 1741-0533 (Electronic)

1740-925X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429616> >.

SU, C.; BEVAN, J. A.; BURNSTOCK, G. [3H]adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves. **Science**, v. 173, n. 3994, p. 336-8, Jul 23 1971. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4327032> >.

SUYAMA, S. et al. Purinergic signaling promotes proliferation of adult mouse subventricular zone cells. **J Neurosci**, v. 32, n. 27, p. 9238-47, Jul 4 2012. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22764232> >.

THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science**, v. 270, n. 5236, p. 593-8, Oct 27 1995. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7570017> >.

TRUJILLO, C. A. et al. Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. **J Biol Chem**, v. 287, n. 53, p. 44046-61, Dec 28 2012. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23132855> >.

VAN CALKER, D.; MULLER, M.; HAMPRECHT, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. **J Neurochem**, v. 33, n. 5, p. 999-1005, Nov 1979. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/228008> >.

WAKADE, T. D. et al. Adenosine-induced apoptosis in chick embryonic sympathetic neurons: a new physiological role for adenosine. **J Physiol**, v. 488 (Pt 1), p. 123-38, Oct 1 1995. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8568648> >.

WANG, B. et al. Erk1/2 promotes proliferation and inhibits neuronal differentiation of neural stem cells. **Neurosci Lett**, v. 461, n. 3, p. 252-7, Sep 25 2009. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19539699> >.

WEISSMAN, T. A. et al. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. **Neuron**, v. 43, n. 5, p. 647-61, Sep 2 2004. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339647> >.

YAMAMOTO, T. et al. Subcellular, regional and immunohistochemical localization of adenosine deaminase in various species. **Brain Res Bull**, v. 19, n. 4, p. 473-84, Oct 1987. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3690362> >.

YUHASHI, K. K. et al. Regulation of neurogenesis and gliogenesis of retinoic acid-induced P19 embryonal carcinoma cells by P2X2 and P2X7 receptors studied by RNA interference. **Int J Dev Neurosci**, v. 30, n. 2, p. 91-7, Apr 2012. ISSN 1873-474X (Electronic)

0736-5748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22248690> >.

ZHANG, L.; JIANG, H.; HU, Z. Concentration-dependent effect of nerve growth factor on cell fate determination of neural progenitors. **Stem Cells Dev**, v. 20, n. 10, p. 1723-31, Oct 2011. ISSN 1557-8534 (Electronic)

1547-3287 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219132> >.

ZIMMERMANN, H. Nucleotide signaling in nervous system development. **Pflugers Arch**, v. 452, n. 5, p. 573-88, Aug 2006. ISSN 0031-6768 (Print)

0031-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16639549> >.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal**, v. 8, n. 3, p. 437-502, Sep 2012. ISSN 1573-9546 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22555564> >.

8. LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair.